

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Поздняковой Наталии Николаевны на диссертацию 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 Д.В. Васиной посвящена исследованию мультигенного семейства лакказ базидиального гриба *Trametes hirsuta*, закономерностей экспрессии и продукции его членов на молекулярном уровне, включающем анализ транскриптома, протеома и секретома.

Актуальность проведенного исследования не вызывает сомнения. Лигнинолитические деревообитающие и почвообитающие базидиомицеты, как и некоторые виды аскомицетов, являются наиболее активными деструкторами лигнинового компонента древесины в природе, и тем самым являются важными элементами углеродного цикла, генерации гуминового составляющего почвы и формирования ее тонкой структуры. Ферментативная система этих грибов, катализирующая деградацию лигнина, является внеклеточной неспецифической и окислительной, что позволяет им, кроме природного субстрата, метаболизировать широкий спектр поллютантов и их смесей. Процесс разрушения лигноцеллюлозных субстратов лигнинолитическими грибами является очень сложным, что определяется широким кругом вовлеченных в него ферментов. Для полного понимания биохимических механизмов регуляции процессов грибной биodeградации и биотрансформации различных субстратов необходимы дальнейшие исследования, что облегчит поиск новых штаммов грибов и ферментов перспективных для использования в биотехнологических процессах. Без изучения и понимания этих вопросов невозможно широкое практическое использование грибов и синтезируемых ими ферментов и биологически активных соединений.

Вполне оправданным представляется и выбор объекта исследований – представителя рода *Trametes*. Грибы, относящиеся к этому роду являются одними из самых эффективных деструкторов растительных и древесных субстратов. Их ферментативный комплекс включает лакказы, пероксидазы и целлюлолитические ферменты. Большинство хорошо исследованных и 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. 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.

Представленная к защите работа полностью соответствует заявленной специальности 03.01.04 – биохимия. Сформулированные задачи и их решение способствуют достижению заявленной цели работы. Ознакомление с диссертацией свидетельствует о том, что поставленные в ней задачи решены в полном объеме.

Несомненна **научная новизна** полученных результатов. 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 этого гриба установлено наличие мультигенного семейства лакказ, включающего 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. Охарактеризован ферментный состав лигнин модифицирующей системы (ЛМС) *T. hirsuta* 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. 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 других видов грибов *Trametes* sp., что позволило выделить функциональные кластеры изоферментов, отличающихся по физико-химическим, биохимическим и каталитическим свойствам. Выдвинуто предположение, что на стадиях деградации лигнина, сопровождающихся повышенной продукцией протеолитических ферментов, наиболее активно продуцируются лакказы кластера С с более высокой степенью гликозилирования. Показано, что в секретоме *T. hirsuta* при культивировании на глюкозо-пептонной среде продуцируется два изофермента LacA и LacC.

Представленная к защите работа оформлена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения и списка литературы. Диссертация изложена на 147 страницах, хорошо иллюстрированных 33 рисунками и 15 таблицами. Впечатляет список литературы, содержащий 320 цитируемых источников.

В обзоре литературы (глава 1) дан подробный анализ современных представлений о семействе полимедных оксидаз грибов белой гнили, структуре этого семейства, а также о генетической организации и регуляции мультигенного семейства лакказ. Охарактеризованы основные системы, участвующие в синтезе и процессинге внеклеточных лакказ. Описана роль лакказ в процессах лигнинолиза и жизнедеятельности базидиомицетов. Обзор написан точным научным языком и хорошо подготавливает к восприятию последующего экспериментального материала, а приводимые сведения показывают глубокое понимание диссертантом изучаемой проблемы.

Глава 2 содержит подробное описание основных используемых в работе методов, среди которых как классические микологические и биохимические, так и современные методики транскрипционного анализа гриба (получение мРНК, процедуры супрессионной вычитающей гибридизации и зеркально-ориентированной селекции образцов кДНК,

RACE ПЦР, qPCR) и характеристики членов мультигенного семейства лакказ (биоинформационный анализ).

Глава 3 представляет собственные результаты автора, научная новизна которых не вызывает сомнений. Автором показано, что 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 лигнинмодифицирующей системы. Основным изоферментом, продуцируемым грибом в виде нескольких изоформ, на всех исследуемых средах, являлся изофермент LacA. На более поздних этапах обнаружена продукция еще одного изофермента, что может быть связано с накоплением специфических индукторов, по-видимому, представляющих собой продукты деградации лигнина.

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.

При использовании метода дифференциальной протеомики, основанного на анализе отличий в белковых профилях гриба *T. hirsuta* при культивировании на разных средах, автору удалось идентифицировать 4 белка, значительно увеличивающих свою продукцию при культивировании гриба на среде глюкоза-пептон/ Cu^{2+} . Данные отличия были обусловлены изменениями внутриклеточных процессов в ответ на внесение индуктора в питательную среду. Высказано предположение, что 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.

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

Автором 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).

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. На основании полученных автором сделано предположение, 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.

Представленные экспериментальные данные хорошо изложены и проиллюстрированы, что позволяет сделать заключение о достоверности результатов и обоснованности выводов диссертации. В заключение работы автор обобщает полученные результаты и формулирует выводы, которые логичны и обоснованы.

Диссертация Д.В. Васиной прошла достаточно широкую апробацию на российских и международных конференциях. По теме диссертации опубликованы 14 работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ. Автореферат полностью является кратким и точным изложением принципиально важных разделов рукописи диссертации.

В ходе прочтения работы и автореферата возникли некоторые замечания:

1. 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.

2. 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.

3. 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.

Перечисленные замечания не носят принципиального характера и не умаляют достоинств и значения работы.

В целом, можно заключить, что представленная работа является добротным законченным исследованием, выполненном на высоком методическом уровне. По актуальности темы, методическому уровню, степени обоснованности и достоверности полученных результатов, их новизне, значительной теоретической и практической значимости диссертационная работа Васиной Дарьи Владимировны «Изучение организации мультигенного семейства лакказ базидиального гриба *Trametes hirsuta* – эффективного деструктора лигнина» полностью соответствует требованиям п. 9

«Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Позднякова Наталия Николаевна
доктор биологических наук
ведущий научный сотрудник лаборатории
экологической биотехнологии
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института биохимии и физиологии
растений и микроорганизмов Российской академии наук
410049, Саратов, проспект Энтузиастов, д. 13
E-mail: nnpozdneyakova@ibppm.sgu.ru
Тел. 89093410149

Подпись Н.Н. Поздняковой заверяю
Ученый секретарь
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института биохимии и физиологии
растений и микроорганизмов Российской академии наук

к.б.н.

Т.Е. Пылаев

30 ноября 2015 г.

