

На правах рукописи

Васина Дарья Владимировна

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

Специальность 03.01.04 Биохимия

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2015

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

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. 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 обладают также уникальными механизмами детоксификации, как продуктов деградации лигнина, так и различных ксенобиотиков. 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; 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 (КФ 1.11.1.13) и лигнин пероксидазы (КФ 1.11.1.14), а также комплекс вторичных метаболитов, секретируемых этими грибами.

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.

Сегодня благодаря интенсивному развитию биоинформационных ресурсов становится возможным детальный анализ транскриптомов, протеомов и секретомов высших грибов. На всех трёх уровнях изучаются биохимические механизмы деградации различных типов древесины базидиомицетами, определяется спектр ферментов лигноцеллюлолитического комплекса, вовлеченных в эти процессы. Несмотря на выявленные общие закономерности процессов деструкции древесины, конкретный ме-

Используемые сокращения и обозначения: АФК – активные формы кислорода; ГП – глюкозо-пептонная среда; ИЭТ – изоэлектрическая точка белка; КЖ – культуральная жидкость; ЛМС - лигнинмодифицирующая система; ЛЦ – лигноцеллюлозный субстрат; ПЦР – полимеразная цепная реакция; СВН – целлобиогидролаза; СР – цера-то-платанины; ААО – арилалкоголь оксидаза; GH - гликозид-гидролазы; GLOX – глиоксальоксидаза; GO – генная онтология; Lac – лакказа; LiP – лигнин пероксидаза; MnP – марганец-зависимая пероксидаза; MOS – зеркально-ориентированная селекция кДНК; Mr – молекулярная масса белка; 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.

ханизм определяется индивидуальными особенностями грибов, участвующих в данном процессе. Следует отметить, что у базидиальных грибов наиболее изучена роль в этом процессе мультигенных семейств, кодирующих пероксидазы. Наименее изученными, с точки зрения регуляции экспрессии, биосинтеза, секреции, функциональных свойств и выполняемой биологической роли, у базидиомицетов являются мультигенные семейства, кодирующие лакказы.

Поскольку процесс разрушения лигноцеллюлозных субстратов грибами белой гнили весьма сложен, 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. 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 эффективных деструкторов лигнина среди известных базидиомицетов, – актуально как с фундаментальной, так и с практической точек зрения.

Целью диссертационной 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.

Достижение поставленной цели связано с решением следующих **задач**, определяющих структуру исследования:

- 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.

Научная новизна работы. 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, 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.

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 целлюлазной и ксилоназной активностью, ферменты, секретируемые *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 Stl1. 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 секрете *T. hirsuta* при культивировании на ЛЦ среде продуцируется два изофермента LacA и LacC.

Практическая значимость работы. Выявленные закономерности регуляции экспрессии и продукции индивидуальных изоферментов лакказ могут служить основой для получения рекомбинантных ферментов с заданными свойствами, адаптированных под конкретные биотехнологические процессы. Установлено, что в отличие от уже описанных видов возбудителей белой гнили древесины, которые преимущественно экспрессируют ферменты с целлюlobиазной и ксилоназной активностью, ферменты, секретируемые *T. hirsuta*, проявляют в основном глюконазную и маннозидазную активности. Полученные данные могут быть использованы для повышения эффективности технологий биоконверсии растительного сырья на основе грибов рода *Trametes*.

Положения, 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. 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, пентозофосфатный 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).

Личный вклад диссертанта. Диссертантом проведены основная часть экспериментальных работ, представленных в диссертации, обработка полученных данных, подготовка материалов к публикациям.

Апробация работы. 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 Федерации 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 Федерации Европейских микробиологических обществ – FEMS (Маастрихт, Нидерланды, 2015).

Диссертационная работа представлена 13 октября 2015 г. на межлабораторном семинаре Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Связь работы с государственными программами. Работа диссертанта была поддержана ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы" (соглашение о предоставлении субсидии № 14.613.21.0028 от 28.11.2014).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, и 10 тезисов в материалах отечественных и международных конференций.

Объем и структура работы.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, перечня публикаций по теме диссертации и списка литературы (320 источников). Работа изложена на 147 страницах машинописного текста, содержит 33 рисунка и 15 таблиц.

В первой главе представлен анализ литературных данных о современном состоянии исследований семейства 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.

Во второй главе приведены сведения о реагентах, материалах и оборудовании, используемых в работе. Описаны методы культивирования *Trametes hirsuta*, определения активностей лигнолитических ферментов, получение внутриклеточных и внеклеточных белковых экстрактов и проведение их протеомных исследований. Изложены 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 (биоинформатический анализ).

В третьей главе представлены результаты по идентификации и характеристике членов мультигенного семейства лакказ *T. hirsuta*, а также интерпретация экспериментов по изучению их дифференциальной экспрессии при разных условиях культивирования гриба. Приведены результаты исследования метаболических путей, потенциально связанных с биогенезом лакказ на уровне транскриптома и протеома. Охарактеризован состав комплекса внеклеточных ферментов *T. hirsuta* и его изменения при росте на ГП и ЛЦ средах.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Комплексное изучение организации мультиферментного семейства лакказ *Trametes hirsuta* включало характеристику профилей ферментативной активности, сравнительный секретомный, протеомный и транскриптомный анализ в отсутствие и в присутствии индукторов. В качестве исследуемых индукторов были выбраны: CuSO_4 , универсальный индуктор продукции лакказ, и лигноцеллюлозный субстрат (овсяная солома), содержащий значительное количество лигнина (до 20% сухого вещества) и способный индуцировать экспрессию ферментов лигнолитического комплекса, в том числе лакказ.

Изучение профилей внеклеточных белков *T. hirsuta*

Изучение профилей активностей внеклеточных белков *T. hirsuta*. Исследование накопления активностей ферментов ЛМС *T. hirsuta* позволило выявить несколько закономерностей:

- 1) При культивировании на ГП среде максимальная активность лакказы наблюдалась на 8-ые сутки культивирования, причем внесение CuSO_4 увеличивало активность лакказ в 8 раз. При культивировании на ЛЦ среде динамика активности фермента менялась: ее рост отмечен в течение всего периода культивирования (69 дней).

При этом внесение CuSO_4 дополнительно индуцировало активность фермента, но на ЛЦ субстрате менее выражено, чем на ГП среде.

2) Для комплекса пероксидаз (MnP, LiP и VP) характерно несколько пиков активностей ферментов, что предполагает периодичный характер их индукции продуктами деградации лигноцеллюлозы. Продукция MnP практически не обнаруживалась при культивировании в статических условиях (ЛЦ среда) и значительно снижалась при глубинном культивировании на ГП среде при внесении CuSO_4 .

3) Активности как LiP, так и VP были намного выше при культивировании на ЛЦ среде, вероятно, за счет индукции этих ферментов компонентами лигноцеллюлозного субстрата. Для них, так же как и для MnP, характерно ингибирование при внесении CuSO_4 – практически полное для LiP и на 50-80% для VP.

4) Активность перекись-генерирующего фермента арилалкогольоксидазы (AAO) также имела периодичный характер и была значительно выше на ЛЦ/ Cu^{2+} среде.

