

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК»  
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМ. А.Н. БАХА

*На правах рукописи*

Моисеенко Константин Валерьевич

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

1.5.4. Биохимия

**Диссертация**  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук,  
Куликова Н.А.

Москва – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР И АНАЛИЗ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	10
1.1 Дереворазрушающие грибы бурой и белой гнили .....	10
1.2 Лакказы и лигнинолитические пероксидазы грибов белой гнили .....	15
1.2.1 Общие характеристики и механизм действия.....	15
1.2.2 Участие в процессах лигнинолиза .....	19
1.2.4 Многокопийность генов и эволюционные взаимоотношения .....	21
1.2.5 Применение для биодеструкции ксенобиотиков и валоризации лигнина .....	24
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	28
2.1 Микробиологические работы.....	28
2.1.1 Использованный в работе штамм базидиального гриба белой гнили.....	28
2.1.2 Получение посевного материала.....	28
2.1.3 Глубинное жидкофазное культивирование на средах различного состава .....	28
2.2 Биохимические работы.....	29
2.2.1 Исследование состава экзопротеома методом.....	29
2.2.2 Исследование продуктов деградации крафт лигнина методом .....	30
2.3. Молекулярно-генетические работы.....	31
2.3.1 Экстракция суммарной РНК и обратная транскрипция .....	31
2.3.2 Измерение уровней транскрипции генов лакказ методом ПЦР в реальном времени .....	32
2.3.4 Измерение уровней транскрипции генов пероксидаз методом цифровой капельной ПЦР.....	34
2.4 Биоинформатика и статистическая обработка данных .....	36
2.4.1 Поиск генов лакказ и лигнинолитических пероксидаз в геноме <i>T. hirsuta</i> и <i>in silico</i> анализ предсказанных аминокислотных последовательностей .....	36
2.4.2 Исследование эволюции мультигенных семейств лакказ и лигнинолитических пероксидаз полипоровых грибов .....	36
2.4.3 Статистическая обработка данных .....	38
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	39

3.1 Состав и эволюция мультигенных семейств лакказ и лигнинолитических пероксидаз.....	39
3.1.1 Геномная локализация и общая характеристика .....	39
3.2.2 Эволюционная история и ортологические группы .....	44
3.2 Секреция и транскрипция лакказ и лигнинолитических пероксидаз при культивировании на контрольной среде .....	56
3.2.1 Изменение состава экзопротеома.....	56
3.2.2 Закономерности транскрипции .....	57
3.3 Секреция и транскрипция лакказ и лигнинолитических пероксидаз при культивировании в присутствии синтетического красителя .....	61
3.3.1 Изменение состава экзопротеома.....	61
3.3.2 Закономерности транскрипции .....	62
3.4 Секреция и транскрипция лакказ и лигнинолитических пероксидаз при культивировании в присутствии лигнина .....	66
3.4.1 Изменение состава экзопротеома.....	66
3.4.2 Закономерности транскрипции .....	67
3.5 Участие лакказ и лигнинолитических пероксидаз в процессе деградации крафт лигнина .....	70
3.5.1 Изменение молекулярного состава лигнина под действием лигнинолитической системы <i>T. hirsuta</i> .....	70
3.5.2 Изменения состава экзопротеома.....	78
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	82
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	84

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

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

УФ – ультрафиолет

ИК – инфракрасная

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

(-)ESI FT-ICR MS – масс-спектрометрия ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье с ионизацией электрораспылением в режиме отрицательных ионов

HPLC-(+)ESI FT-ICR MS/MS – высокоэффективная жидкостная хроматография с детектированием тандемной масс-спектрометрией ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье с ионизацией электрораспылением в режиме положительных ионов

SDS-PAGE – электрофорез белков в полиакриламидном геле

DTT – дитиотреитол

DBE – эквивалентов двойных связей (англ. double-bond equivalents)

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

кДНК – копия ДНК

РНК – рибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

qPCR – ПЦР в реальном времени

ddPCR – цифровая капельная ПЦР

AIC – информационного критерия Акаике (англ. Akaike information criterion)

ML – критерия максимального правдоподобия (англ. maximum likelihood criterion)

HSD – честно значимое различие (англ. honestly significant difference)

п.о. – пар оснований

RQ – относительное количество (англ. relative quantity)

## ВВЕДЕНИЕ

**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.

**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 биодegradации 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.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР И АНАЛИЗ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

## 1.1 Дереворазрушающие грибы бурой и белой гнили

Изначально выделение дереворазрушающих грибов в отдельную группу микроорганизмов было осуществлено исключительно на основе их экологического поведения, в связи с этим ранние попытки систематизации данных грибов являлись весьма запутанными и не отражали ни их эволюционных взаимоотношений, ни особенностей осуществляемых ими биохимических процессов [1]. Относительная ясность в классификацию дереворазрушающих грибов была внесена в 1870-х годах Робертом Гартигом (нем. Robert Hartig) [2,3]. Гартиг впервые выделил два типа дереворазрушающих грибов – вызывающие бурую гниль древесины и вызывающие белую гниль древесины.

Основной причиной успешности классификации Гартига являлось, в первую очередь, то, что в ее основе лежала физиологическая гипотеза, в дальнейшем себя оправдавшая, о причине изменения цвета древесины в процессе ее разложения тем или иным грибом. Гартиг считал, что грибы бурой гнили разрушают исключительно целлюлозу древесины, оставляя после себя бурый лигнин, а грибы белой гнили разрушают исключительно лигнин, оставляя белую целлюлозу. Последующие исследования показали, что, хотя побеление древесины и связано с оголением ее целлюлозных волокон, грибы белой гнили способны разлагать и метаболизировать все компоненты древесной клеточной стенки – целлюлозу, гемицеллюлозу и лигнин [4]. Также, основываясь на своих наблюдениях, Гартиг впервые выдвинул тезис о том, что тип вызываемой гнили является атрибутом самого гриба, а не результатом его взаимодействия с различными факторами окружающей среды, в том числе и видом разлагаемой древесины.

