

*На правах рукописи*

Моисеенко Константин Валерьевич

**ЛАККАЗЫ И ЛИГНИНОЛИТИЧЕСКИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ  
ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩЕГО ГРИБА *TRAMETES HIRSUTA*:  
ЭВОЛЮЦИЯ, ТРАНСКРИПЦИЯ, СЕКРЕЦИЯ И УЧАСТИЕ В  
ПРОЦЕССАХ БИОДЕСТРУКЦИИ**

Специальность 1.5.4. Биохимия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

МОСКВА 2023

Работа выполнена в лаборатории молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

**Научный руководитель:**

**Куликова Наталья Александровна**

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории агроэкологии кафедры общего земледелия и агроэкологии факультета почвоведения ФГОУ ВО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова"

**Официальные оппоненты:**

**Болотов Иван Николаевич**

доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н. П. Лаверова Уральского отделения Российской академии наук»

**Лавров Константин Валерьевич**

кандидат биологических наук, начальник лаборатории молекулярной биотехнологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

**Ведущая организация:**

Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской Академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН)

Защита состоится «19» октября 2023 г. в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д 24.1.233.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на сайте <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность.** Уникальный комплекс окислительных экзоферментов, секретируемый грибами, вызывающими белую гниль древесины, является крайне привлекательным с биотехнологической точки зрения объектом исследования, а важность этих грибов в различных земных экосистемах придает его изучению неоспоримое фундаментальное значение. Уникальность окислительных экзоферментов грибов белой гнили прежде всего проявляется в их способности катализировать разрушение разнообразных низкомолекулярных фенольных соединений и способствовать деполимеризации лигнина.

На данный момент низкомолекулярные фенольные соединения являются одной из основных групп чужеродных для живых организмов химических соединений (ксенобиотиков), попадающих в окружающую среду в результате хозяйственной деятельностью человека. Способность ферментных систем грибов белой гнили окислять широкий спектр ксенобиотиков, включая гербициды, пластификаторы и синтетические красители, дает им огромный потенциал для биоремедиации вод и почв. Однако, недостаточное понимание того, какие именно ферменты используются тем или иным грибом для разрушения различных ксенобиотиков существенно затрудняет продвижение в данном направлении.

Лигнин является вторым по распространенности (после целлюлозы) и первым по трудности деполимеризации среди всех известных биополимеров. В настоящее время одной из основных концепций получения продуктов с добавочной стоимостью из лигнина является его биотехнологическая валоризация через низкомолекулярные соединения, которые в дальнейшем могут быть использованы в микробиологическом синтезе. При этом для получения фрагментов лигнина, пригодных к включению в микробный метаболизм, предлагается использовать ферментные системы грибов белой гнили. Без понимания деталей функционирования данной лигнинолитической системы и установления продуктов разложения лигнина, получающихся в результате ее работы, упомянутая биотехнологическая концепция является неосуществимой.

Таким образом, исследование комплекса окислительных экзоферментов грибов белой гнили актуально как с теоретической, так и с практической точки зрения.

---

**Используемые сокращения:** LiP – лигнин пероксидаза/пероксидазы, MnP – марганец пероксидаза/пероксидазы, VP – версатил пероксидаза/пероксидазы, GP среда – глюкозопептонная среда, GP+Br среда – GP среда, содержащая бромкрезоловый зеленый, GP+KL среда – GP среда, содержащая крафт-лигнин.

**Степень разработанности темы исследования.** На данный момент основными окислительными экзоферментами грибов белой гнили считаются лакказы и лигнинолитические пероксидазы (далее просто пероксидазы): лигнин пероксидазы – LiP, марганец пероксидазы – MnP и версатил пероксидазы – VP. В отличие от пероксидаз, главная биологическая функция которых, по мнению большинства исследователей, – разрушение лигнина, в случае лакказ единого мнения относительно их основной биологической функции все еще не сложилось. Помимо лигнинолиза, наиболее часто предполагаемыми функциями лакказ являются их участие в симбиотических и патогенных взаимодействиях, развитии плодового тела гриба, пигментации мицелия и поддержании гомеостаза меди.

В геномах грибов белой гнили гены лакказ и пероксидаз практически всегда представлены множеством неаллельных копий, образующих мультигенные семейства внутри генома. Белковые продукты, получающиеся в результате трансляции с разных генов мультигенного семейства, в дальнейшем тексте будут называться «изоферменты», а продукты посттрансляционной модификации одного и того же изофермента – «изоформы». Таким образом, каждый гриб белой гнили потенциально может секретировать целый ряд изоферментов лакказ и пероксидаз, каждый из которых может быть представлен несколькими изоформами.

На сегодняшний день в научной литературе присутствует ряд существенных пробелов в исследовании упомянутых мультигенных семейств, а именно: 1) в то время как эволюция пероксидаз достаточно хорошо описана, вопросы эволюции лакказ фактически не освещены; 2) как для лакказ, так и для пероксидаз отсутствует научно обоснованная система классификации; 3) до сих пор не решен вопрос о соотношении вкладов лакказ и пероксидаз в процессы детоксификации ксенобиотиков и разрушения лигнина, а также о том, какие изоферменты лакказ и пероксидаз играют наиболее существенную роль в данных процессах; 4) отсутствует характеристика индивидуальных продуктов разрушения лигнина, образующихся под действием различных изоферментов лакказ и пероксидаз.

Получение достоверных данных по всем вышеперечисленным пунктам необходимо для решения ряда существенных теоретических и практических проблем. С теоретической точки зрения, получение этих данных необходимо для понимания роли как мультигенных семейств лакказ и пероксидаз, так и их отдельных изоферментов в жизнедеятельности грибов белой гнили. С практической точки зрения, без знания закономерностей функционирования и эволюционных связей генов лакказного и пероксидазного мультигенных семейств невозможно исследование природного разнообразия их изоферментов и

научно обоснованный выбор тех или иных изоферментов с желаемыми свойствами для последующего биотехнологического использования как индивидуально, так и в составе комплексных ферментных систем.

**Объект исследования.** В качестве модельного организма для исследования различных аспектов организации и функционирования мультигенных семейств лакказ и пероксидаз в данной работе был выбран типичный представитель грибов белой гнили – *Trametes hirsuta* (Polyporales, Basidiomycota). Грибы рода *Trametes* играют важную роль в лесных экосистемах по всему земному шару, и во многих лесных биотопах это самый встречаемый род. Более того, большинство биотехнологически значимых грибов белой гнили, исследованных и используемых на настоящий момент, также являются представителями рода *Trametes*.

**Цель и задачи.** Целью данной работы является исследование особенностей эволюционного формирования и участия в процессах биодеструкции лакказ и лигнинолитических пероксидаз гриба *T. hirsuta*. Для достижения цели работы были поставлены и решены следующие задачи:

1. Идентифицировать гены, входящие в состав мультигенных семейств лакказ и пероксидаз *T. hirsuta*.
2. Охарактеризовать особенности эволюционного формирования семейств генов лакказ и пероксидаз в грибах порядка Polyporales, установить эволюционно-связанные (ортологические) группы генов, включающие в себя гены лакказ и пероксидаз *T. hirsuta*.
3. Установить закономерности секреции изоферментов и транскрипции генов лакказ и пероксидаз *T. hirsuta* при культивировании на контрольной среде, а также средах, содержащих синтетический краситель и лигнин.
4. Установить закономерности изменения молекулярного состава лигнина под воздействием лигнинолитической системы *T. hirsuta*.

**Научная новизна.** В настоящей работе впервые проведен детальный эволюционный анализ формирования семейства генов лакказ и пероксидаз в грибах порядка Polyporales. Впервые предложена классификация изоферментов лакказ и пероксидаз на основе образуемых ими ортологических групп. Впервые для гриба белой гнили, культивируемого в присутствии синтетического красителя и лигнина, проведен анализ состава экзопротеома, а также измерение уровней транскрипции для всех генов лакказ и пероксидаз. Впервые проведен анализ состава продуктов деградации лигнина грибом белой гнили, и полученные данные сопоставлены с таковыми по составу экзопротеома.

**Теоретическая и практическая значимость.** Теоретическая значимость настоящего исследования заключается во всестороннем изучении мультигенных семейств лакказ и пероксидаз для типичного представителя грибов белой гнили –

*T. hirsuta*. Полученные результаты в дальнейшем позволят понять индивидуальную роль каждого изофермента как в процессе биодеградации ксенобиотиков грибами белой гнили, так и в процессе биотрансформации растительных и древесных субстратов этими грибами.