Сравнительный анализ профилей внеклеточных белков, продуцируемых *T. hirsuta*. На основании динамики активностей основных ферментов ЛМС *T. hirsuta* (Lac, MnP, VP, AAO) выбирали временной диапазон для проведения протеомного анализа, включавшего разделение белковых экстрактов с помощью двумерного электрофореза с последующей идентификацией белков методом MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрии.

Разработан метод экстракции белковых компонентов из КЖ гриба при культивировании на различных средах (ГП, ГП/ Cu^{2+} и LC, LC/ Cu^{2+}). Экстракция смесью ТХУ/ацетон была наиболее эффективна для выделения белков секрета при культивировании на ГП среде, позволив удалить большинство пигментов, секретируемых в КЖ базидиомицетом, и получить максимально разрешенные и содержательные двумерные электрофореграммы. Внесение лигноцеллюлозного субстрата в среду культивирования увеличивало степень пигментации КЖ. Сочетание последовательного переосаждения белков смесью ТСА/ацетон и набором 2D Protein Kit позволило получить хорошо разрешенные электрофореграммы, даже для сильно пигментированных ЛЦ сред с высоким содержанием грибных метаболитов. В результате, на 2D электрофореграммах было получено от 50 (для ГП сред) до 100 (для ЛЦ сред) индивидуальных компонентов, что согласуется с литературными данными по содержанию белков в секретах грибов – возбудителей белой гнили древесины (Vincent D. et al., Zorn H. et al.).

Исследование секретомов *T. hirsuta* показало существенные различия в продукции белков в зависимости от состава среды и времени культивирования (рис. 1, табл. 1). По сравнению с глубинным культивированием на ГП среде, при поверхностном культивировании в присутствии лигноцеллюлозного субстрата количество продуцируемых белков возрастало в 2,5 раза. Результаты идентификации белковых компонентов приведены в таблице 1.

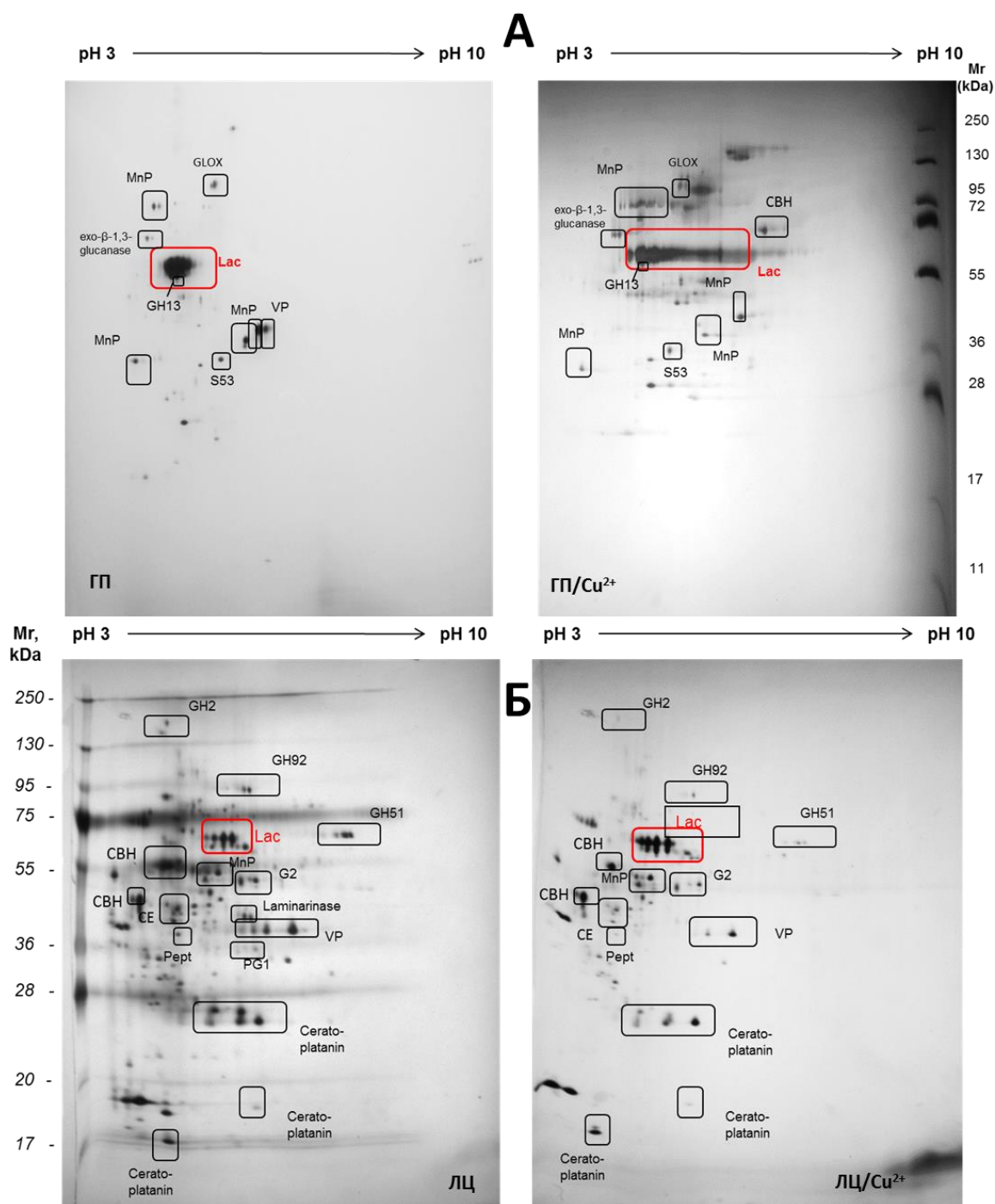


Рис. 1. Анализ секретомов *T. hirsuta*. Внеклеточные белки, полученные из образцов культуральной жидкости и разделенные методом двумерного электрофореза (без индукции – слева и с индукцией CuSO_4 – справа). А – ГП среда, 8-е сутки культивирования, Б – ЛЦ среда, 3-и сутки культивирования

Табл. 1. Внеклеточные белки, идентифицированные в секретах *T. hirsuta* при разных условиях культивирования

Идентифицированные белки	Количество изоформ (изоферментов); -Cu/+Cu						Физиологическая роль
	ГП среда			ЛЦ среда			
	5 сутки	8 сутки	20 сутки	3 сутки	11 сутки	21 сутки	
Лигнолитические ферменты							
Лакказа ¹	8/13	7/11	7/10	8/8	4/5	5/8	Деградация лигнина
Марганец-зависимая пероксидаза	10/14	6/4	5/4	4/3	н/д	н/д	
Марганец-независимая пероксидаза	2/2	1/0	0/0	4/2	6/4	0/2	
Гликолитические ферменты							
ЦеллобиогидролазаI	н/д	0/4	3/4	4/3	4/2	1/2	Целлюлолитические ферменты
Экзо-β-1,3-глюканаза	2/0	2/3	0/3	н/д	н/д	н/д	Целлюлолитические ферменты
Эндо-β-1,3-глюканаза	н/д	н/д	н/д	2/0	2/0	1/0	Модификация клеточной стенки
Гликозид-гидролаза, семейство 2	0/0	0/0	0/0	2/1	1/1	н/д	Разрыв гликозидных связей
Гликозид-гидролаза, семейство 13 (α-амилаза)	0/0	1/1	1/1	0/0	0/0	н/д	-
Гликозид-гидролаза, семейство 51	н/д	н/д	н/д	9/7	8/6	4/5	Основной гемицеллюлолитический фермент
Гликозид-гидролаза, семейство 92	н/д	н/д	н/д	3/1	7/8	5/7	Модификация клеточной стенки
ЭндополигалактуроназаPG1	0/1	н/д	н/д	3/0	3/3	2/2	Пектин-разрушающие ферменты
Эстераза, семейство 16	н/д	н/д	н/д	5/5	0/2	2/2	Пектин-разрушающие ферменты
Глюкоамилаза (G2)	н/д	н/д	н/д	4/3	2/2	н/д	Крахмал-деградирующий фермент
Вспомогательные ферменты							
Медь-содержащая оксидаза (глиоксальоксидаза)	2/1	2/2	2/2	н/д	н/д	н/д	Генерация перекиси водорода
Другие белки							
Протеаза семейства S53	1/3	1/1	н/д	н/д	0/1	н/д	-
Аспартатпептидаза	н/д	н/д	н/д	1/0	0/1	н/д	-
Церато-платанины	0/0	0/0	0/0	7/8	5/2	2/3	Фитотоксичные белки