Классическое дихотомическое разделение дереворазрушающих грибов на группы бурой и белой гнили отражает весьма разные химические и биохимические процессы, осуществляемые этими группами. Несмотря на недавно инициированную и активно ведущуюся рядом ученых работу по замене данного деления неким аналогом непрерывной шкалы [5,6], дихотомическое разделение все еще активно используется в научных кругах. При этом стоит отметить, что почти все знания, в особенности экспериментальные, относительно разных групп дереворазрушающих грибов получены для грибов, относящихся к порядку Polyporales [7,8], и во всем последующем тексте термин “дереворазрушающие грибы” всегда, если это особо не оговаривается, относится именно к этим грибам.

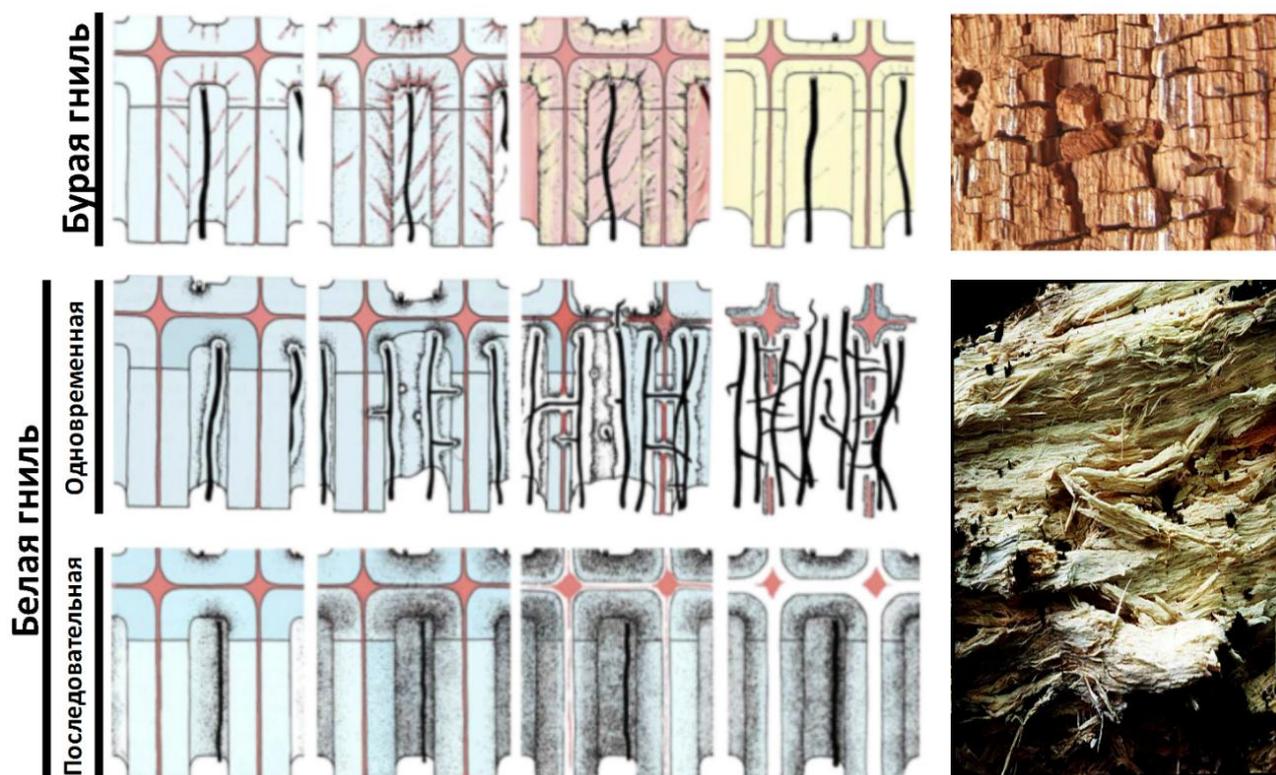
Для грибов, вызывающих бурую гниль, характерными субстратами являются преимущественно хвойные породы древесины. Во время деградации древесины этими грибами целлюлоза и гемицеллюлоза подвергаются интенсивному разложению, в то время

как лигнин подвергается лишь незначительной модификации. Неспособность грибов бурой гнили в существенной степени разлагать лигнин обычно связывают с полным отсутствием у них ферментного комплекса лигнинолитических пероксидаз и, как следствие, отсутствием возможности разрушать нефенольные структуры лигнина.

Ранние стадии разрушения древесины грибами бурой гнили характеризуются резким увеличением относительного содержания лигнина, в то время как его абсолютное содержание несколько уменьшается [9]. Из-за быстрой деполимеризации целлюлозы конструктивная стабильность древесины сильно снижается, в результате чего после естественного высыхания происходит ее растрескивание на прямоугольные блоки. На поздних стадиях разложения древесины грибами бурой гнили гнилое дерево может быть раздавлено пальцами в коричневый порошок. Остающееся после разложения грибами бурой гнили вещество древесины из-за высокого содержания в нем слегка модифицированного лигнина отличается чрезвычайной стабильностью к дальнейшей биodeградации и в течение столетий может оставаться неизменным, образуя важную составляющую гуминовых веществ верхних слоев лесной подстилки [4].

Колонизация древесины грибами бурой гнили происходит через сердцевинные лучи с последующим распространением мицелия гриба через поры сосудов и трахеид в продольной ткани посредством микрогиф [4,10]. При этом мицелиальные гифы грибов бурой гнили растут внутри клеточного люмена и находятся в тесном контакте с S3 слоем вторичной клеточной стенки (рисунок 1). Как правило, для грибов бурой гнили не характерно образование зон лизиса вокруг гиф, а сами гифы окружены слоями слизи.

