

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Васиной Дарьи Владимировны

«Изучение организации мультигенного семейства лакказ базидиального гриба *Trametes hirsuta* – эффективного деструктора лигнина», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Диссертационная работа Васиной Дарьи Владимировны посвящена исследованию биохимических основ процесса деструкции древесных субстратов грибами белой гнили – базидиомицетами *Trametes hirsute*, которые являются одними из самых эффективных деструкторов растительных и древесных субстратов. Особое внимание в работе уделяется исследованию лакказ – важнейшего компонента лигноцеллюлолитического комплекса, включая их анализ на геномном, транскриптомном и протеомном уровнях.

Процессы минерализации растительных и древесных субстратов имеют важное фундаментальное значение в связи с функционированием глобального углеродного цикла Земли и процессами формирования почвы, а также эти процессы имеют прикладное значения в связи с использованием ферментных систем грибов для целей промышленной биотехнологии, экологии и медицины.

Актуальность темы диссертации

Деструкция растительного сырья, прежде всего его лигноцеллюлозного компонента, под воздействием ферментных систем микроорганизмов является важнейшим звеном глобального цикла углерода на Земле. В последние годы наблюдается активный поворот к использованию возобновляемого растительного сырья в качестве источника энергии и сахаров. Грибные ферментативные системы, способные осуществлять конверсию растительного сырья, имеют выдающиеся характеристики и обладают значительным потенциалом практического использования. Однако именно эти системы в наименьшей степени изучены, т.к. являются очень сложными. Использование новых подходов к изучению грибных систем деструкции растительного сырья, основанных на современных технологиях анализа на геномном, транскриптомном и протеомном уровнях, позволяют лучше понять механизмы функционирования этих систем и разработать пути реализации их потенциала в промышленной биотехнологии.

1. Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы.

На основании проведенной работы автором сформулированы 5 выводов. Все выводы диссертационной работы соответствуют цели и поставленным задачам, и

полностью отражают полученные экспериментальные результаты по комплексному изучению семейства лакказ базидиомицетов *Trametes hirsute*.

Достоверность каждого результата и выводов диссертационной работы подтверждена большим экспериментальным материалом, полученным с использованием самых современных методов, а также использованием разных методических подходов для изучения объекта работы. С учетом сказанного, достоверность результатов не вызывает сомнений.

Используемые в работе методы наиболее точно соответствуют выбранным задачам. Используемые подходы, применяемые в работе (протеомный анализ, вычитающая гибридизация в сочетании с высокопроизводительным секвенированием, ПЦР в различных вариантах, анализ ферментативной активности), широко используются в мировой практике, они подтвердили свою результативность и воспроизводимость, что позволяет соотнести полученные в диссертационной работе Васиной Д.В. результаты с данными других научных групп.

Диссертационная работа обладает несомненной новизной. Впервые проведено комплексное сравнительное изучение семейства лакказ базидиального гриба *Trametes hirsute* на генетическом (ДНК), транскрипционном (РНК) и белковом уровнях. Выявлены 5 генов лакказ, которые способны к дифференциальной экспрессии в зависимости от условий культивирования гриба. Также впервые изучен ферментный состав лигнин-модифицирующей системы *Trametes hirsute*, которая в отличие от известных ранее систем преимущественно содержит ферменты с глюконазой и маннозидазной активностями. В составе секрета *Trametes hirsute* впервые обнаружены церато-платанины, способные разрушать нековалентные связи в полисахаридах клеточной стенки, что позволило автору высказать гипотезу об их участии в процессах деградации лигноцеллюлозных субстратов. Таким образом получен комплекс новых данных об особенностях ферментативной системы *Trametes hirsute*, участвующей в деструкции растительных субстратов.

2. Ценность полученных в диссертационной работе результатов для науки и практики.

Автором получены результаты, имеющие фундаментальное значение в области биологии грибов базидиомицетов – активных деструкторов растительных и древесных субстратов. Комплексное изучение лигнинмодифицирующей системы гриба *Trametes hirsute* с применением современных методов исследований позволило автору получить новые сведения о биогенезе и функционировании лакказ, продемонстрировать сложность механизмов регуляции их биосинтеза, а также получить новые данные о полифункциональности ферментов семейства лакказ.

Практическая значимость работы связана с выяснением оптимальных условий, при которых культуры гриба обладают максимальной активностью в отношении растительных субстратов. Эти характеристики особенно важны в связи с тем, что эти базидиомицеты являются продуцентами лакказ, пероксидаз и других ферментов. Полученные в ходе выполнения работы данные по наличию в клетках *Trametes hirsute* 072 семейства генов лакказ и экспрессии различных лакказ при разных условиях позволяют направленно изменять специфичность действия культур *Trametes hirsute* в отношении разных субстратов.

3. *Содержание диссертации.*

Диссертационная работа Васиной Д.В. построена по традиционному плану, изложена на 147 страницах, состоит из введения, обзора литературы, глав, описывающих материалы и методы исследований, результаты и их обсуждение, заключения, выводов и списка литературы, включающего 320 источников. В целом диссертация является завершённым исследованием, хорошо иллюстрирована, содержит 33 рисунка и 15 таблиц.