¹ На 21-е сутки культивирования отмечена продукция второго изофермента лакказы; н/д– белок не был найден на электрофореграмме.

Оксидоредуктазы формируют наиболее обширную группу секретируемых ферментов *T. hirsuta* в исследуемых условиях. При этом в секрете представлены множественные изоформы/изоферменты лакказ и марганец-независимых пероксидаз. В отличие от других изученных базидиомицетов, у *T. hirsuta* продукция MnP и LiP значительно снижена. Кроме того, *T. hirsuta* продуцирует лишь незначительное количество гликозид-гидролаз и пептидаз, считающихся основными группами внеклеточных ферментов грибов – возбудителей белой гнили древесины. Внесение ионов меди в среду культивирования резко увеличивало секрецию лакказ и арилалкогольоксидазы и, в то же время, оказывало ингибирующее действие на продукцию других секретируемых белков (MnP и VP).

Также показано, что базидиомицет в ответ на внесение в среду культивирования лигноцеллюлозы секретирует значительное количество церато-платанинов, что свидетельствует об участии этих белков в деградации лигноцеллюлозных субстратов. Изменение условий культивирования гриба (переход с ГП на ЛЦ среду) не только вызывает увеличение спектра белков, но и обеспечивает эффективную продукцию ферментов, отвечающих за деградацию лигноцеллюлозного субстрата.

Изучение изоферментного состава фракции лакказ показало, что единственным идентифицированным изоферментом, продуцируемым *T. hirsuta* в виде нескольких изоформ на всех исследованных средах, являлся изофермент LacA [GenBank: KP027478]. Продукция второго, отличного от LacA изофермента, была обнаружена после 21-дневного поверхностного культивирования на ЛЦ субстрате, что позволяет предположить зависимость продукции минорных изоферментов лакказы от накопления в среде специфических индукторов, по-видимому, представляющих собой продукты деградации лигнина. Ранее такая зависимость была показана для изоферментов лакказ гриба *Phlebia radiata* на уровне транскрипции.

Изучение профилей внутриклеточных белков *T. hirsuta*

Выделенные и охарактеризованные на данный момент лакказы являются внеклеточными ферментами. В ряде работ представлены данные о внутриклеточных ферментах, свойства которых (субстратная специфичность, pI) аналогичны свойствам их внеклеточных форм. Однако, по мнению других авторов, внутриклеточные лакказы – это индивидуальные изоферменты с независимой регуляцией. Сравнительные исследования протеома и секрета *T. hirsuta* позволяют не только получить информацию о биогенезе лакказ, но и внести ясность в этот вопрос.

Методики получения внутриклеточных белков базидиомицетов зависят от исследуемого штамма и в значительной степени индивидуальны. В ходе работы был оптимизирован метод получения образцов внутриклеточных белков *T. hirsuta*, включающий механическое разрушение мицелия гриба с последующим переосаждением белков смесью ТХУ/ацетон, что привело к улучшению разрешающей способности 2D-электрофограмм протеома базидиомицета.

Анализ электрофореграмм, полученных в момент максимальной активности лакказы в КЖ, показал, что перекрытие белковых компонентов, полученных при разделении внутриклеточных белков на разных стадиях роста гриба на ГП и ГП/ Cu^{2+} средах, составляет 60-65%.

Используя подходы дифференциальной протеомики, удалось выделить 7 белков, значительно увеличивающих продукцию в присутствии Cu^{2+} , 4 из которых были идентифицированы (рис. 2, табл. 2).

Достоверно были определены 2 изоформы АТФ-синтазы (параметр достоверности score >83). Также как вероятные (score >50) были идентифицированы белки группы молекулярных шаперонов Hsp70, участвующие в различных внутриклеточных процессах, в частности, связанных с синтезом и фолдингом различных внеклеточных и внутриклеточных белков, и активатор шаперонов Sti1, регулирующий скорость каталитического цикла шаперонов семейств HSP70 (табл. 2). Как показано ранее, активатор шаперонов Sti1 в комплексе Ssa1-Sti1-Hsp90 способен влиять на АТФазную активность Ssa, увеличивая скорость гидролиза АТФ до 200 раз, тем самым, увеличивая скорость каталитического цикла шаперона.