Несмотря на нахождение гиф грибов бурой гнили в клеточном люмене, для них характерна деградация клеточной стенки древесины, начинающаяся с срединной пластинки и слоев P и S1. Слой S3 остается нетронутым на ранних стадиях распада, что, как было предположено, приводит к ограничению проникновения ферментов в слой S2. Таким образом, чтобы иметь возможность разрушать клеточную стенку древесины на расстоянии от гиф, грибы бурой гнили должны обладать механизмом деградации, включающим в себя достаточно малые молекулы (значительно меньше ферментов), способные проникать в неповрежденную клеточную стенку древесины.



**Рисунок 1.** Микро и макроморфология разрушения древесины грибами бурой и белой гнили. Изображение частично адаптировано из [11].

Наиболее распространенная на данный момент модель разрушения древесной клеточной стенки грибами бурой гнили основана на реакции Фентона и была предложена в 1974 году, с последующим включением в модель хелатирующих агентов в 1997 году. Согласно данной модели, грибы бурой гнили индуцируют продукцию гидроксильных радикалов в полимерной матрице растительной клеточной стенки путем секреции проникающих в нее молекул фенолятных и гидрохиноновых восстановителей железа, пероксида водорода и щавелевой кислоты [12]. Считается, что щавелевая кислота связывает ионы  $Fe^{3+}$  в среде, после чего получившийся комплекс проникает в стенки древесных клеток, где он восстанавливается фенолят-ионами и гидрохинонами с высвобождением иона  $Fe^{2+}$ . Ион  $Fe^{2+}$  затем реагирует с  $H_2O_2$  в реакции Фентона (англ. Fenton) с образованием гидроксильного радикала. Гидроксильные радикалы способны вступать в реакции с молекулами целлюлозы, отрывая от нее электрон с последующим расщеплением ее полимерной цепи. Кроме окисления целлюлозных молекул гидроксильные радикалы также способны вступать в реакции с лигнином клеточной стенки, что, хотя и не приводит к его интенсивному разрушению, проявляется в изменении его структуры, включая деметилирование, деметоксилирование, гидрокселирование и окисление алифатических боковых цепей, связанных с ароматическими ядрами [12]. Высокая реакционная способность гидроксильного радикала также объясняет, почему реакция должна происходить внутри

стенки древесных клеток, а не вблизи гиф. Образование гидроксильных радикалов только внутри стенки древесных клеток и замедленное разложение слоя S3 может защищать гифы от окислительных повреждений.

Для грибов, вызывающих белую гниль, характерными субстратами являются преимущественно лиственные породы древесины. При этом белая гниль уменьшает прочностные свойства древесины в меньшей степени, нежели бурая гниль, и, как следствие, для пораженной белой гнилью древесины не характерны растрескивание и хрупкость [4]. Пораженная белой гнилью древесина характеризуется высокой мягкостью, гибкостью и сопротивлением на разрыв.

Среди грибов белой гнили, основываясь на микроскопических и ультраструктурных исследованиях, обычно выделяют два основных подтипа – грибы, осуществляющие одновременную белую гниль и грибы, осуществляющие последовательную белую гниль [9–11].

При одновременной белой гнили углеводная и лигнинная компоненты древесины разлагаются грибами почти одновременно и с одинаковой скоростью на всех этапах распада (рисунок 1). Иногда разрушение древесины может начинаться с образования микрогифами гриба перфораций во вторичной клеточной стенке, дальнейшее увеличение и слияние которых приводит к образованию больших отверстий [11]. Обычно, однако, гифы гриба растут внутри люмена, тесно контактируя с S3 слоем. Окруженная слизью гифа выделяет различные разлагающие клеточную стенку агенты, активные только в непосредственной близости от нее. В результате этого под гифой образуется зона лизиса в виде канавки, а клеточная стенка древесины постепенно истончается [11].

При последовательной белой гнили на ранних стадиях деградация лигнина и гемицеллюлозы древесины протекает быстрее, нежели деградация целлюлозы (рисунок 1). При этом в древесной ткани появляются небольшие удлиненные полости с выставленной наружу целлюлозой [11]. На поздних стадиях распада разлагаемая древесина приобретает волокнистую текстуру за счет распада лигнифицированной срединной пластинки и первичной клеточной стенки [10,13].

Следует отметить, что к ряду грибов последовательной белой гнили довольно часто применяют такие термины, как «селективная белая гниль» и «избирательная делигнификация». Особенно широкое распространение данные термины получили в период активного исследования возможностей применения дереворазрушающих грибов в процессах биоварки и производства биотоплива [13–15], поскольку заложенная в них коннотация обещала большие экспериментальные успехи, нежели коннотация термина «последовательная белая гниль». Однако в процессах последовательной белой гнили,

особенно на поздних стадиях атаки, целлюлоза также подвергается деградации, поэтому такая гниль осуществляет не селективную/избирательную, а предпочтительную делигнификацию.

Основными лигнин-деградирующими ферментами грибов белой гнили являются секретлируемые ими лигнинолитические пероксидазы и лакказы. Поскольку для своей эффективной работы пероксидазы требуют наличие перекиси водорода в среде, грибы белой гнили также секретруют различные  $H_2O_2$ -продуцирующие ферменты, такие как арилалкогольоксидаза, глиоксальоксидаза, пиранозо-2-оксидаза и целлобиозодегидрогеназа [13]. Доступные после разрушения лигнина молекулы целлюлозы и гемицеллюлозы подвергаются деградации обширным комплексом целлюлолитических ферментов, включающим в себя различные целлюлазы и гемицеллюлазы.