С практической точки зрения предложенная в данной работе классификация с использованием концепции ортологических групп формирует научную основу для направленного выбора определенных изоферментов лакказ и пероксидаз, обладающих желаемыми для целевых биотехнологических процессов свойствами. Также полученные в ходе работы данные о молекулярном составе продуктов окислительной деполимеризации лигнина, образующиеся под воздействием лигнинолитической системы *T. hirsuta*, позволяют в дальнейшем оптимизировать процессы его валоризации через низкомолекулярные соединения.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Геном *T. hirsuta* содержит множественные неаллельные копии генов лакказ (семь полнофункциональных генов и один непроцессированный псевдоген) и пероксидаз (семь – марганец пероксидаз, девять – лигнин пероксидаз и две – версатил пероксидазы);
2. Все гены лакказ *T. hirsuta* произошли в результате множественной дупликации предкового гена приблизительно во второй половине раннего Мелового периода, а основные события дупликации генов пероксидаз происходили либо значительно раньше, либо позже указанного времени;
3. Принадлежность лакказ и пероксидаз к той или иной ортологической группе может являться надежным критерием для их классификации с целью выявления как сходных, так и сильно отличающихся изоферментов.
4. Основной группой ферментов, используемых *T. hirsuta* при деградации лигнина, являются пероксидазы. В то время как лакказы, скорее всего, участвуют в детоксификации низкомолекулярных фенольных соединений.
5. При деградации лигнина *T. hirsuta* существенное влияние на состав продуктов деградации оказывает как последовательность секреции, так и соотношение количества секретируемых грибом изоферментов пероксидаз.

**Методология и методы исследования.** В работе использовались микробиологические, биохимические, физико-химические и молекулярно-биологические методы работы с базидиальными грибами. Ряд экспериментов проведен с использованием оригинальных подходов, разработанных в лаборатории, в которой выполнялись исследования. Биоинформатическую и статистическую обработку результатов осуществляли в соответствии с общепринятыми алгоритмами.

**Степень достоверности результатов.** Полученные в работе результаты полностью подтверждены экспериментальными данными – использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны; полученные экспериментальные закономерности статистически достоверны. Сформулированные в тексте диссертации научные положения и выводы полностью подтверждаются полученными результатами.

**Апробация работы.** Полученные результаты были представлены на следующих российских и международных научных конференциях: Международная научная конференция «Биотехнологии в химико-лесном комплексе» (г. Архангельск, Россия, 2014); Международная научно-практическая конференция «Dead Wood Meeting» (г. Ламми, Финляндия, 2015); 2-й Международный семинар по цифровой ПЦР (г. Санкт-Петербург, Россия, 2016); 38-й (г. Санкт-Петербург, Россия, 2013), 43-й (г. Прага, Чехия, 2018) и 45-й (г. Любляна, Словения, 2021) Международные конгрессы Федерации Европейских биохимических обществ – FEBS; 8-я международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (г. Ялта, Россия, 2020).

**Личный вклад диссертанта.** Экспериментальные данные, представленные в настоящей работе, получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование, выполнение экспериментов, обработку полученных данных, а также оформление и публикацию результатов.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 9 статей в международных рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень ВАК, и 6 тезисов докладов научных конференций.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация содержит следующие разделы: введение, литературный обзор, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, список литературы. Общий объем диссертации составляет 95 страниц, включая 4 таблицы и 25 рисунков. Список использованной литературы содержит 172 наименования.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Состав и эволюция мультигенных семейств лакказ и лигнинолитических пероксидаз

В результате проведенного биоинформатического анализа в геноме *T. hirsuta* было идентифицировано 7 генов, кодирующих лакказы, и 18 генов, кодирующих пероксидазы. Также в геноме был обнаружен один непротранскрибированный лакказный псевдоген. Было показано, что спектр пероксидазных генов включает в себя девять LiP, семь MnP и две VP. По

сравнению с лакказами, гены пероксидазного мультигенного семейства отличаются большей степенью идентичности белок-кодирующих последовательностей, большей вариабельностью экзон-интронной структуры и большей склонностью к образованию кластеров на хромосомах. Как для пероксидаз, так и для лакказ была предсказана принципиальная возможность секретиции нескольких изоформ, отличающихся гликозилированием. В целом для лакказ было предсказано значительно больше потенциальных сайтов гликозилирования, нежели для пероксидаз.

Результаты исследования эволюционных аспектов формирования семейств генов лакказ и пероксидаз в грибах порядка Polyporales представлены в виде согласования эволюционных деревьев генов (листья которых представляют современные гены лакказ или пероксидаз) с деревом видов (листья которого представляют современные виды грибов) на **Рисунке 1** и **Рисунке 2**. Согласование деревьев показало, что все гены лакказ *T. hirsuta* (как и других грибов Базовой полипороидной клады) произошли от одного предкового гена, множественная дупликация которого может быть приблизительно отнесена ко второй половине раннего Мелового периода, после чего потери и дупликации генов лакказ были относительно редкими событиями. В случае же пероксидаз, проведенный анализ показал, что до момента начала разделения порядка Polyporales на его четыре основные клады в позднем Юрском периоде в предковой популяции грибов уже присутствовало шесть копий генов MnP и две копии генов VP. После начала разделения порядка Polyporales на его четыре основные клады и до окончательного их оформления в позднем Меловом периоде практически на каждой ветви дерева видов наблюдалось от двух до шести потерь генов. Исключение составляла лишь ветвь, располагающаяся между отделением Базовой полипороидной клады в раннем Меловом периоде и началом ее дальнейшего разделения в позднем Меловом периоде, на которой было зафиксировано три дупликации гена. После окончательного оформления всех четырех основных клад порядка Polyporales потери генов были редкими событиями, по сравнению с обширными параллельными дупликациями.

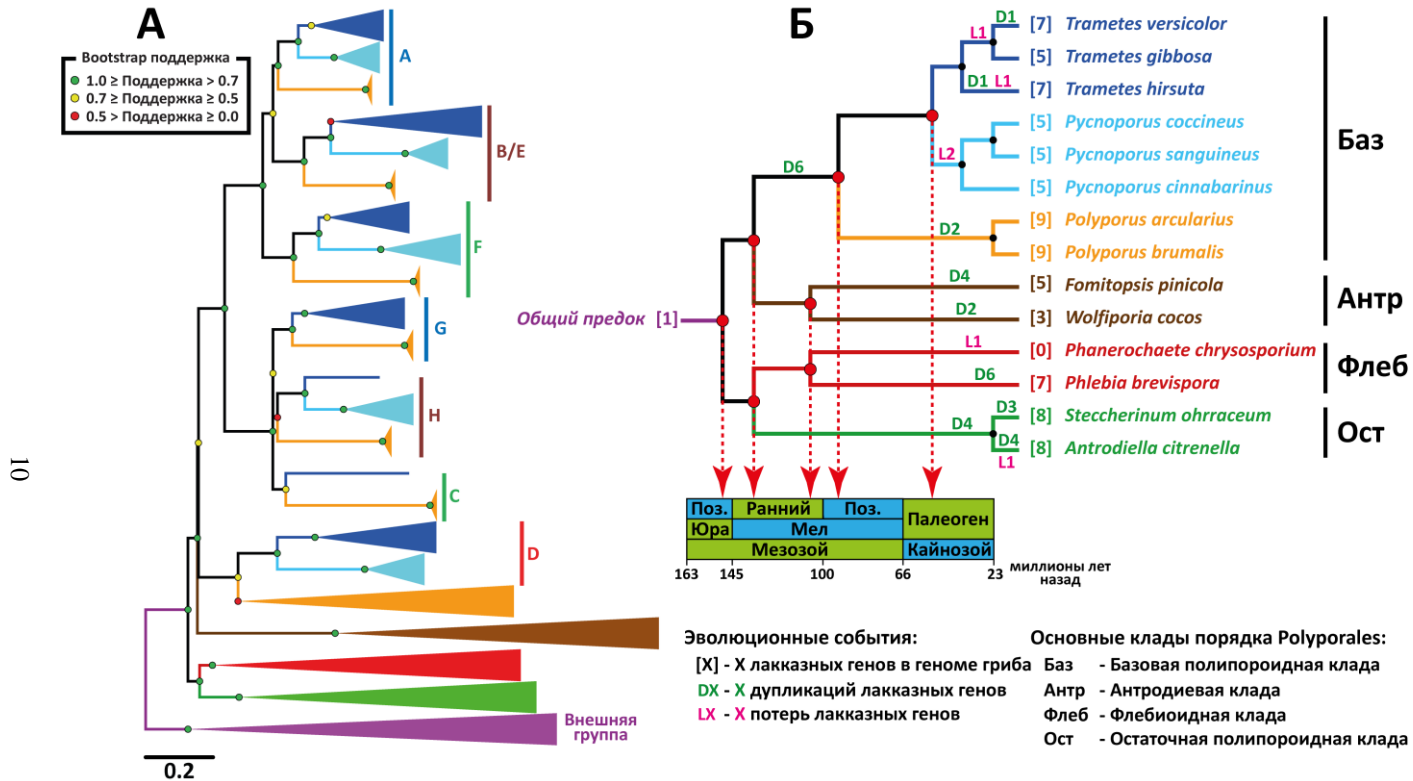
Стоит отметить, что вторая половина раннего Мелового периода является временем начала расцвета покрытосеменных растений, приведшего в конечном итоге к их преобладанию над голосеменными в конце Мелового периода. Несмотря на то, что покрытосеменные растения предоставляли новую мега-нишу для дереворазрушающих грибов, особенности состава их древесины существенно затрудняли освоение этой ниши. В отличие от голосеменных, лигнин которых в основном состоит из гваяцильных структурных единиц, лигнин покрытосеменных является сополимером как гваяцильных, так и сирингильных единиц. Новый тип лигнина был не только более устойчивым к деградации, но и