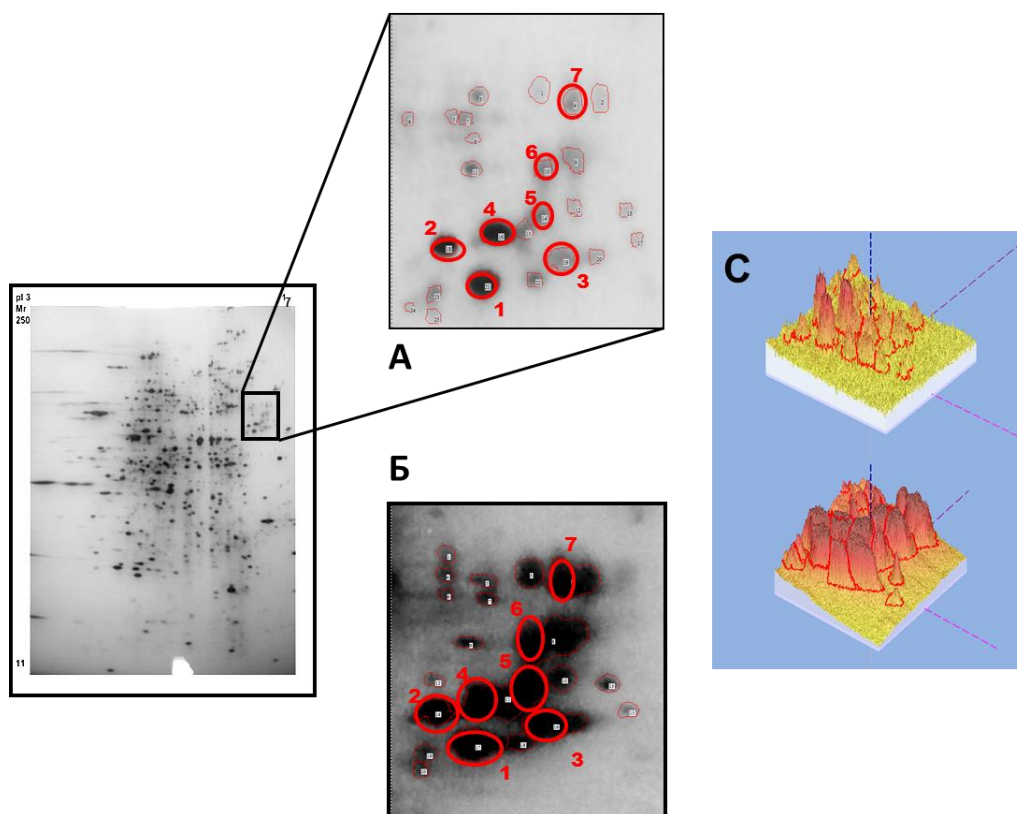


Рис. 2. Анализ протеомов *T. hirsuta*. Внутриклеточные белки с наиболее выраженным изменением продукции при внесении CuSO_4 , полученные из образцов мицелия и разделенные методом двумерного электрофореза (А – культивирование в отсутствии индуктора; Б – культивирование в присутствии индуктора). Трехмерное отображение выделенного участка (С) показывает количественные изменения в составе продуцируемых форм фермента

Табл. 2. Белки, идентифицированные в протеоме *T. hirsuta* с помощью MALDI TOF/TOF масс-спектрометрии

№ на рис. 2	Идентифицированный белок	Микроорганизм	NCBI ID	Mr, кДа	ИЭ Т	Score	E value
1	HSP70 (Ssa)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_750490.1	69,7	5,08	63	0,001
2	ATP2, beta sub-unit of mitochondrial F1F0 ATP synthase	<i>Serpula lacrymans</i>	gi 336367226	57,8	5,41	140	1,6e-07
4	ATP2, beta sub-unit of mitochondrial F1F0 ATP synthase	<i>Serpula lacrymans</i>	gi 336367226	57,8	5,41	134	6,2e-07
6	Chaperone activator Sti1	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	gi 212002899	64,3	5,65	50	9

Вероятно, добавление в питательную среду ионов меди вызывает ответную реакцию гриба *T. hirsuta*, направленную на скорейшее выведение ионов меди за пределы клетки. При этом возникает необходимость в увеличении количества белков-ассистентов, регулирующих процесс фолдинга и секреции лакказ. Однако на среде, содержащий лигноцеллюлозный субстрат, ионы меди аналогичное влияние не оказывали. Большинство внутриклеточных белков сохраняло уровень продукции, как в отсутствии ионов меди, так и при их внесении в среду культивирования. Среди белков, изменяющих уровень продукции, не были выявлены внутриклеточные лакказы, что вероятно, связано или с их низкой представленностью на уровне белковых продуктов, или же с особенностями их секреции.

Сравнительный анализ тотальных транскриптомов *T. hirsuta* в ответ на внесение ионов меди

В ходе протеомных исследований выявлено 2 изофермента лакказы, секретируемых грибом. Продукция изоферментов в значительной степени зависела от условий культивирования и фазы роста гриба, что свидетельствует о дифференциальной регуляции экспрессии этих двух генов. По данным GeneBank, у грибов – ближайших родственников *T. hirsuta*, таких как *T. versicolor*, *T. cinnabarina*, *T. pubescens*, количество генов лакказ, формирующих мультигенное семейство, составляет от 5 до 7. Чтобы установить максимально полный состав мультигенного семейства *T. hirsuta*, был проведен анализ на транскрипционном уровне (на уровне кДНК) в отсутствие и присутствии индуктора.

Супрессионная вычитающая гибридизация кДНК *T. hirsuta*. Была проведена супрессионная вычитающая гибридизация (SSH) с дополнительным этапом зеркально-ориентированной селекции транскриптов (MOS).

Сочетание этих методов позволяет выявлять дифференциально экспрессирующиеся, в том числе и слабо экспрессирующиеся гены. Продукты первичной и вторичной ПЦР образцов кДНК, полученные в результате применения разных стадий вычитающей гибридизации, представлены на рис. 3. Вычитание образцов кДНК осуществляли в двух направлениях, и в результате были созданы четыре библиотеки кДНК транскриптов: две библиотеки с вычитанием транскриптов, полученных на ГП среде до MOS и после MOS, и две библиотеки с вычитанием транскриптов, полученных на ГП/ Cu^{2+} среде до MOS и после MOS.

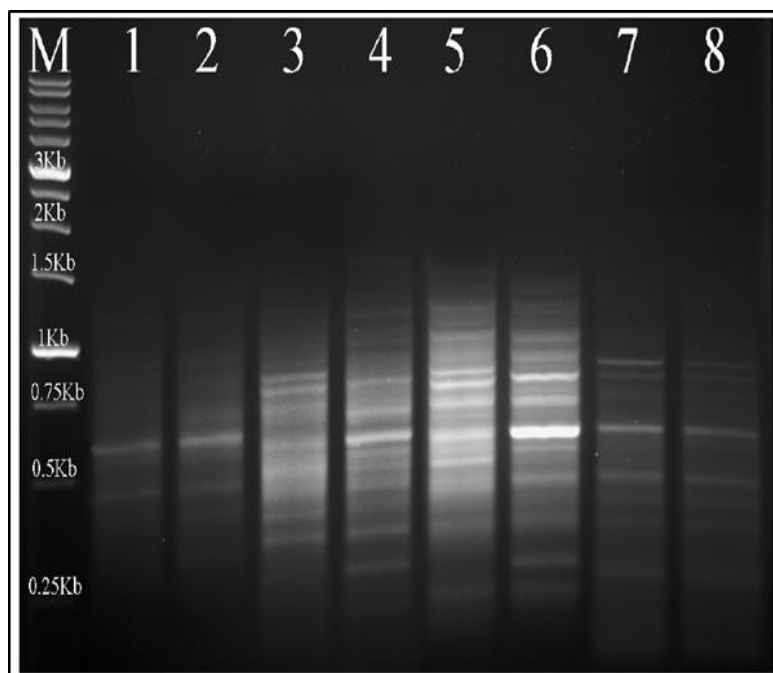


Рис. 3. Электрофореграмма библиотек кДНК *T. hirsuta* после процедур SSH и MOS. 1 – продукты первичной ПЦР ГП/ Cu^{2+} вычитенного образца; 2 – продукты первичной ПЦР ГП вычитенного образца; 3 – продукты вторичной ПЦР ГП/ Cu^{2+} вычитенного образца; 4 – продукты вторичной ПЦР ГП вычитенного образца; 5 – MOS ПЦР ГП/ Cu^{2+} вычитенного образца; 6 – MOS ПЦР ГП вычитенного образца; 7 – невычитенная кДНК, образец ГП/ Cu^{2+} ; 8 – невычитенная кДНК, образец ГП. М – 1 kb ДНК маркер

Анализ результатов SSH. Для анализа полученных данных использовали программное обеспечение Blast2GO (<https://www.blast2go.com/>), позволяющее идентифицировать и аннотировать значительный объем последовательностей.