Практически все наиболее часто встречаемые в природе грибы бурой и белой гнили относятся к порядку Polyporales [9,16,17]. В связи с чем неудивительно, что все больше и больше исследований посвящено грибам этого порядка. Так, в период с 2010 по 2017 год в MycoBank было представлено 577 предложений относительно корректировки таксономии порядка Polyporales, в том числе 42 предложения касались введения новых родов и одно – нового семейства [8]. За тот же период в PubMed зафиксировано 2183 публикации с ключевым словом “Polyporales” [8]. В связи со столь быстрым развитием событий, рядом исследователей было выдвинуто предложение на время «заморозить» любой пересмотр систематики полипоровых грибов и обратить более пристальное внимание на их эволюционные взаимоотношения, обсуждаемые не в таксономических терминах родов и семейств, а в филогенетических терминах клад и подклад [7,8]. При этом основа данного подхода была заложена работами, осуществленными в рамках крупного международного проекта PolyPEET (<http://wordpress.clarku.edu/polypeet/>) в период с 2010 по 2016 годы.

В настоящее время среди грибов, относящихся к порядку Polyporales, исследователи выделяют четыре основные клады: Базовую полипороидную кладу (англ. Core Polyporoid clade), Антродиевую кладу (англ. Antrodia clade), Флебиоидную кладу (англ. Phlebioid clade) и Остаточную полипороидную кладу (англ. Residual Polyporoid clade) [7,8].

Базовая полипороидная клада включает в себя группу грибов, рассматриваемых многими исследователями в качестве типичных представителей семейства Polyporaceae. В данную кладу входят такие широко распространенные рода грибов как *Polyporus*, *Lentinus*, *Russporus*, *Trametes* и другие. Флебиоидная клада представлена в основном грибами, типично относимыми к таким семействам как Phanerochaeteceae, Harpalopilaceae, Bjerkanderaceae, Irgicaceae и Phlebiaceae. Антродиевая клада включила в себя грибы таких семейств как Fomitopsidaceae, Laetiporaceae и Dacryobolaceae. Стоит также отметить, что

состав и достоверность монофилии Антродиевой клады все еще остается спорным вопросом в филогенетике полипоровых грибов. Остаточная полипороидная клада включила в себя гетерогенную группу полипоровых грибов, которые не принадлежат ни к одной из вышеупомянутых трех клад. Выделение данной клады стоит рассматривать скорее, как практически удобное, нежели эволюционно обоснованное, поскольку ее монофилию в целом еще предстоит доказать.

С точки зрения процессов деградации древесины, все грибы, представленные в порядке Polyporales, являются грибами белой гнили. Исключение составляет лишь Антродиевая клада, представители которой осуществляют бурую гниль древесины.

## **1.2 Лакказы и лигнинолитические пероксидазы грибов белой гнили**

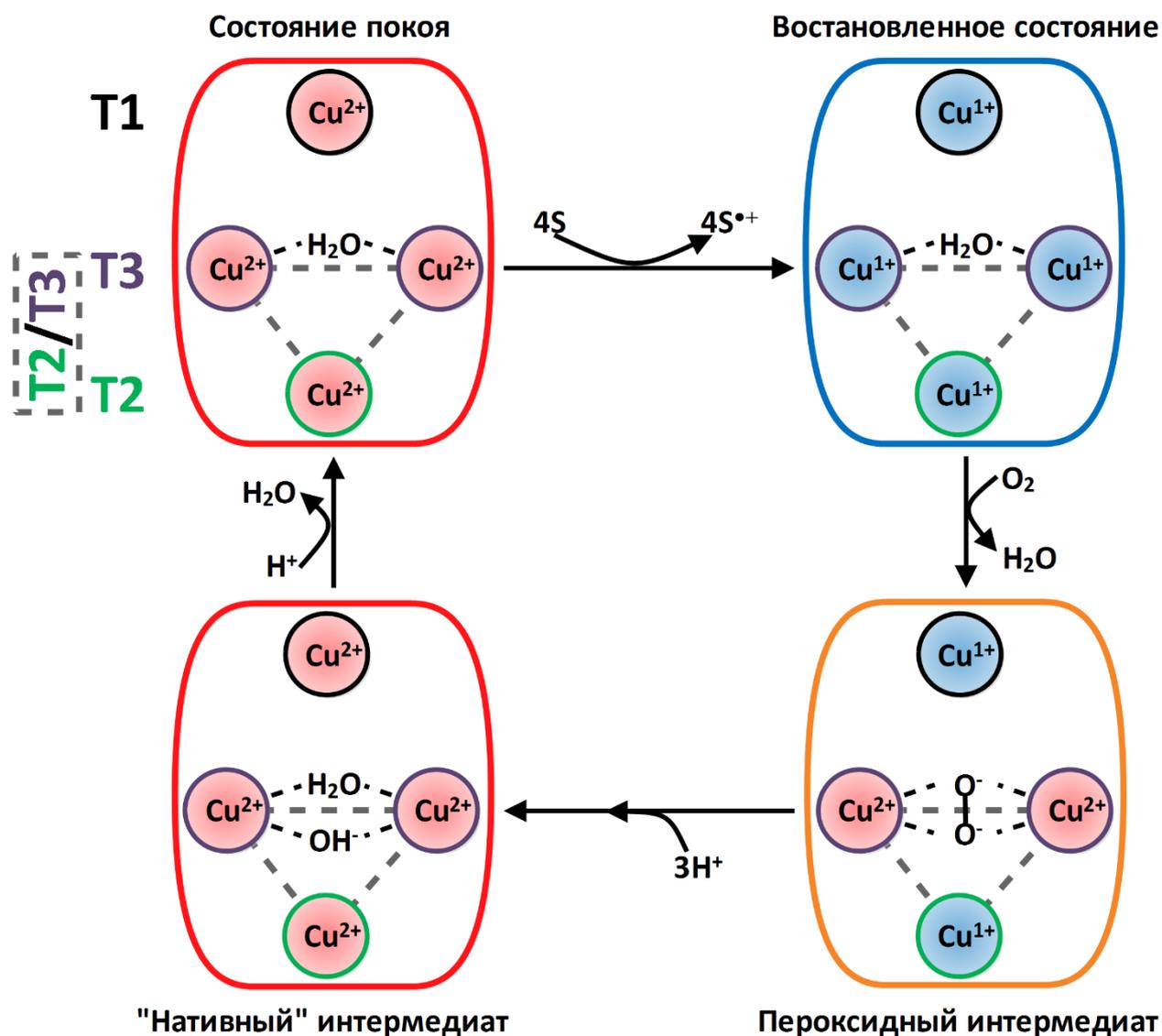
### **1.2.1 Общие характеристики и механизм действия**