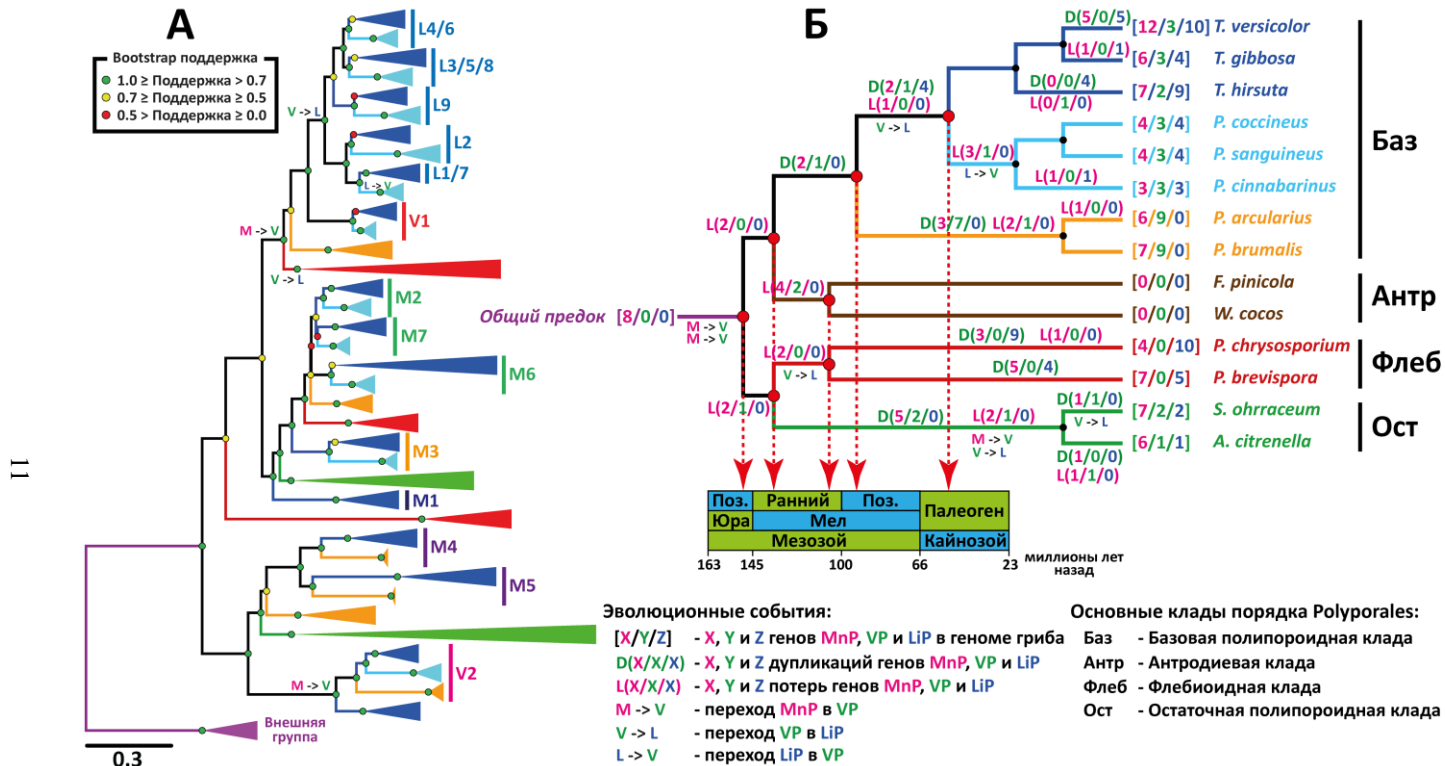
его деградация приводила к большему разнообразию фенольных продуктов, которые было необходимо детоксифицировать. Хотя дереворазрушающие грибы того времени уже имели несколько копий генов пероксидаз в своих геномах, по-видимому, этого было недостаточно для быстрого, эффективного и конкурентного освоения новообразованной экологической ниши.

Эволюционное предпочтение грибами белой гнили лакказ пероксидазам для развития своего лигнинолитического комплекса в Меловом периоде, вероятно, связано с конкуренцией между этими грибами и появившимся новым типом дереворазрушающих грибов – грибами бурой гнили. Одним из ключевых этапов в механизме разрушения древесины по типу бурой гнили является повышение грибом концентрации перекиси в окружающей среде, что потенциально могло инактивировать пероксидазы грибов белой гнили. В то же время грибные лакказы перекисью не ингибируются. Дополнительными факторами, влиявшим на предпочтение грибами белой гнили Cu-содержащих лакказ Fe-содержащим пероксидазам, также могли являться уменьшение биодоступности для них железа ввиду его хелатирования оксалатом, выделяемым грибами бурой гнили, и происходивший в то время локальный пик парциального давления кислорода. Увеличение содержания кислорода в атмосфере планеты приводило к изменению соотношения соединений железа с различными степенями окисления в сторону увеличения соединений железа  $Fe^{3+}$  и, в частности, плохо растворимого в воде аморфного полигидрата железа ( $Fe_2O_3 \cdot nH_2O$ ). В то же время биодоступность меди возрастала ввиду образования хорошо растворимых и менее токсичных по сравнению с  $Cu^+$  соединений  $Cu^{2+}$ .

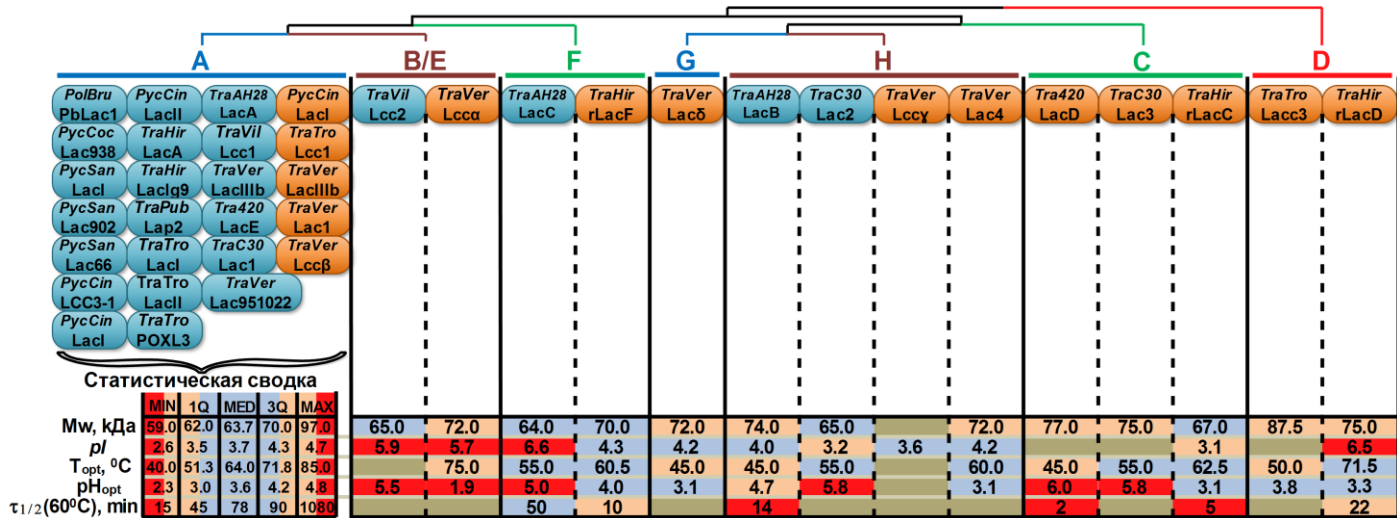
Полученные в результате согласования деревьев данные о событиях дупликаций и потерь генов лакказ и пероксидаз позволили установить эволюционно связанные (ортологические) группы генов, включающие в себя гены лакказ и пероксидаз *T. hirsuta* (**Рисунок 1** и **Рисунок 2**). Позиционирование изоферментов лакказ и лигнолитических пероксидаз с ранее описанными в литературе свойствами в выделенные на основе сконструированных филогенетических деревьев ортологические группы (**Рисунок 3**) выявило существенный пробел в современных знаниях о физико-химических и каталитических свойствах данных ферментов. Практически все белки лакказ, которые были описаны в литературе до сих пор, принадлежат к группе А (включающей изофермент LacA *T. hirsuta*). В то время как информация о лакказах из других групп крайне ограничена. В случае пероксидаз, отсутствие в большинстве статей первичных последовательностей не позволяет точно определить, свойства какого изофермента (из какой ортологической группы) фактически исследовались.