В результате проведенного анализа выявлены транскрипты, относительный уровень экспрессии которых значительно изменялся при индукции ионами меди. Показано присутствие большого количества – около 10% – неаннотированных белков (hypothetical proteins), функция которых неизвестна. При анализе всех библиотек транскриптов по категории «молекулярные функции» максимально представленными были подкатегории "каталитически активные белки" или ферменты (GO:0003824), а также «связывающие белки» (GO:0005488), которые в сумме составляли 89 и 87% идентифицированных транскриптов для ГП и ГП/ Cu^{2+} образцов соответственно (рис. 4).

Анализ библиотек транскриптов *T. hirsuta* с использованием базы данных KEGG pathway maps (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) показал, что основное влияние ионы меди оказывают на процессы метаболизма углеводов (табл. 3). Наибольшее количество идентифицированных последовательностей принадлежало

ферментам цикла трикарбоновых кислот (17/16 ферментов для ГП и ГП/Cu²⁺ соответственно), гликолиза/глюконеогенеза (19/16 ферментов), пентозофосфатного пути (13/12 ферментов), глиоксилатного цикла (11/11 ферментов), метаболизма пуриновых (33/29 ферментов) и пиримидиновых (13/12 ферментов) оснований.

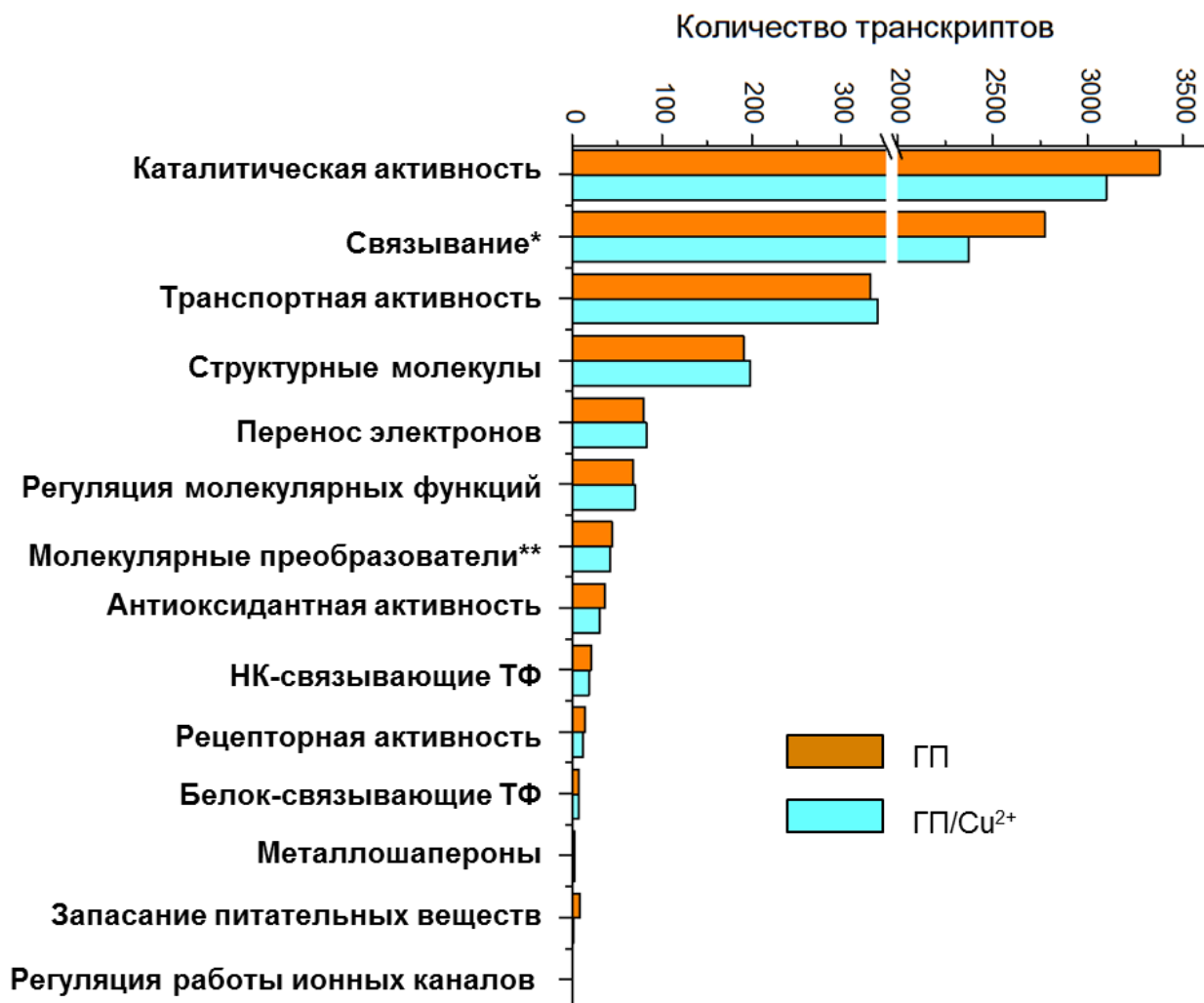


Рис. 4. Распределение согласно классификации геной онтологии транскриптов.

*Связывание – белки, осуществляющие селективное, нековалентное, часто стехиометрическое, взаимодействие с одним или несколькими конкретными участками другой молекулы; **молекулярные преобразователи – белки, способные преобразовывать молекулы из одной формы в другую, ТФ – транскрипционные факторы

Табл. 3. Количество идентифицированных ферментов, относящихся к разным метаболическим путям, изменяющих экспрессию при внесении ионов меди в среду культивирования

	Количество идентифицированных ферментов соответствующего метаболического пути (количество последовательностей транскриптов в библиотеках кДНК)	
	ГП	ГП/ Cu^{2+}
Цикл трикарбоновых к-т	17 (61)	16 (60)
Гликолиз/глюконеогенез	19 (54)	16 (46)
Пентозофосфатный 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 аминокислот-тРНК	17 (46)	17 (51)
Окислительное фосфорилирование	4 (38)	4 (36)

Код КФ	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 с-редуктаза «комплекс III»		Увеличение в 2,5 раза
1.9.3.1	Цитохром с-оксидаза «комплекс IV»		Увеличение в 14,7 раз
3.6.1.1	Неорганическая пирофосфатаза		Уникальный для ГП/ Cu^{2+} среды

Табл. 4. Вызванные внесением CuSO_4 изменения экспрессии генов, кодирующих ферменты окислительного фосфорилирования. КФ – код фермента по международной иерархической классификации

Анализ уровней экспрессии генов, кодирующих комплексы I-IV дыхательной цепи *T. hirsuta* и неорганическую пирофосфатазу, также показал значительные изменения при внесении в среду культивирования ионов меди (табл. 4). 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 CuSO_4 .

Еще в 70-х годах XX века для грибов было показано существование ферментов, способных альтернативно окислять NADH матрикса и немитохондриальный NADH, а также альтернативной цианрезистентной терминальной оксидазы (АОХ) и связанного с ними альтернативного пути переноса электронов. Снижение экспрессии комплексов I и II может быть связано с активацией альтернативного не сопряженного дыхательного пути гриба, пересекающегося с канонической «сопряженной» дыхательной цепью лишь на уровне убихинона.

Снижение экспрессии генов, кодирующих NADH-дегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы, не влияло на динамику роста продуцента. Это позволяет предположить, что альтернативный путь дыхания реализуется параллельно с традиционным «цитохромным» путем. Данный переход, вероятно, 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.