Лакказа (ЕС 1.10.3.2) является ферментом, способным катализировать одноэлектронное окисление широкого спектра органических и неорганических субстратов, включая полифенолы, метоксизамещенные фенолы и ароматические амины, с одновременным четырехэлектронным восстановлением кислорода до воды. Лакказа, являясь типичным представителем класса голубых мультимедных оксидаз, представляет из себя  $\beta$ -белок, содержащий один ион меди типа I (T1), придающий препарату фермента характерную голубую окраску, и один трехъядерный медный кластер, образованный одним ионом меди типа II (T2) и двумя ионами меди типа III (T3) [18].

Термин “лакказа” очень долгое время использовался для обозначения ферментов со сходным строением и каталитическими свойствами, которые выделяли из насекомых, растений, бактерий и грибов. Однако, на данный момент рекомендуется применять этот термин исключительно для определенного класса ферментов, полученных из грибов, при этом границы применимости очерчиваются на основе эволюционных взаимоотношений [19,20].

Каталитический цикл лакказы представлен на рисунке 2. В начале ферментативного цикла находящийся в состоянии покоя фермент полностью окислен. На первом этапе цикла фермент осуществляет последовательное одноэлектронное окисление четырех молекул субстрата, приводящее к образованию свободных радикалов. Отрыв электрона от молекулы субстрата осуществляется в центре T1 лакказы, с которого электроны переносятся на трехъядерный медный кластер T2/T3, что приводит к переходу покоящейся формы фермента в полностью восстановленное состояние. В дальнейшем происходит связывание молекулы кислорода в центре T2/T3 восстановленной формой лакказы. Перенос двух электронов от

ионов меди T3 на молекулу кислорода приводит к образованию пероксидного интермедиата. Дальнейший перенос двух электронов от ионов меди T1 и T2 приводит восстановлению пероксидного интермедиата, расщеплению O–O связи пероксида и образованию «нативного интермедиата», при этом фермент переходит в полностью окисленное состояние. Нативный интермедиат содержит в себе два восстановленных кислородных атома – один в составе молекулы воды H<sub>2</sub>O и один в составе гидроксид-иона OH<sup>-</sup>, который может быть в дальнейшем протонирован. На последнем этапе каталитического цикла происходит высвобождение одной из молекул воды из активного центра, в то время как вторая молекула остается в связанной с ферментом [21].