Цель, задачи, актуальность, научная новизна и практическая значимость проводимого исследования представлены во «Введении». Задачи работы сформулированы четко, обосновано по отношению к цели работы. Обзор литературы базируется на анализе большого массива научной информации и в полной мере описывает современное состояние в области изучения ферментного комплекса грибов белой гнили, вовлеченных в деградацию лигнина. Главное внимание уделяется базидиальным лакказам, включая их синтез, регуляцию, генетический контроль, секрецию и посттрансляционную модификацию. Отдельная глава посвящена лакказам грибов рода *Trametes*. Раздел «Обзор литературы» свидетельствует о хорошем знании диссертантом объекта исследования, о её способности критически анализировать имеющийся научный материал и правильном понимании места собственных исследований в мировом научном процессе.

Диссертант использовала впечатляющий набор современных методов, сочетающих биохимические методы и сложнейшие молекулярно-биологические и аналитические методы, в т.ч. различные варианты вычитающей гибридизации, масс-спектрометрии, секвенирования. В работе использован комплексный подход и методы, позволяющие работать на уровне белковых молекул, РНК и ДНК. Описание материалов и методов, применяемых в диссертационной работе, изложены с достаточной полнотой, что позволяет повторить используемые подходы другими исследовательскими коллективами.

Научные результаты, представленные в диссертации, могут быть отнесены к 2 большим частям: комплексное исследование семейства лакказ гриба *Trametes hirsute* на геномном, транскриптомном и протеомном уровнях, и исследование транскрипционной

активности генов *Trametes hirsute* в ответ на добавление ионов меди в среду. Эти части взаимосвязаны, т.к. ионы меди являются индукторами лигнолитических ферментов. Результаты, полученные по каждой из этих частей, отличаются новизной и оригинальностью. Лакказы гриба были изучены в составе внеклеточных белков, продуцируемых базидиомицетом на средах различного состава, был проанализирован протеом *Trametes hirsute* в условиях индукции ионами меди, наконец были идентифицированы гены, контролирующие образование семейства лакказ, проведен филогенетический анализ генов и контролируемых ими продуктов, и, наконец, изучена экспрессия отдельных генов лакказ при культивировании гриба на различных средах в присутствии ионов меди и растворимого лигнина. Таким образом, в результате комплексного подхода получена довольно полная картина биогенеза лакказ от гена к зрелому продукту – внеклеточному активному ферменту. Поразительным фактом этой картины является отсутствие лакказ в составе внутриклеточных белков. В этой связи необходимо подчеркнуть, что достоинствами рассматриваемой работы являются не только полученные интересные результаты, но и вопросы, возникающие в результате выполнения диссертации. Прежде всего, это касается внутриклеточного синтеза лакказ. Замечание к этой части работы связано с тем, что диссертант недостаточно уделяет внимания этому факту и не анализирует причины такого результата: связано ли это с низкой разрешающей способностью метода анализа или отражает особенности биогенеза лакказ?

Вторая часть работы посвящена анализу транскрипционной активности генов гриба *Trametes hirsute* в ответ на внесение в среду ионов меди. Технически, методологически эта часть является наиболее сложной, т.к. связана с манипуляциями с РНК, включая создание вычитающих библиотек кДНК, проведение селекции образцов, позволяющей снизить количество фоновых клонов в библиотеках. Сложность этой работы также связана с отсутствием полного сиквенса и аннотирования генома *Trametes hirsute* 072. Диссертант успешно преодолела все сложности и получила интересные результаты по анализу транскриптов. Оказалось, что ионы меди вызывают глобальный ответ клетки, при этом затрагиваются пути центрального метаболизма (ЦТК, гликолиз, ПФЦ), а также окислительное фосфорилирование. Сравнивая эти результаты с результатами протеомного анализа можно говорить об ответе клетки на условия стресса, связанного с добавлением ионов меди.

Имеются замечания общего характера к представлению данных. Представлены рисунки высокого качества, однако очень небольших размеров, что затрудняет их анализ

(например, рис.11 и рис.28). Эти замечания носит технический характер и не влияют на общую высокую оценку выполненной работы.

4. *Опубликование результатов диссертации в научной печати.*

Результаты и выводы диссертационной работы Васиной Д.В. в полном объеме представлены в печатных работах, включающих в себя 4 статьи в зарубежных и Российских центральных научных журналах, рекомендованных ВАК. Материалы диссертации неоднократно представлялись на международных и отечественных конференциях.

5. *Содержание автореферата.*

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

6. *Заключение.*

Диссертационная работа Васиной Д.В. «Изучение организации мультигенного семейства лакказ базидиального гриба *Trametes hirsute* – эффективного деструктора лигнина», имеет важное значение для развития фундаментальных и прикладных аспектов биохимических процессов деструкции растительных субстратов и отвечает всем требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Васина Дарья Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Яненко Александр Степанович
Заместитель директора по научной работе
Государственного научного центра РФ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»
(117545 Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1)
www.genetika.ru, тел. 8(495)315 37 47,
e-mail оппонента: yanenko@genetika.ru
доктор биологических наук, профессор

А. С. Яненко

Подпись д.б.н., профессора Яненко А.С. заверяю

Ученый секретарь

Государственного научного центра РФ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»,
Кандидат химических наук

С. В. Яроцкий

3.12.2015