Исследование мультигенного семейства лакказ *T. hirsuta*

In silico скрининг генов лакказ в транскриптоме. Для базидиальных лакказ известно существование 4 консервативных медь-связывающих последовательностей: L1 (HWHGFFQ), L2 (HSHLSTQ), L3 (HPFHLHG), и L4 (HCHIDFHL). В нашей работе с помощью множественного выравнивания последовательностей генов лакказ базидиомицетов (*Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Pleurotus ostreatus*; *Dichomitus squa-lens*; *Laccaria bicolor*; *Coprinopsis cinerea*; *Stereum hirsutum*) были обнаружены еще 2 консервативных мотива: KRYRFRLV (L5) и PPTVPVLL (L6). С использованием структуры 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 второго купредоксинового домена. Несмотря на высокую степень консервативности этих двух мотивов, ни одна из последовательностей не входит в состав активного центра фермента.

Разработан алгоритм поиска транскриптов, кодирующих лакказы, основанный на использовании установленных маркерных консервативных последовательностей белков. Схема скрининга и результаты ее реализации представлены на рис. 5. Применение данного алгоритма позволило выявить 5 последовательностей мРНК, потенциально кодирующих изоферменты лакказ у *T. hirsuta*. Они были обозначены как *lacA*,

lacB, *lacC*, *lacD* и *lacE*, причем один из этих генов (*lacA*) относился к ранее зарегистрированной в GeneBank последовательности лакказы *T. hirsuta* (ACC43989.1). По данным вычитающей гибридизации последовательности, идентифицированные как транскрипты лакказ, при внесении меди в среду культивирования увеличивали экспрессию в 10-1000 раз (в зависимости от изофермента).



Рис. 5. *In silico* поиск транскриптов, кодирующих лакказы в транскриптоме *T. hirsuta*

Выравнивание аминокислотных последовательностей лакказ *T. hirsuta* показало, что все они содержат четыре характерных медь-связывающих мотива. Эти мотивы включают консервативные остатки десяти гистидинов и одного цистеина, локализованные в специфических для грибных лакказ консенсусных последовательностях L1-L4 и являющиеся лигандами для медь-связывающих центров T1 и T2/T3. Выравнивание последовательностей показало, что для LacC, LacD и LacE характерны замены некоторых аминокислотных остатков в консенсусных последовательностях L1-L4 (рис. 6). В зависимости от аминокислотного остатка, располагающегося на 10 аминокислот после консервативного цистеина в регионе L4, лакказы делят на три класса: класс 1 (содержащие метионин), класс 2 (содержащие лейцин) и класс 3 (содержащие фенилаланин). Было выдвинуто предположение (Xu et al.), что остаток Phe в данной позиции обуславливает высокие значения редокс-потенциала лакказ (свыше 710 мВ относительно стандартного водородного электрода), а остатки метионина и лейцина – средние и низкие значения. Из пяти лакказ *T. hirsuta* к классу 3 относятся LacA, LacB и LacE, в то время как LacC и LacD в соответствующей позиции содержат остаток лейцина, предполагая тем самым более низкие значения редокс-потенциала меди T1 для этих лакказ.

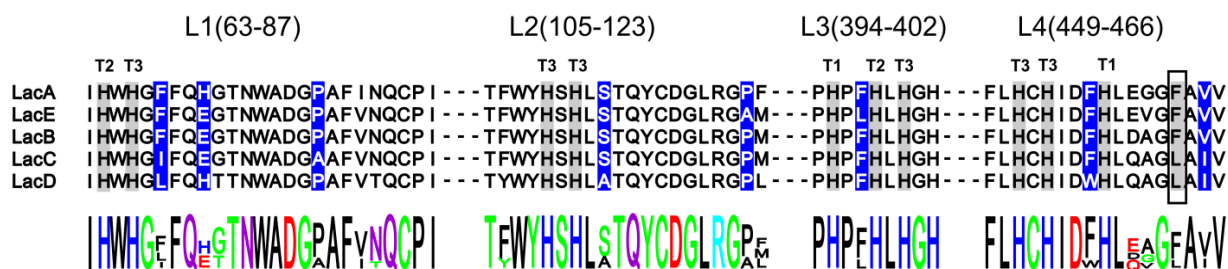


Рис. 6. Выравнивание консервативных мотивов L1-L4 лакказ *T. hirsuta*

Биоинформатический анализ последовательностей лакказ показал значительную изменчивость внутри семейства (идентичность варьировала от 58,9 до 72,1% – для нуклеотидных последовательностей и от 59,0 до 76,1% – для аминокислотных остатков). Для транслированных аминокислотных последовательностей генов *lacA-lacE* были предсказаны физико-химические свойства (табл. 5).

Табл. 5. *In silico* анализ последовательностей кДНК и предсказанных аминокислотных последовательностей лакказ *T. hirsuta*

Ген/ белок	кДН К(пн)	5'НТ О (пн)	3'НТ О (пн)	OR F (пн)	Предсказанная а/к последователь- ность			Потенци- альные сайты гликози- лирования	Номер в GenBank
					Дли- на	Mr	ИЭТ		
<i>lacA/LacA</i>	1811	63	170	1563	520	55,9	5,06	8	KP027478
<i>lacB/LacB</i>	1846	65	192	1563	520	56,2	6,21	6	KP027484
<i>lacC/LacC</i>	1858	80	197	1566	521	55,6	4,40	11	KP027479
<i>lacD/LacD</i>	1837	45	205	1572	523	57,6	5,72	10	KP027480
<i>lacE/LacE</i>	1742	68	99	1560	519	58,7	6,17	6	KP027481

Кластеризация генов семейства лакказ *T. hirsuta* и других грибов рода *Trametes*. Транслированные аминокислотные последовательности идентифицированных лакказ *T. hirsuta* сравнили с последовательностями лакказ из других грибов рода *Trametes*, представленными в базах данных. При этом использовали последовательности, идентичность которых лакказам LacA-LacE составляла не менее 70%. Как показал анализ, LacA *T. hirsuta* по аминокислотной последовательности была наиболее близка лакказам 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.

Данный анализ (рис. 7) позволил выделить 4 больших кластера среди лакказ рода *Trametes*: кластер 1 (LacA); кластер 2 (LacB); кластер 3 (LacC); кластер 4 (LacD). Лакказа LacE не входила ни в один из этих кластеров. По его результатам было установлено, что гетерогенность внутри лакказного семейства гриба *T. hirsuta* выше, чем гетерогенность между его членами и лакказами других представителей рода *Trametes*. Проведенный анализ подтверждает предположение о том, что, лакказы, составляющие мультигенные семейства грибов рода *Trametes*, обладают не только различными биохимическими и каталитическими свойствами, но и предположительно различными функциональными свойствами и дифференциальной регуляцией экспрессии.