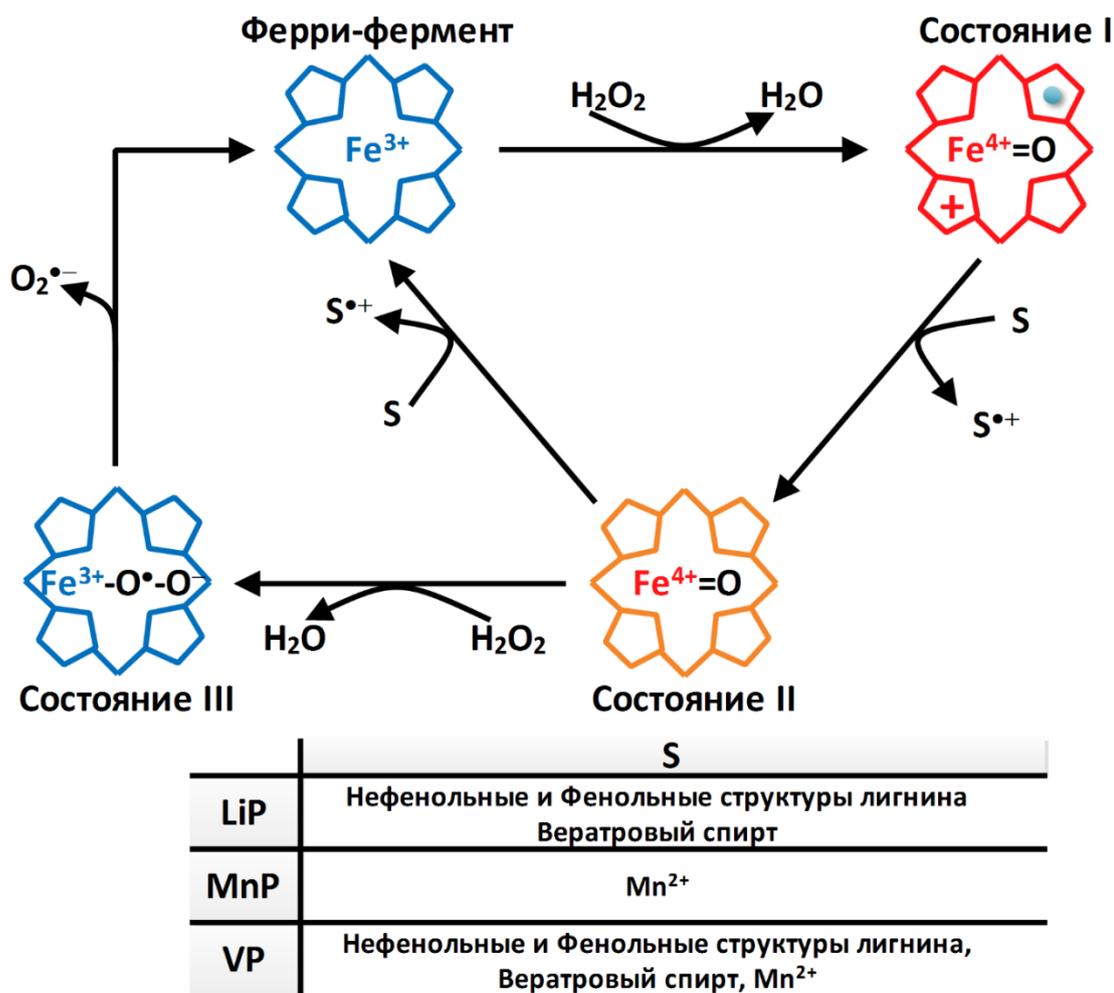


**Рисунок 2.** Каталитический цикл лакказы. S и S<sup>•+</sup> – молекула и свободный радикал субстрата соответственно.

Лигнинолитические пероксидазы грибов (или лигнинолитические пероксидазы II типа) представляют собой группу гемсодержащих ферментов, использующих H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в качестве акцептора электронов для окисления лигнина и лигниноподобных соединений [22]. Являясь

мономерными гемопротейнами, лигнинолитические пероксидазы сходны по своему строению с классическими гемовыми пероксидазами, такими как пероксидаза хрена, и представляют из себя типичные альфа-спиральные белки, в активном центре которых располагается ион  $Fe^{3+}$  пентакоординированный четырьмя тетрапиррольными атомами азота гема и одним атомом азота остатка гистидина белковой цепи.

Каталитический цикл лигнинолитических пероксидаз представлен на рисунке 3. Суммарный механизм действия лигнинолитических пероксидаз состоит из двух этапов одноэлектронного окисления субстрата с последующим переносом двух электронов на молекулу  $H_2O_2$ , восстанавливающуюся до  $H_2O$ . Ферментативный цикл начинается с окисления основного/покоящегося состояния фермента (ферри-фермента) молекулой  $H_2O_2$ , приводящего к переходу фермента в двухэлектронное окисляющее состояние (Состояние I). Один электрон на пероксид переносится от иона  $Fe^{3+}$ , который окисляется до  $Fe^{4+}$ , и один – от тетрапиррольного кольца порфирина (или близрасположенных аминокислот), в результате чего образуется свободный радикал. Фермент в Состоянии I в дальнейшем производит одноэлектронное окисление субстрата до свободного радикала, при этом сам фермент переходит в Состояние II, в котором железо все еще присутствует в виде  $Fe^{4+}$ , но гем находится в восстановленном состоянии. На завершающей стадии цикла происходит одноэлектронное окисление второй молекулы субстрата, что приводит к образованию второго свободного радикала субстрата, при этом фермент возвращается в покоящееся состояние. Стоит отметить, что высокая концентрация  $H_2O_2$  в реакционной среде может вызывать обратимую инактивацию фермента путем образования каталитически неактивного промежуточного состояния (Состояние III), которое может в дальнейшем, спонтанно или через окисление субстратом, переходить в основное состояние фермента с сопутствующим высвобождением супероксидного аниона ( $O_2^{\cdot-}$ ) [18,23].



**Рисунок 3.** Каталитический цикл лигнинолитических пероксидаз. S и S<sup>•+</sup> – молекула и свободный радикал субстрата соответственно.

Существующая на данный момент классификация лигнинолитических пероксидаз основана на данных о структуре этих ферментов и наличии в их активном центре характерных аминокислотных остатков [24,25]. Так, для лигнин пероксидаз (LiP, EC 1.11.1.14) характерно наличие остатка каталитического триптофана на поверхности фермента, участвующего в образовании альтернативного сайта связывания субстрата, и остатка глутаминовой кислоты в субстрат-связывающем кармане вблизи гема. Типичным для марганец пероксидаз (MnP, EC 1.11.1.13) является наличие двух остатков глутаминовой кислоты и одного остатка аспарагиновой кислоты, образующих сайт связывания иона марганца вблизи гема. Для универсальных или версатил пероксидаз (VP, EC 1.11.1.16) характерно одновременное наличие как каталитического триптофана на поверхности фермента, так и сайта связывания иона марганца в субстрат связывающем кармане вблизи гема.

### 1.2.2 Участие в процессах лигнинолиза

Будучи впервые описанной в 1896 году Бертрантом и Лаборде [26,27], лакказа является самым первым изученным ферментом дереворазрушающих грибов. Исходя из ее способности окислять различного рода фенольные соединения, лакказу практически сразу стали ассоциировать с процессами деградации лигнина грибами белой гнили. Долгое время, вплоть до открытия лигнинолитических пероксидаз, считалось, что лакказа является единственным лигнинолитическим ферментом дереворазрушающих грибов [28].

Первые серьезные сомнения в способности лакказы разрушать лигнин появились лишь в районе 1990-х годов, когда была продемонстрирована ее неспособность напрямую окислять соединения, моделирующие нефенольные структуры лигнина [29]. На данный момент считается, что лакказы не обладают достаточным окислительно-восстановительным потенциалом для осуществления непосредственного окисления нефенольных структур лигнина, однако опосредованное окисление лакказой таких структур все же возможно в присутствии различного вида молекул-медиаторов [30], при этом никаких достоверных сведений о том, какие молекулы являются природными медиаторами лакказ, все еще нет.

За последние несколько десятилетий для лакказ было предложено множество альтернативных разрушению лигнина биологических функций: участие в удалении/детоксификации потенциально токсичных фенолов, возникающих при деградации лигнина; участие в синтезе дигидроксинафталиновых меланинов – темнопигментированных полимеров, производимых грибами для защиты от неблагоприятных факторов окружающей среды; участие в процессе морфогенеза; участие в образовании внеклеточных пигментов [31–33].