**Рисунок 1.** Результаты согласования дерева генов лакказ (А) с деревом видов грибов порядка Polyporales (Б). Исходя из установленных событий дупликаций и потерь лакказных генов (отмеченных на дереве видов) на дереве генов были выделены ортологические группы генов, содержащие лакказы *T. hirsuta*. Ортологические группы были названы исходя из названия, входящего в них лакказного гена *T. hirsuta*.



**Рисунок 2.** Результаты согласования дерева генов пероксидаз (А) с деревом видов грибов порядка Polyporales (Б). Исходя из установленных событий дупликаций и потерь пероксидазных генов (отмеченных на дереве видов) на дереве генов были выделены ортологические группы генов, содержащие пероксидазы *T. hirsuta*. Ортологические группы были названы исходя из названия, входящих в них пероксидазных генов *T. hirsuta*.

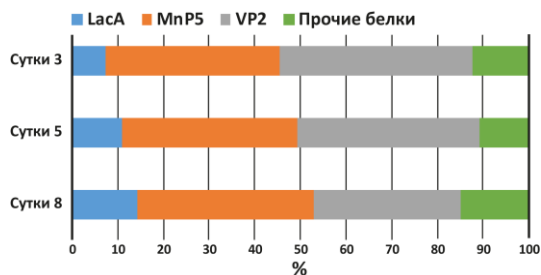


**Рисунок 3.** Результаты классификации изоферментов лакказ с ранее охарактеризованными свойствами на основе ортологии. Филогенетические отношения между различными ортологическими группами представлены дендрограммой. Синие овалы представляют изоферменты лакказ полученные нативно, а оранжевые – рекомбинантно. Обобщение физико-химических свойств изоферментов представлено в виде статистической сводки, где MIN, 1Q, MED, 3Q и MAX – минимум, первый квартиль, медиана, третий квартиль и максимум, соответственно.

## Секреция и транскрипция лакказ и лигнинолитических пероксидаз при культивировании на контрольной среде

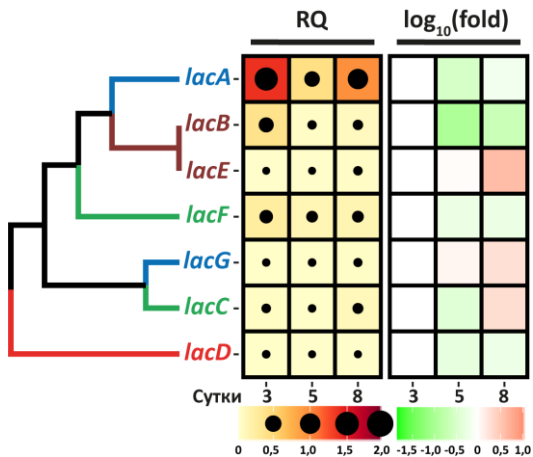
Для исследования секреции и транскрипции лакказ и пероксидаз *T. hirsuta* культивировали на глюкозо-пептонной (GP) среде. Отбор культуральной жидкости и грибного мицелия осуществляли на 3, 5 и 8 сутки культивирования, соответствовавшие началу логарифмической, середине логарифмической и началу стационарной фаз роста гриба. Белки экзопротеома, выделенные из культуральной жидкости, подвергались трипсинолизу и анализировались с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектированием тандемной масс-спектрометрией ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье с ионизацией электрораспылением в режиме положительных ионов (англ. HPLC-(+)ESI FT-ICR MS/MS). Уровни транскрипции генов лакказ измерялись методом количественной полимеразно-цепной реакции с обратной транскрипцией (англ. RT-qPCR), а уровни транскрипции генов пероксидаз, ввиду высокой степени их попарной идентичности, измерялись методом капельной цифровой полимеразно-цепной реакции с обратной транскрипцией (англ. RT-ddPCR).

При росте *T. hirsuta* на контрольной GP среде основными секретируемыми белками являлись один изофермент лакказы – LacA, и два изофермента лигнинолитических пероксидаз – MnP5 и VP2 (**Рисунок 4**). При этом соотношение вкладов этих изоферментов в экзопротеом практически не изменялось в процессе культивирования.



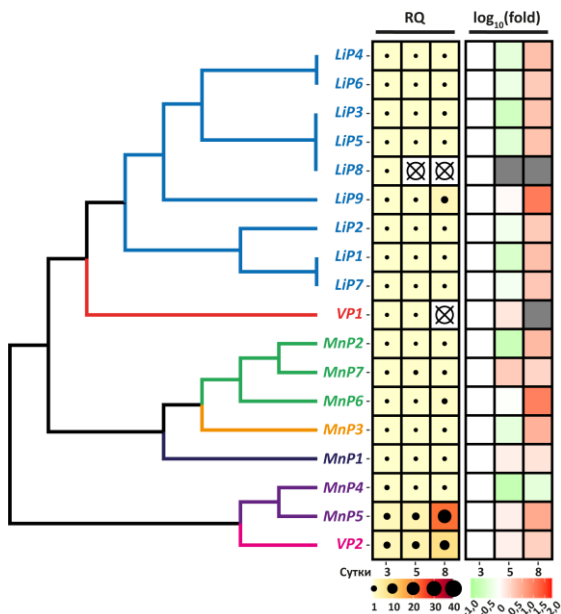
**Рисунок 4.** Изменение относительного содержания белков в экзопротеоме *T. hirsuta* при культивировании на контрольной GP среде. Прочие белки – все белки, кроме лакказ и пероксидаз.

Для лакказ на всех сутках культивирования была отмечена транскрипция всех семи генов мультигенного семейства (**Рисунок 5**). При этом в течение всего культивирования преобладающим по уровню транскрипции геном являлся *lacA* – уровень его транскрипции был примерно на 1-2 порядка (в 10-100 раз) выше, чем у остальных генов.



**Рисунок 5.** Изменение уровня транскрипции генов лакказ *T. hirsuta* при культивировании на контрольной GP среде. RQ – уровень транскрипции относительно генов внутреннего контроля (*β-tubulin* и *rpb2*); fold – кратность изменения транскрипции относительно таковой на 3 сутки культивирования.

Для пероксидаз на всех сутках культивирования была отмечена транскрипция почти всех генов пероксидаз, исключение составляли *LiP8* и *VP1* (Рисунок 6). Транскрипция *LiP8* не обнаруживалась на 5 и 8 сутки культивирования, а *VP1* – на 8 сутки. В течение всего культивирования преобладающими по уровню транскрипции генами являлись *MnP5* и *VP2* – уровень их транскрипции был примерно на 2-3 порядка (в 100-1000 раз) выше, чем у остальных генов.



**Рисунок 6.** Изменение уровня транскрипции генов лакказ *T. hirsuta* при культивировании на контрольной GP среде. RQ – уровень транскрипции относительно гена внутреннего контроля (*β-tubulin*); fold – кратность изменения транскрипции относительно таковой на 3 сутки культивирования.