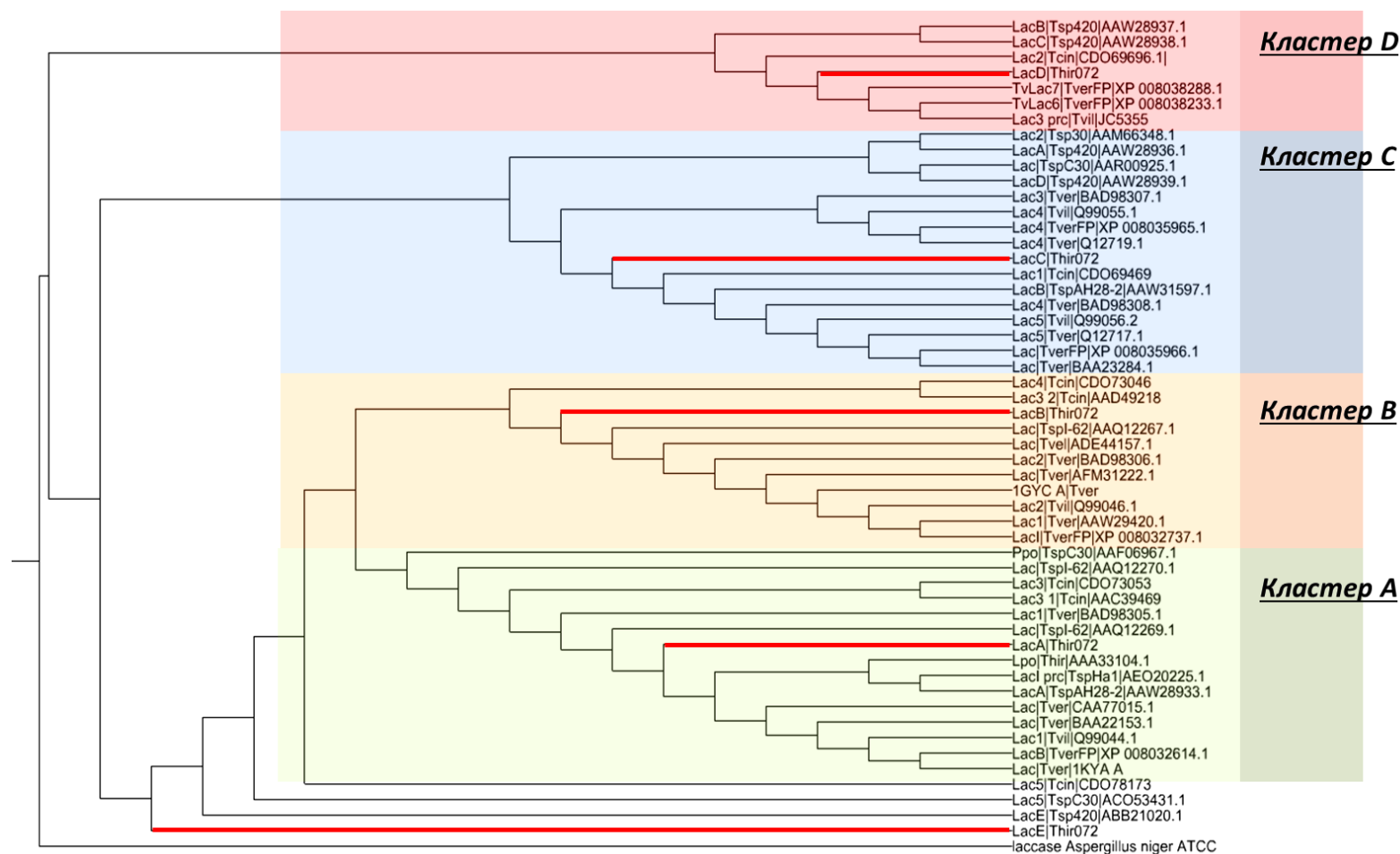


Рис. 7. Кластеризация аминокислотных последовательностей лакказ грибов рода *Trametes*. Краткие обозначения видов: Tsp420, *Trametes* sp. 420; Thir072, *T. hirsuta* 072, TverFP, *T. versicolor* FP-101664 SS1; Tvil, *T. villosa*; TspC30, *Trametes* sp. C30; Tver, *T. versicolor*; TspAH28-2, *Trametes* 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/>)

Влияние эффекторов на профили экспрессии генов лакказ *T. hirsuta*. Известно, что экспрессию и продукцию лакказ регулируют различные индукторы, такие как ионы металлов, ароматические соединения, структурно близкие лигнину или его производным, синтетические красители и разнообразные ксенобиотики. Для двухвалентных ионов меди показана универсальность индукции биосинтеза лакказ у различных базидиомицетов, как по уровню активности в среде культивирования, так и по уровню транскрипции.

С помощью анализа профилей экспрессии генов лакказ методом ПЦР в реальном времени для всех генов *T. hirsuta* была показана индукция уровня транскрипции ионами меди (рис. 8, 9). Для *lacA*, *lacB* и *lacC* увеличение экспрессии наблюдалось в ходе всего культивирования, для *lacD* и *lacE* – только в стационарной фазе роста, для которой наблюдался активный лизис культуры. Отмечено значительное влияние ионов меди на гены *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). Экспрессия *lacD* начиналась в основном на самых поздних этапах культивирования (после 8 суток). Динамика изменения экспрессии генов *lacB* и *lacC* не зависела от фазы роста гриба.

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. 8. Влияние условий культивирования на транскрипцию генов лакказ по сравнению с контрольной средой.

-  - Уровень транскрипции увеличивался;
 - Уровень транскрипции не изменялся;
 - Уровень транскрипции понижался.

Условные обозначения: 2 – фаза экспоненциального роста мицелия, 3 – стационарная фаза роста мицелия

В отличие от ионов меди, водорастворимый лигнин (среда ГП/AL) оказывал как индуцибельное, так и ингибирующее действие на экспрессию генов лакказ. Экспрессия *lacA* и *lacC* подавлялась водорастворимым лигнином, особенно в фазе стационарного роста базидиомицета. Ген *lacD* не изменял уровень экспрессии, зато заметно увеличивалась экспрессия *lacB* и *lacE* (до 70 раз). По-видимому, именно эти изоферменты лакказ *T. hirsuta* наиболее чувствительны к соединениям фенольной природы и/или продуктам деградации лигнина.