Также стоит упомянуть, что вплоть до конца 1990-х годов, основываясь на ошибочном предположении о ведущей роли лакказы в окислении галловой и таниновой кислоты в тесте Бовендамма, считалось, что грибы бурой гнили не содержат генов лакказ в своем геноме. На сегодняшний день данное мнение опровергнуто как генетическими, так и биохимическими фактами. Хотя роль лакказ в грибах бурой гнили, по сравнению с грибами белой гнили, представляет из себя еще большую загадку, было выдвинуто предположение, что лакказы грибов бурой гнили могут катализировать окисление метоксигидрохинонов до полухинонов, которые, в свою очередь, восстанавливают  $Fe^{3+}$  до  $Fe^{2+}$ , инициируя таким образом реакции Фентона, направленные на разрушение целлюлозного и частично лигнинного компонента клеточных стенок растений [12].

После демонстрации неспособности лакказы в отсутствие медиаторов эффективно окислять соединения, моделирующие нефенольные структуры лигнина, рядом ученых была выдвинута гипотеза о существовании других ферментов, которые могут использоваться

грибами белой гнили в процессе деградации лигнина [34]. Вскоре было обнаружено несколько таких ферментов, сейчас широко известных как лигнинолитические пероксидазы II типа: лигнин пероксидаза (LiP), марганец пероксидаза (MnP) и универсальная, или версатил пероксидаза (VP). Впоследствии наличие генов этих пероксидаз стало необходимым и достаточным условием для отнесения гриба к группе белой гнили, а их отсутствие стало отличительной чертой грибов бурой гнили, в геномах которых гены лигнинолитических пероксидаз полностью отсутствуют [5,35].

Лигнин пероксидаза (LiP) является первой обнаруженной в секрете базидиальных грибов лигнинолитической пероксидазой. Примерным временем открытия данного фермента можно считать 1983 год [36]. В отличие от классических пероксидаз железо в порфириновом кольце LiP является более электрон-дефицитным, что делает ее более сильным окислителем [37]. В результате этого LiP могут окислять ароматические соединения, содержащие только два или три эфирных заместителя в кольце и, таким образом, напоминающие основные нефенольные структуры лигнина [38]. Консервативный остаток триптофана на поверхности фермента, как считается, участвует в переносе электрона от ароматических соединений, которые не могут напрямую контактировать с окисленным гемом [39], тем самым позволяя LiP напрямую окислять громоздкие лигниноподобные субстраты. Стоит, однако, отметить, что эффективность катализируемого LiP окисления лигниноподобных субстратов уменьшается по мере увеличения их размера (предел находится в районе 3-5 звеньев монолигнолов). Окисление более крупных молекул лигнина (около 20 звеньев) наблюдается только лишь в присутствии вератрового спирта, являющегося метаболитом, часто секретлируемым базидиальными грибами [40].

Несмотря на то, что первые сообщения об обнаружении марганец пероксидазы (MnP) в базидиальных грибах появились всего несколькими годами позже открытия LiP [36], долгое время эти ферменты не ассоциировались с процессом разрушения лигнина [34]. Напрямую связывать MnP с лигнинолизом начали лишь в районе 1990 годов [41]. В отличие от LiP, в каталитическом центре MnP присутствует сайт связывания марганца, включающий в себя несколько отрицательно заряженных аминокислотных остатков и одну гемпропионатную группу. Очевидное преимущество MnP заключается в переносе окислительной способности фермента на небольшой по размеру ион  $Mn^{3+}$ , который в хелатированном виде может диффундировать в лигнифицированную клеточную стенку растения, разрушая ее изнутри. Однако при связывании с анионными хелаторами, такими как оксалат, происходит увеличение электронной плотности на ионе  $Mn^{3+}$ , что делает его значительно более слабым окислителем. В результате хелатированный органическими кислотами ион  $Mn^{3+}$  не способен окислять нефенольные структуры лигнина. Хелатированный ион  $Mn^{3+}$  способен атаковать

лишь небольшое количество структур в лигнине, которые в основном встречаются как концевые группы на полимере, и их окисление не приводит к обширному лигнинолизу [42,43]. До 2017 считалось, что MnP не способны непосредственно окислять лигниноподобные структуры, что связано с отсутствием у данной группы лигнинолитических пероксидаз остатка триптофана на поверхности фермента, который необходим для переноса электронов с ароматических субстратов. Однако проведенные в 2017-2018 годах исследования по восстановлению предковых форм лигнинолитических пероксидаз показали, что ряд рекомбинантно полученных ферментов был способен окислять фенольные субстраты в отсутствие марганца [44,45]

Открытие версатил пероксидазы (VP) примечательно тем, что возможность его существования изначально была предсказана в конце 1990 – начале 2000 годов, исходя из результатов сайт-специфического мутагенеза. Когда сайт связывания  $Mn^{2+}$  был введен в LiP *Phanerochaete chrysosporium*, полученный фермент имел активность MnP [46], и, напротив, когда остаток триптофана, аналогичный каталитическому в LiP, был введен в MnP *P. chrysosporium*, полученный фермент приобрел активность LiP [47]. Эти результаты показали возможность существования в природе лигнинолитических пероксидаз, демонстрирующих активности как LiP, так и MnP. Почти одновременно с экспериментами по мутагенезу было сообщено об обнаружении таких ферментов в *Pleurotus eryngii* [48] и *Bjerkandera* spp. [49]. Будучи гибридом между MnP и LiP, VP может окислять как  $Mn^{2+}$ , так и фенольные ароматические соединения в отсутствие марганца [18]. На данный момент все еще стоит вопрос, насколько эффективно VP способны окислять крупные соединения лигнина и каков их вклад в общий процесс лигнинолиза.