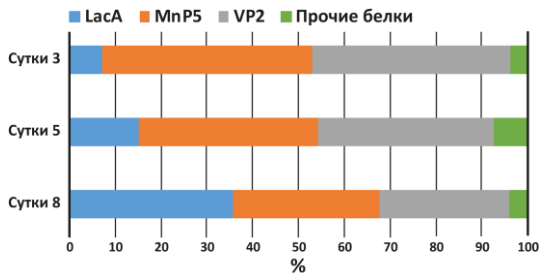
Видимое отсутствие в экзопротеоме шести из семи кодируемых в геноме изоферментов лакказ и 16 из 18 изоферментов пероксидаз (**Рисунок 4**), несмотря на ненулевые уровни транскрипции практически всех кодируемых в геноме изоферментов (**Рисунок 5** и **Рисунок 6**), может объясняться их малой представленностью и невысокой стабильностью, что крайне затрудняет их детекцию. Действительно, ранее было установлено, что стабильность двух рекомбинантно полученных изоферментов лакказ *T. hirsuta* (rLacC и rLacD) существенно ниже таковой для LacA (**Рисунок 3**). Также стоит отметить, что для ряда эволюционно близких *T. hirsuta* дереворазрушающих грибов прежде было показано отсутствие корреляции между транскрипцией и секрецией экзоферментов, что позволило предположить наличие дополнительных уровней их посттранскрипционной регуляции. Например, для трех представителей рода *Ruynoporus* (*P. coccineus*, *P. sanguineus* и *P. cinnabarinus*) только 50 % всех секретируемых ферментов, для которых была показана транскрипция, обнаруживались в экзопротеомах.

Интересным является тот факт, что конститутивно экспрессируемый на контрольной GP среде (в отсутствие каких бы то ни было индукторов) лакказный ген *LacA*, принадлежит к одной из наиболее поздно отделившихся ортологических групп – группа **A** (**Рисунок 1**), в то время как оба конститутивно экспрессируемых пероксидазных гена *MnP5* и *VP2* принадлежат к самым эволюционно рано отделившимся ортологическим группам – группы **M5** и **V2** (**Рисунок 2**).

### **Секреция и транскрипция лакказ и лигнинолитических пероксидаз при культивировании в присутствии синтетического красителя**

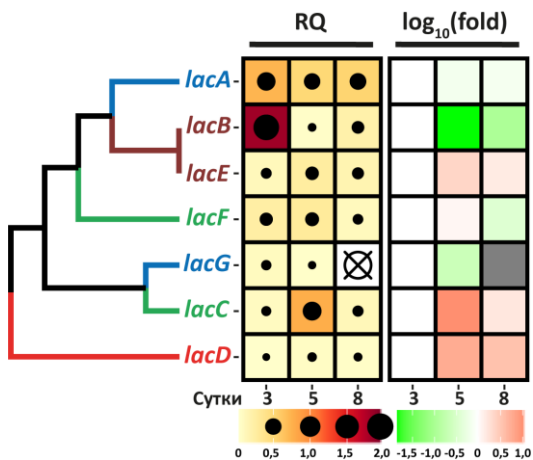
Для исследования участия лакказ и пероксидаз *T. hirsuta* в процессе деградации ксенобиотиков, в качестве модельного соединения был выбран синтетический сульфонфталеиновый краситель бромкрезоловый зеленый. Исследование секреции и транскрипции лакказ и пероксидаз при культивировании *T. hirsuta* на GP среде, содержащей бромкрезоловый зеленый (GP+Br), осуществлялось аналогично таковому для контрольной GP среды.

При росте *T. hirsuta* на GP+Br среде так же, как и на контрольной GP среде, основными секретируемыми белками являлись один изофермент лакказы – LacA, и два изофермента лигнинолитических пероксидаз – MnP5 и VP2 (**Рисунок 7**). Однако если на GP среде на всех сутках культивирования относительные количества каждого изофермента в экзопротеом оставались практически постоянными, то в процессе культивирования на GP+Br среде наблюдалось существенное увеличение вклада LacA (с увеличением числа изоформ) с одновременным уменьшением вкладов MnP5 и VP2.



**Рисунок 7.** Изменение относительного содержания белков в экзопротеоме *T. hirsuta* при культивировании на GP+Br среде. Прочие белки – все белки, кроме лакказ и пероксидаз.

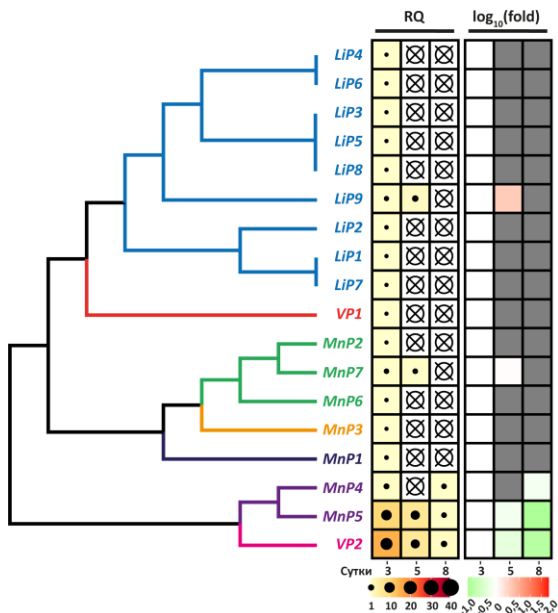
Уровни транскрипции генов лакказ на GP+Br среде в целом были сопоставимы или выше таковых на контрольной GP среде (**Рисунок 8**). Исключение составляли *lacB* и *lacC*, существенная индукция которых наблюдалась на 3 и 5 сутки культивирования соответственно. Как и в случае с контрольной GP средой, видимое отсутствие в экзопротеоме LacB и LacC, несмотря на индукцию их транскрипции, скорее всего, объясняется малой представленностью и низкой стабильностью данных изоферментов.



**Рисунок 8.** Изменение уровня транскрипции генов лакказ *T. hirsuta* при культивировании на контрольной GP+Br среде. RQ – уровень транскрипции относительно генов внутреннего контроля (*β-tubulin* и *rpb2*); fold – кратность изменения транскрипции относительно таковой на 3 сутки культивирования.

Транскрипция генов пероксидаз на GP+Br среде была сильно подавлена: из 18 присутствующих в геноме *T. hirsuta* генов пероксидаз для 13 генов транскрипция полностью отсутствовала уже на 5 сутки культивирования; транскрипция остальных генов либо полностью прекращалась на 8 сутки, либо была незначительной (**Рисунок 9**).





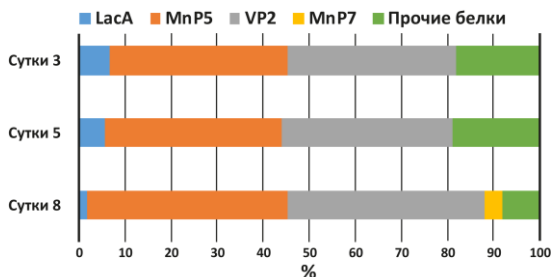
**Рисунок 9.** Изменение уровня транскрипции генов лакказ *T. hirsuta* при культивировании на контрольной GP+Br среде. RQ – уровень транскрипции относительно гена внутреннего контроля (*β-tubulin*); fold – кратность изменения транскрипции относительно таковой на 3 сутки культивирования.

Описанные выше закономерности позволяют заключить, что, по крайней мере для *T. hirsuta*, основными экзоферментами, участвующими в деградации сульфонфтаleineвого красителя бромкрезолового зеленого, являются лакказы. Наблюдаемая для *T. hirsuta* секреция большего (по сравнению с контрольной GP средой) числа изоформ LacA на GP+Br среде, а также потенциальная кратковременная продукция LacB и LacC, вероятно, связаны с образованием различных по структуре продуктов окислительной деградации бромкрезолового зеленого, для эффективной детоксификации которых требуется набор экзоферментов со слегка отличными каталитическими параметрами.

### Секреция и транскрипция лакказ и лигнинолитических пероксидаз при культивировании в присутствии лигнина

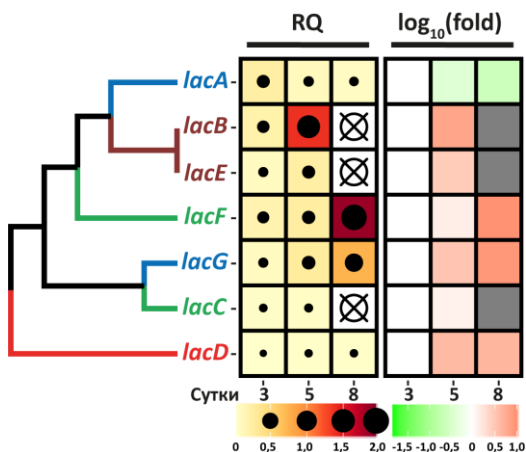
Для исследования участия лакказ и пероксидаз *T. hirsuta* в процессе деградации лигнина, в качестве препарата лигнина был выбран крафт-лигнин (CAS 8068-05-1, Sigma-Aldrich, США), полученный в результате сульфатного процесса щелочной делигнификации древесины. Исследование секреции и транскрипции лакказ и пероксидаз при культивировании *T. hirsuta* на GP среде, содержащей крафт-лигнин (GP+KL), осуществлялось аналогично таковому для контрольной GP среды.

