

2

Федеральное государственное учреждение
**«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»**

119071 Россия, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2. Тел.: (495) 954-5283; факс: (495) 954-2732; www.fbras.ru; e-mail: info@fbras.ru

15.10.2015 № 12304-2171-453

На № _____

УТВЕРЖДАЮ:



Директор
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»
чл.-корр. РАН
Попов В.О.
_____ 2015 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» на
диссертационную работу Васиной Д.В.
«Изучение организации мультигенного семейства лакказ базидиального гриба *Trametes
hirsuta* – эффективного деструктора лигнина»

Диссертационная работа «Изучение организации мультигенного семейства лакказ базидиального гриба *Trametes hirsuta* – эффективного деструктора лигнина» выполнена на базе лаборатории молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». В период подготовки диссертационной работы соискатель Васина Дарья Владимировна исполняла обязанности младшего научного сотрудника.

В июне 2010 г. Васина Д.В. окончила Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет пищевых производств» по специальности «Технология бродильных производств и виноделие», а в ноябре 2010 г. поступила в очную аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, где проходила обучение по ноябрь 2013 г. С ноября 2013 г. работала в Институте биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук в должности младшего научного сотрудника, и с июля 2015 г. продолжила работу в

Федеральном государственном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов выдано в ноябре 2013 г. в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук

Тема диссертационной работы утверждена на заседании Учёного совета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук (Протокол № 10 от 18 декабря 2014 г.).

Научный руководитель:

Королева Ольга Владимировна, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Подготовленная диссертационная работа Васиной Д.В. была представлена 13 октября 2015 года на совместном семинаре лабораторий молекулярных основ биотрансформаций, иммунобиохимии, инженерной энзимологии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Актуальность темы и направленность исследования.

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

Процесс деструкции лигнина и различных ксенобиотиков грибами белой гнили состоит из большого количества стадий и его эффективность определяется уникальной лигнолитической системой, в состав которой входят: лакказы и различные группы пероксидаз, в том числе марганец пероксидазы и лигнин пероксидазы, 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: во-первых, имеющиеся на настоящий момент информационные ресурсы в сочетании с экспериментальными данными, ускоряют исследование фундаментальных аспектов биологии базидиомицетов; во-вторых, позволяют осуществить поиск и последующее получение целевых ферментов и биологически активных соединений грибов для использования в промышленной биотехнологии, экологии и медицине. Сегодня благодаря интенсивному развитию биоинформационных ресурсов становится возможным детальный анализ транскриптомов, протеомов и секретомов высших грибов. На всех трёх уровнях изучаются как биохимические механизмы деградации различных типов древесины базидиомицетами, так и определяется спектр ферментов лигноцеллюлолитического комплекса, вовлеченных в эти процессы. Несмотря на выявленные общие закономерности процессов деструкции древесины, конкретный механизм определяется индивидуальными особенностями грибов, участвующих в данном процессе. Как показано, физиолого-биохимические свойства грибов обусловлены средой их обитания и составом мультиферментных комплексов, что, в свою очередь, связано с экологическими особенностями и трофической специализацией видов. В последние годы реализовано несколько проектов по изучению базидиомицета *Phanerochaete chrysosporium* – модельного организма, осуществляющего разложение древесины по типу белой гнили, в том числе проведены работы по полногеномному секвенированию *P. chrysosporium*, его протеомному и секретомному анализу, а так же исследования транскриптома при культивировании на различных модельных субстратах (например, целлюлозная масса и дуб). Кроме того, недавно были опубликованы данные полного секвенирования генома и данные секвенирования транскриптома при культивировании на среде, содержащей целлюлозу, для первого базидиомицета-возбудителя бурой гнили древесины *Postia placenta*, опубликованы геномы грибов белой гнили - *Auricularia delicata*, *Dichomitus squalens*, *Fomitiporia mediterranea*, *Punctularia strigosozonata*, *Stereum hirsutum*, *Trametes versicolor*, а так же недереворазлагающего сапротрофа *Coprinopsis cinerea* и базидиомицета-миккоризообразователя *Laccaria bicolor*. Для них так же ведутся активные транскрипционные исследования. Во всех исследованных геномах базидиомицетов обнаружены мультигенные семейства, кодирующие ферменты лигноцеллюлолитического комплекса грибов, при этом показана их дифференциальная экспрессия в зависимости от условий культивирования и состава ростовых сред.