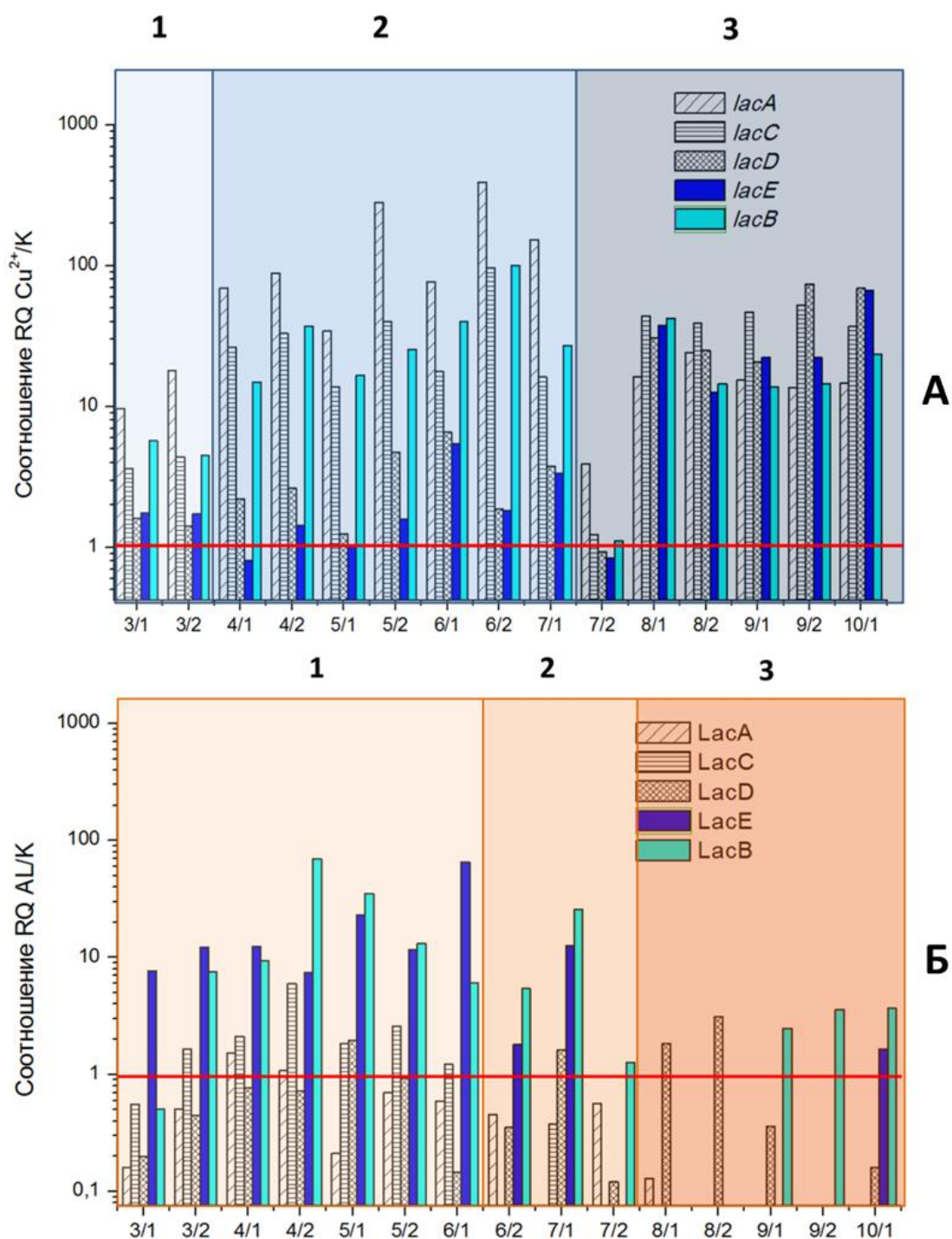


Рис. 9. Соотношение экспрессии лакказ *T. hirsuta* при индукции ионами Cu^{2+} (А) и водорастворимым лигнином (Б), логарифмическая шкала. Цифрами обозначены фазы роста базидиомицета: 1 – лаг-фаза, 2 – экспоненциальный рост, 3 – стационарная фаза роста. Красная линия – уровень экспрессии гена по отношению к контролю остается неизменным. 3/1 – 10/1 – время отбора образцов, сутки/время

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 довольно низким. При всех условиях культивирования белковые продукты всех генов семейства лакказ *T. hirsuta* в протеоме не были обнаружены.

Полученные данные позволяют заключить, что процессинг лакказ является сложным механизмом, регулируемым главным образом на уровне посттрансляционных модификаций, а не на уровне транскрипции и секреции. Установленные различия в профилях экспрессии генов, кодирующих лакказы *T. hirsuta*, представленности изоферментов в секретоме и их предсказанных биохимических свойствах подтверждают гипотезу о полифункциональности данного семейства ферментов: различные изоферменты играют различные физиологические роли в жизненном цикле гриба.

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 секретоме были обнаружены 2 изофермента (LacA и LacC) лакказ 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, способных 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 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 Sti1.
3. Установлено, что основное влияние на транскрипционном уровне ионы меди оказывают на процессы метаболизма углеводов (ЦТК, гликолиз/глюконеогенез, пентозофосфатный 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 депонированы (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. Vol. 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*. 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.

Материалы научных конференций, конгрессов и симпозиумов:

5. **Васина Д.В.**, Федорова Т.В., Королева О.В. Сравнительный анализ протеома и секретома базидиального гриба *Trametes hirsuta* при росте на средах разного состава // Сборник тезисов докладов V Российского симпозиума "Белки и пептиды", Петрозаводск, 2011, с. 271.
6. **Vasina D.V.**, Fedorova T.V., Koroleva O.V. Proteomic analysis of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* grown on different substrates // IV International Conference on

Environmental, Industrial and Applied Microbiology BioMicroworld2011, Torremolinos, Spain, 2011, Book of abstracts, p. 523.

7. **Васина Д.В.**, Федорова Т.В., Королева О.В. Анализ мультиферментного комплекса лигнолитического действия, синтезируемого базидиальным грибом *Trametes hirsuta* при росте на лигноцеллюлозном субстрате // Материалы международной школы-конференции молодых ученых, посвященной 80-летию Брянской государственной инженерно-технологической академии и профессору В.П. Тимофееву, 12-18 сентября 2011, Брянск, с. 75-77.
8. **Vasina D.V.**, Loginov D.S., Koroleva O.V. Study of laccase production and regulation in basidiomycetous fungi *Trametes hirsuta* // International Conference Oxizymes 2012, Marseille, France, 16-19 September 2012, Book of abstracts, p. 118.
9. **Васина Д.В.**, Логинов Д.С., Мустафаев О.Н., Королева О.В. Сравнительное исследование транскриптома базидиального гриба *Trametes hirsuta* // Материалы международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы». Минск, Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 8-11 Октября 2012, с. 27.
10. **Vasina D.**, Loginov D., Maloshenok L., Koroleva O. Intracellular laccase of basidiomycete *Trametes hirsuta* // 38th Congress of European Biochemical Societies (FEBS) 2013, St. Petersburg, Russia, FEBS Journal, Vol. 280, Special Issue: SI Supplement: 1, 6-11 July 2013, p. 124-125.
11. Koroleva O., **Vasina D.**, Mustafaev O., Goldenkova-Pavlova I. Comparative transcriptome and gene expression analysis of laccase biosynthesis in white-rot fungi *Trametes hirsuta*// 5th Congress of European Microbiological Societies (FEMS) 2013, Leipzig, Germany, 21-25 July 2013, Book of abstracts, PO02.
12. **Васина Д.В.**, Логинов Д.С., Мустафаев О.Н., Голденкова-Павлова И.В., Королева О.В. Выявление генов с дифференциальной экспрессией при индукции биосинтеза лакказы базидиального гриба *Trametes hirsuta*// Сборник тезисов докладов VII Московского международного конгресса "Биотехнология: состояние и перспективы развития" 2013, Москва, 19-22 марта 2013, с. 298-299.
13. Pavlov A.R., Maloshenok L.G., **Vasina D.V.**, Moiseenko K.V., Fedorova T.V., Bruskin S.A., Koroleva O.V. Resolving laccases of *Trametes hirsuta*: Next generation sequencing approaches // International Conference Oxizymes 2014, 1-4 July 2014, Vienna, Austria, Book of abstracts, P81, p. 139.
14. **Vasina D.V.**, Moiseenko K.V., Mosunova O.V., Tyazhelova T.V., Koroleva O.V. Expression analysis of laccase multigene family in *Trametes hirsuta* // 6th Congress of European Microbiological Societies (FEMS) 2015, 7-11 June 2015, Maastricht, The Netherlands, Program book, p. 146.