Проведённое экзопротеомное исследование (**Рисунок 10**) показало, что основными секретируемыми белками при росте *T. hirsuta* на GP+KL среде являлись один изофермент лакказы – LacA, и три изофермента лигнинолитических пероксидаз – MnP5, VP2 и MnP7. При этом существенный уровень секреции LacA наблюдалась только на 3 и 5 сутки культивирования, после чего секреция практически исчезала. Секреция MnP5 и VP2 наблюдалась на всех сутках культивирования, а секреция MnP7 – только на восьмых.



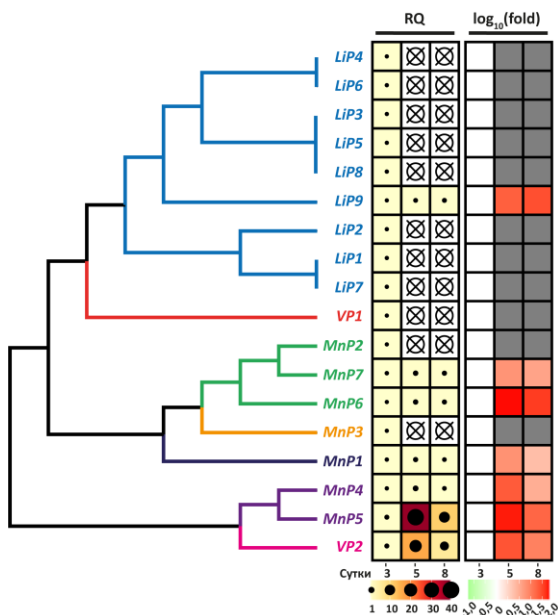
**Рисунок 10.** Изменение относительного содержания белков в экзопротеоме *T. hirsuta* при культивировании на GP+KL среде. Прочие белки – все белки, кроме лакказ и пероксидаз.

Уровни транскрипции генов лакказ на GP+KL среде (**Рисунок 11**) в целом были сопоставимы с таковыми на контрольной GP среде. Исключение составляли *lacB*, существенная индукция которой наблюдалась на 3 сутки культивирования, а также *lacF* и *lacG*, существенная индукция которых наблюдалась на 5 сутки. Особенно стоит подчеркнуть существенное подавление транскрипции *lacA* на всех сутках культивирования.



**Рисунок 11.** Изменение уровня транскрипции генов лакказ *T. hirsuta* при культивировании на контрольной GP+KL среде. RQ – уровень транскрипции относительно генов внутреннего контроля (*β-tubulin* и *rpb2*); fold – кратность изменения транскрипции относительно таковой на 3 сутки культивирования.

Транскрипция 11 из 18 кодируемых в геноме пероксидаз отсутствовала после 3 суток культивирования (**Рисунок 12**). Для остальных пероксидаз (в особенности *MnP5* и *VP2*) на 5 сутки наблюдалась существенная индукция.



**Рисунок 12.** Изменение уровня транскрипции генов лакказ *T. hirsuta* при культивировании на контрольной GP+KL среде. RQ – уровень транскрипции относительно гена внутреннего контроля ( $\beta$ -tubulin); fold – кратность изменения транскрипции относительно таковой на 3 сутки культивирования.

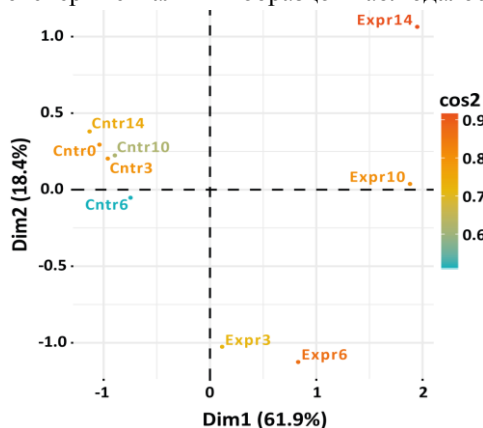
Описанные выше закономерности позволяют заключить, что, по крайней мере для *T. hirsuta*, основными экзоферментами, участвующими в деградации крафт-лигнина являются MnP и VP. Появление на 8 сутки культивирования MnP7, секреция которой до этого не наблюдалась ни на GP ни на GP+Br средах (в отличие от MnP5 и VP2), может свидетельствовать о накоплении ряда продуктов окислительной деполимеризации лигнина, для дальнейшего окисления которых потребовался новый изофермент MnP.

### Изменение молекулярного состава лигнина под действием лигнинолитической системы *T. hirsuta*

Для исследования процесса биотрансформации лигнина ферментной системой *T. hirsuta*, гриб культивировали на GP среде, содержащей крафт-лигнин (GP+KL). Поскольку предыдущий эксперимент показал появление новой пероксидазы на поздние сутки, в данном эксперименте время культивирования было увеличено. Образцы лигнина и культуральной жидкости отбирались на 3, 6, 10 и 14 сутки. Определение брутто-формул входящих в состав лигнина молекул проводилось с помощью масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье с ионизацией электрораспылением в режиме отрицательных ионов (англ. (-)ESI FT-ICR MS). Исследование секреции лакказ и пероксидаз осуществлялось по той же методике, что и в предыдущих разделах.

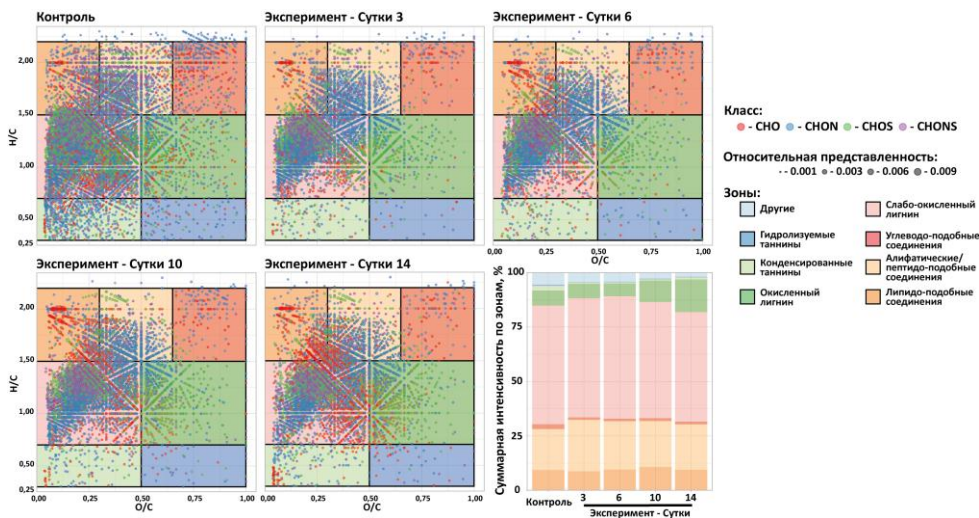
После присвоения брутто-формул во всех образцах было идентифицировано 17 364 уникальных соединений. Проведенный на основании

суммарной интенсивности пиков соединений в масс-спектрах анализ методом главных компонент показал (**Рисунок 13**), что все контрольные образцы образовывали одну гомогенную группу, при этом разделение контрольных и экспериментальных образцов наблюдалось в основном по первой компоненте.



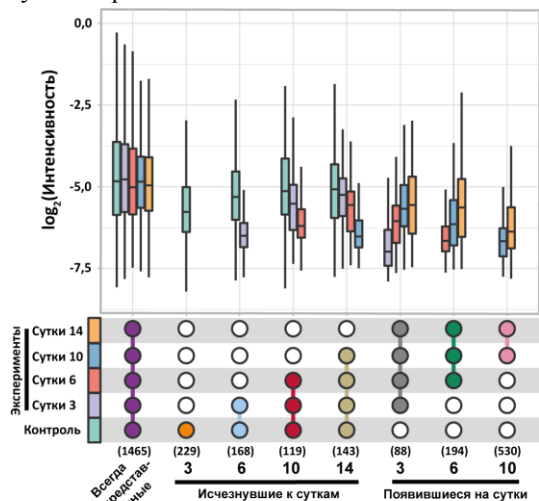
**Рисунок 13.** Результат анализа главных компонент для определенных (-)ESI FT-ICR MS соединений. Контрольные образцы, отобранные на X сутки, обозначены как CntrX; экспериментальные образцы, отобранные на X сутки, обозначены как ExprX.