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

Поскольку процесс разрушения лигноцеллюлозных субстратов грибами белой гнили является весьма сложным, что связано с широким кругом вовлеченных в него

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

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

Конкретное личное участие автора в получении научных результатов.

Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены либо автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и проведения эксперимента, обработку, оформление и публикацию результатов. Обсуждение, обобщение и интерпретация некоторых экспериментальных данных, формулировка основных положений диссертации, составляющих ее новизну и практическую значимость, формирование цели, задач, выводов и обсуждение результатов проводилось совместно с научным руководителем.

Степень достоверности результатов проведенных соискателем учёной степени исследований.

Выводы, представленные в работе, полностью подтверждены экспериментальными данными. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны.

Новизна и ценность результатов, полученных лично автором в ходе научного исследования.

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

В результате анализа секретомов гриба *T. hirsuta* охарактеризован ферментный состав лигнин модифицирующей системы 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 целлюбиазной и ксилоназной активностью, ферменты, секретлируемые *T. hirsuta*, проявляют в основном глюконазную и маннозидазную активности. Впервые показано, что базидиомицет *T. hirsuta* в ответ на внесение в среду культивирования лигноцеллюлозы секретлирует 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 St11. Выявлены потенциальные метаболические пути, связанные с биогенезом лакказ: впервые показаны изменения в экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболизма углеводов, метаболизма пуриновых и пиримидиновых оснований, а также дыхательной цепи базидиомицета *T. hirsuta*.

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

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

Практическая значимость диссертации и использование полученных результатов.

Выявленные закономерности регуляции экспрессии и продукции индивидуальных изоферментов лакказ могут служить основой для получения рекомбинантных ферментов с заданными свойствами под конкретные биотехнологических процессы. Установлено, что в отличие от уже описанных видов возбудителей белой гнили древесины, которые преимущественно экспрессируют ферменты с целлюбиазной 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*.

Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендуется к защите.

Представленная Васиной Дарьей Владимировной диссертационная работа посвящена исследованию организации мультигенного семейства лакказ базидиального гриба *Trametes hirsuta* – эффективного деструктора лигнина. Работа соответствует специальности 03.01.04 Биохимия, по которой рекомендуется к защите.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем учёной степени.

По теме диссертации опубликовано 4 статьи, отражающих основной объём диссертационной работы, в изданиях, удовлетворяющих требованиям п. 13 «Положения присуждении учёных степеней» утверждённого Правительством РФ от 24.09.2013 г. № 842, и перечню рецензируемых журналов ВАК РФ:

Список публикаций:

1. **Vasina D.V.**, Mustafaev O.N., Moiscenko 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, №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. 477-84.
4. **Васина Д.В.**, Логинов Д.С., Мустафаев О.Н., Голденкова-Павлова И.В., Королева О.В. Спектр генов-кандидатов, вовлеченных в биосинтез лакказы гриба *Trametes hirsuta* // *Генетика*. 2013. Т. 49, № 10, С. 1149–1154.

Результаты работы также были представлены на 9 международных и 1 всероссийской конференциях.

Считать диссертационную работу **Васиной Дарьи Владимировны** «Изучение организации мультигенного семейства лакказ базидиального гриба *Trametes hirsuta* – эффективного деструктора лигнина» законченным научно-квалификационным исследованием, которое соответствует критериям, изложенным в п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» утверждённом Правительством РФ от 24.09.2013г. № 842, и профилю диссертационного совета Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». Работа отвечает всем требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и может быть представлена к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Рекомендовать диссертационному совету Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» принять к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия диссертационную работу Васиной Дарьи Владимировны «Изучение организации мультигенного семейства лакказ базидиального гриба *Trametes hirsuta* – эффективного деструктора лигнина» (научный руководитель д.б.н. проф. Королева О.В.).

Заключение принято на совместном семинаре лабораторий молекулярных основ биотрансформаций, иммунобиохимии, инженерной энзимологии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» путём открытого голосования. Присутствовало на семинаре – 20 человек. Результаты голосования: «за» – 20 чел., «против» – нет, «воздержалось» – нет. Протокол №1 от «13» октября 2015 г.

Председатель
совместного семинара лабораторий
заведующий лабораторией иммунобиохимии
д.х.н., проф.




Дзантиев Б.Б./

Секретарь
совместного семинара лабораторий
главный специалист молекулярных основ
биотрансформаций


Ландесман Е.О./