Как видно из представленных диаграмм ван Кревелена (**Рисунок 14**), в процессе культивирования основные изменения происходили в областях слабо-окисленного и окисленного лигнина. Суммарная интенсивность соединений из области слабо-окисленного лигнина снижалась с 55 % в контроле до 50 % на 14 сутки, тогда как суммарная интенсивность соединений из области окисленного лигнина увеличивалась с 7 % в контроле до 15 % на 14 сутки.



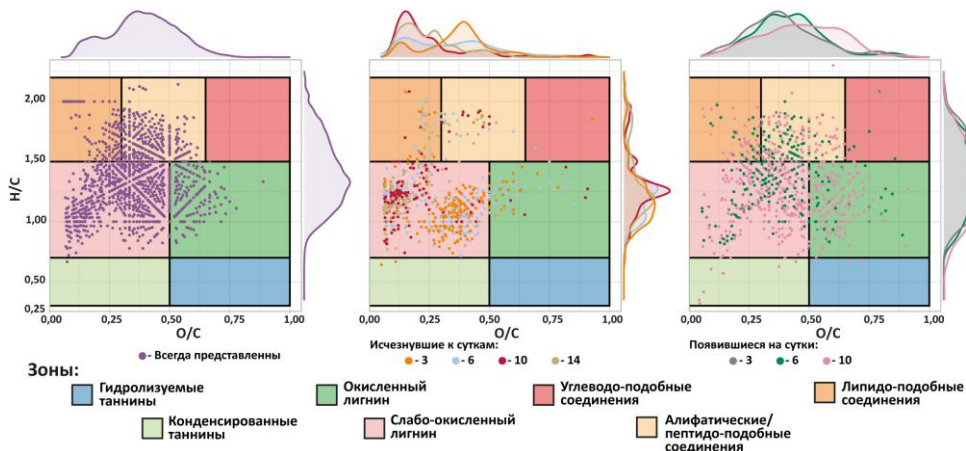
**Рисунок 14.** Диаграммы ван Кревелена и сводный график для всех соединений, определенных с помощью (-)ESI FT-ICR MS. Данные для контрольных образцов усреднялись.

Для более детального исследования закономерностей биотрансформации крафт-лигнина *T. hirsuta* было выделено несколько специфических групп соединений, связанных с изменениями в составе лигнина (**Рисунок 15**): 1) группа **всегда представленных** соединений содержала формулы, которые присутствовали в течение всего процесса культивирования; 2) четыре группы **исчезнувших к определенным суткам** соединений содержали формулы, которые присутствовали до 3, 6, 10 или 14 суток культивирования и отсутствовали в дальнейшем; 3) четыре группы **появившихся на определенные сутки** соединений содержали формулы, которые появлялись после 3, 6, 10 или 14 суток культивирования и присутствовали в дальнейшем до окончания культивирования.



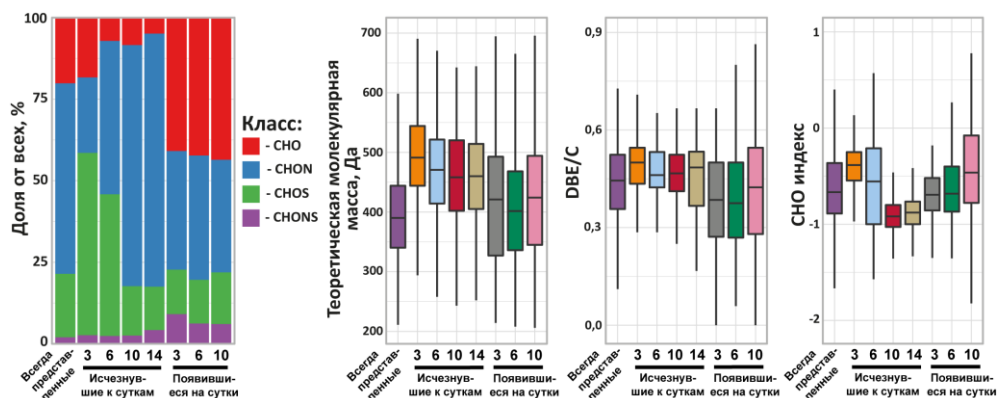
**Рисунок 15.** Диаграмма взаимоотношения подмножеств групп соединений, «UpSet plot» с распределением интенсивностей, входящих в них соединений. Данные для всех контрольных образцов объединены.

Как видно на диаграммах ван Кревелена (**Рисунок 16**), **всегда представленные** соединения преимущественно располагаются в областях слабо-окисленного лигнина и алифатических/пептидоподобных соединений, и в меньшей степени – в областях окисленного лигнина и липидоподобных соединений. **Исчезнувшие к определенным суткам** соединения преимущественно занимают область слабо-окисленного лигнина, а их распределение смещается в сторону более низких значений О/С в процессе культивирования. Следует особо отметить, что наиболее резкий сдвиг в распределении **исчезнувших к определенным суткам** соединений произошел между 6 и 10 сутками культивирования. **Появившиеся на определенные сутки** соединения преимущественно занимают области слабо-окисленного и окисленного лигнина, а также алифатических/пептидоподобных соединений. При этом в процессе культивирования наблюдается систематический сдвиг из области слабо-окисленного к области окисленного лигнина.



**Рисунок 16.** Диаграммы ван Кревелена для различных групп формул определенных с помощью (-)ESI FT-ICR MS.

Для каждой из выделенных групп соединений данные о пропорции основных классов молекул, распределении молекулярных масс, количестве эквивалентов двойных связей (DBE/C) и индексе биоразлагаемости (СНО-индекс), который можно рассматривать как среднюю степень окисления атомов углерода в молекуле, представлены на **Рисунке 17**.

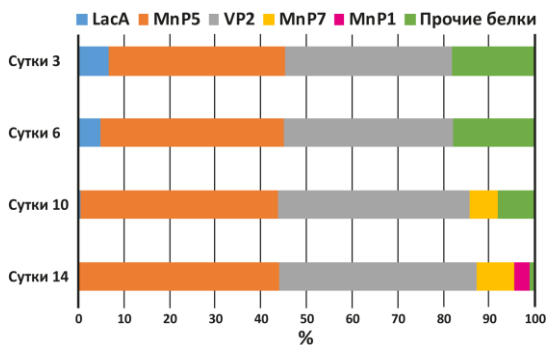


**Рисунок 17.** Сводные характеристики для различных групп соединений определенных с помощью (-)ESI FT-ICR MS.

Полученные данные показали, что при росте *T. hirsuta* на лигнинсодержащей среде состав соединений, которые модифицировались секретирруемыми грибом ферментами, значительно изменялся между 6 и 10

сутками культивирования. Вплоть до 6 суток грибные ферменты систематически модифицировали соединения, характеризующиеся СНО-индексом около -0,5, и значительная часть этих соединений содержала серу (предположительно в форме тиоловой группы). Напротив, с 10 суток культивирования грибные ферменты систематически модифицировали соединения, характеризующиеся СНО-индексом близким к -1, и значительная часть этих соединений содержала азот.

Результаты проведённого экзопотеомного исследования (**Рисунок 18**) в целом совпадали с описанными в предыдущем разделе, однако увеличенное время культивирования и большее число точек отбора проб позволили более детально оценить закономерности секреции пероксидаз. Профиль секреции пероксидаз во время культивирования гриба изменялся каскадно – новые изоферменты добавлялись к смеси уже секретируемых, при этом относительное количество каждого секретируемого изофермента увеличивалось в течение культивирования.



**Рисунок 18.** Изменение относительного содержания белков в экзопотеоме *T. hirsuta* при культивировании на GP+KL среде. Прочие белки – все белки, кроме лакказ и пероксидаз.

Только для двух пероксидаз, VP2 и MnP1, было возможно установить ортологи с ранее охарактеризованными свойствами – VP из *Trametes versicolor* (*TvVP2*) и MnP из *Trametes polyzona* (*TpMnP2*). Интересно, что по опубликованным данным *TpMnP2* имело в 3 раза меньшую аффинность к  $Mn^{2+}$  и почти в 8 раз меньшую аффинность к 2,6-DMP, чем *TvVP2*. Основываясь на ортологической гипотезе, можно предположить, что пероксидазы, секретируемые *T. hirsuta* в процессе модификации лигнина, также сильно различаются по своей субстратной специфичности. Скорее всего, пероксидазы MnP7 и MnP1 обладают более высокой специфичностью к некоторым фенольным соединениям, чем VP2 и MnP5. Таким образом, действие менее специфичных VP2 и MnP5 в течение первых 6 дней культивирования гриба приводит к образованию устойчивых к ним фрагментов лигнина. Эти фрагменты индуцируют синтез более специфичных MnP7 и MnP1, которые осуществляют их дальнейшую модификацию.

## ВЫВОДЫ

1. Для *T. hirsuta* в состав мультигенного семейства лакказ входит семь полнофункциональных генов (*lacA* – *lacG*) и один непротранскрибированный псевдоген (*lacH*), а в состав мультигенного семейств лигнинолитических пероксидаз – 18 полнофункциональных генов, из которых семь кодируют марганец пероксидазы (MnP1-MnP7), девять – лигнин пероксидазы (LiP1-LiP9), и два – версатил пероксидазы (VP1 и VP2).

2. Все гены лакказ *T. hirsuta* (как и других грибов Базовой полипорной клады) произошли от одного предкового гена, наибольшее число дупликаций которого происходило в раннем Меловом периоде. В тоже время, все гены пероксидаз *T. hirsuta* (как и других грибов порядка Polyporales) произошли от восьми предковых генов, часть которых была потеряна к концу раннего Мелового периода, а оставшаяся часть претерпела обширные параллельные дупликации в более поздние периоды времени.

3. Выявлены семь ортологических групп лакказ и 14 ортологических групп пероксидаз, включающих изоферменты *T. hirsuta*. При этом практически все лакказы, которые были описаны в литературе до сих пор, принадлежат к группе А (включающей изофермент LacA *T. hirsuta*). В случае пероксидаз, отсутствие в большинстве статей первичных последовательностей не позволяет точно определить, свойства какого изофермента (из какой ортологической группы) фактически исследовались.

4. Для *T. hirsuta* при деградации сульфонфталеинового красителя бромкрезолового зеленого основными секретируемыми экзоферментами являются лакказы (LacA), а при деградации крафт-лигнина – пероксидазы (MnP5, VP2, MnP7 и MnP1). Также показано, что при культивировании *T. hirsuta* в присутствии бромкрезолового зеленого существенно снижается транскрипция всех генов пероксидаз, а в присутствии крафт-лигнина – большинства генов лакказ.

5. Под воздействием экзоферментов *T. hirsuta* происходит систематическая модификация молекулярного состава крафт-лигнина, выражающаяся в его сдвиге на диаграмме ван Кревелена из области слабо-окисленного к области окисленного лигнина. При этом состав соединений, которые систематически модифицируются, значительно изменяется в зависимости от соотношения количества секретируемых грибом изоферментов пероксидаз.



## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых журналах

1. **Moiseenko K.V.**, Glazunova O.A., Savinova O.S., Vasina D.V., Zhrebker A.Y., Kulikova N.A., Nikolaev E.N., Fedorova T.V. Relation between lignin molecular profile and fungal exo-proteome during kraft lignin modification by *Trametes hirsuta* LE-BIN 072 // Bioresource Technology, 2021, 125229.
2. **Moiseenko K.V.**, Glazunova O.A., Shakhova N.V., Savinova O.S., Vasina D.V., Tyazhelova T.V., Psurtseva N.V., Fedorova T.V. Fungal adaptation to the advanced stages of wood decomposition: Insights from the *Steccherinum ochraceum* // Microorganisms, 2019, V. 7: 527.
3. Savinova O.S., **Moiseenko K.V.**, Vavilova E.A., Chulkin A.M., Fedorova T.V., Tyazhelova T.V., Vasina D.V. Evolutionary relationships between the laccase genes of Polyporales: orthology-based classification of laccase isozymes and functional insight from *Trametes hirsuta* // Frontiers in microbiology, 2019, V. 10: 152.
4. **Moiseenko K.V.**, Vasina D.V., Farukshina K.T., Savinova O.S., Glazunova O.A., Fedorova T.V., Tyazhelova T.V. Orchestration of the expression of the laccase multigene family in white-rot basidiomycete *Trametes hirsuta* 072: evidences of transcription level subfunctionalization. // Fungal biology, 2018, V. 122(5): P. 353-362.
5. **Moiseenko, K.V.**, Savinova O.S., Vasina D.V., Kononikhin A.S., Tyazhelova T.V., Fedorova T.V. Laccase isoenzymes of *Trametes hirsuta* LE-BIN072: Degradation of industrial dyes and secretion under the different induction conditions // Applied Biochemistry and Microbiology, 2018, V. 54(9), P. 834-841.
6. Savinova O.S., **Moiseenko K.V.**, Vavilova E.A., Tyazhelova T.V., Vasina D.V. Properties of two laccases from the *Trametes hirsuta* 072 multigene family: Twins with different faces // Biochimie, 2017, V. 142, P. 183-190.
7. Vasina D.V., **Moiseenko K.V.**, Fedorova T.V., Tyazhelova T.V. Lignin-degrading peroxidases in white-rot fungus *Trametes hirsuta* 072. Absolute expression quantification of full multigene family // PLoS One, 2017, V. 12(3), e0173813.
8. **Moiseenko K.V.**, Maloshenok L.G., Vasina D.V., Bruskin S.A., Tyazhelova T.V., Koroleva O.V. Laccase multigene families in Agaricomycetes // Journal of Basic Microbiology, 2016, V. 56(12), P. 1392-1397.
9. Pavlov A.R., Tyazhelova T.V., **Moiseenko K.V.**, Vasina D.V., Mosunova O.V., Fedorova T.V., Maloshenok L.G., Landesman E.O., Bruskin S.A., Psurtseva N.V., Slesarev A.I., Kozyavkin S.A., Koroleva O.V. Draft genome sequence of the fungus *Trametes hirsuta* 072 // Genome announcements, 2015, V. 3 (6), e01287-15.

### Тезисы докладов

1. Glazunova O.A., **Moiseenko K.V.**, Savinova O.S., Vasina D.V., Tyazhelova T.V., Fedorova T.V. Evolutionary relationships between the laccase genes of Polyporales // 45th Congress of European Biochemical Societies (FEBS) 2021, Ljubljana, Slovenia, 3-8 July 2021, FEBS OpenBio, Vol. 11, Suppl.S1, P. 130.
2. **Moiseenko K.V.**, Savinova O.S., Glazunova O.A., Vasina D.V., Zhrebker A.Y., Kulikova N.A., Fedorova T.V. Changes in the molecular profile of compounds released from plant lignin during the process of its fungal decomposition. // 45th Congress of European Biochemical Societies (FEBS) 2021, Ljubljana, Slovenia, 3-8 July 2021, FEBS OpenBio, Vol. 11, Suppl.S1, P. 387.
3. **Moiseenko K.V.**, Savinova O.S., Glazunova O.A., Sinitsyn A.P., Fedorova T.V. Application of ESI FT-ICR MS to study kraft lignin modification by the exoenzymes of the white rot basidiomycete fungus *Trametes hirsuta* LE-BIN 072. // 8th Scientific and Practical Conference “Biotechnology: Science and Practice”, Yalta, Russia, 22-26 September 2020, KnE Life Sciences (Jan 13, 2022), 412-417.
4. Vasina D.V., Savinova O.S., Chulkin A.M., Vavilova E.A., **Moiseenko K.V.**, Fedorova T.V., Tyazhelova T.V. Heterologous expression of three minor laccases from *Trametes hirsuta* 072 and their properties // 43th Congress of European Biochemical Societies (FEBS) 2018, Prague, Czech Republic, 7-12 July 2018, FEBS OpenBio, Vol. 8, Suppl.S1, P. 173.
5. **Moiseenko K.V.**, Maloshenok L.G., Vasina D.V., Tyazhelova T.V., Fedorova T.V., Bruskin S.A., Koroleva O.V. New next generation sequencing based method for exploration of laccase multigene family in basidiomycetes fungi // Biotechnologies in chemical and forest industry, Arkhangelsk, Russia, 11-12 September 2014, Proceedings international scientific conference, 31-35.
6. Maloshenok L.G., **Moiseenko K.V.**, Fedorova T.V., Bruskin S.A., Koroleva O.V. // 38th Congress of European Biochemical Societies (FEBS) 2013, St. Peterburg, Russia, 6-11 July 2013, FEBS Journal, Vol. 280, Suppl.S1, P. 10.