#### **1.2.4 Многокопийность генов и эволюционные взаимоотношения**

За последние несколько десятков лет применение современных методов генетики и молекулярной биологии для исследования дереворазрушающих грибов существенно преобразило эту область знаний. Накопление данных об эволюционных взаимосвязях между различными дереворазрушающими грибами привело не только к обобщению разрозненной информации относительно их генетики, экологии и биохимии, но и открыло путь к их систематическому исследованию. Секвенирование все большего числа геномов дереворазрушающих грибов поставило ряд новых вопросов относительно функции и эволюции конкретных ферментов их лигнинолитического комплекса. В геномах дереворазрушающих грибов гены пероксидаз и лакказ всегда обнаруживаются в виде множества неаллельных копий, образующих мультигенные семейства внутри генома, при этом общепринятое объяснение причин такой многокопийности отсутствует.

В случае основных лигнинолитических ферментов дереворазрушающих базидиальных грибов наибольший прогресс был достигнут в исследовании эволюции генов лигнинолитических пероксидаз. Так, в 2012 году Димитрос Флоудас с коллегами [50] провели обширный анализ, включавший в себя выборку из 31 гриба с полностью секвенированными геномами. Выборка содержала различных представителей базидиомицетов (отдел Basidiomycota) и аскомицетов (отдел Ascomycota) с различными экологическими моделями поведения – дереворазрушающие грибы белой и бурой гнили, микоризообразующие грибы, почвенные сапротрофы и микопаразиты/патогены животных и растений. В результате проведенной реконструкции видовой филогенетики грибов и процедуры согласования дерева видов с деревом пероксидазных генов была выдвинута гипотеза о существовании в Кембрийском периоде (538-485 млн лет назад) единичного предкового гена лигнинолитических пероксидаз у общего предка всех базидиальных грибов, при этом в эволюционных линиях, ведущих к грибам, не обладающим способностью разлагать древесину, происходили параллельные потери данного гена. Внутри отдела Basidiomycota на эволюционной ветви, ведущей к самому недавнему общему предку грибов из класса Агарикомицетов (Agaricomycetes), происходило увеличение копий пероксидазных генов. Предположительно, геном общего предка данной клады, существовавшего в конце Каменноугольного периода (298 млн лет назад), мог содержать до 7 копий генов пероксидаз, а сам предковый гриб обладал способностью осуществлять белую гниль древесины. При дальнейшей пролиферации клады Agaricomycetes общее количество генов пероксидаз в линиях, ведущих к порядкам, включающим в себя грибы белой гнили, увеличивалось, в то время как в линиях, ведущих к грибам бурой гнили, происходили параллельные потери всех генов пероксидаз.

Вторая крупная работа, посвященная эволюции лигнинолитических пероксидаз была опубликована в 2013 году [51]. В данной работе был проведен филогенетический анализ 179 генов лигнинолитических пероксидаз из 10 полипоровых (порядок Polyporales) грибов, отличительной особенностью которых является обладание удивительно большим количеством неаллельных генов пероксидаз (до 25 копий). В результате проведенного анализа эволюции характеристических аминокислотных остатков, расположенных в активном центре пероксидаз, исследователям удалось показать, как процесс неофункционализации в ходе эволюции привел к образованию отдельных подгрупп пероксидазных генов. Предложенный сценарий предполагает разделение предкового гена MnP на два гена, один из которых при последующих дупликациях дал мультигенное семейство MnP в геноме каждого гриба, а второй, приобретя каталитический остаток триптофана, стал VP. В дальнейшем новообразованный ген VP дублировался, при этом

одна копия сохранилась нетронутой, а вторая копия потеряла сайт связывания Mn(II) и, пройдя дальнейшие дубликации, дала начало мультигенному семейству LiP в каждом грибе. Также отмечалась возможность независимого происхождения нескольких генов VP от разных генов MnP. Несмотря на то, что описываемая работа четко показала процесс неофункционализации пероксидаз в полипоровых грибах, наличие множественных копий MnP, LiP и VP в каждом грибе говорит о том, что на общую неофункционализацию данных генов накладывается еще какой-то дополнительный сценарий эволюции. На основе проведенного в работе анализа эволюции характеристических каталитических аминокислот в работе также были предсказаны аминокислотные последовательности несколько предковых форм пероксидаз, которые в дальнейшем были экспрессированы в *Escherichia coli* и биохимически охарактеризованы [44,45,52,53].

В случае генов лакказ, несмотря на то, что в существующей литературе можно найти большое количество филогенетических деревьев, построенных с различными целями, на данный момент известно лишь небольшое число работ, посвященных филогении данных генов как таковой, при этом взаимосвязь эволюции и функции этих ферментов практически не обсуждается. Более того, все работы, непосредственно посвященные филогенетике лакказ, основываются на анализе не полных мультигенных семейств в каждом грибе, а лишь на доступных на момент проведения анализа генах.

Первая крупная работа о филогенетике лакказ была опубликована в 2003 году Вальдеррамой и др. [54]. В этой работе был проведен филогенетический анализ 39 последовательностей лакказ из грибов отдела Basidiomycota и 6 лакказных последовательностей из грибов отдела Ascomycota. Было показано, что 43 из 45 проанализированных последовательностей образовывали единую филогенетическую кладу, для которой было рекомендовано применять термин "*bona fide* laccases". Скорее всего, оставшиеся две последовательности принадлежали неизвестному в то время подсемейству медьсодержащих оксидаз. Топология филогенетического дерева предполагала существование единственной монофилетической ветви для всех грибных лакказ.

Позднее в 2006 году Хёггер и др. [55] опубликовали филогенетический анализ более 350 генов мультимедных оксидаз из грибов, насекомых, растений и бактерий. Данный анализ послужил основой для классификации семейства мультимедных оксидаз на лакказы *sensu stricto*, лакказы насекомых, лакказоподобные мультимедные оксидазы грибов, ферроксидазы грибов, аскорбатоксидазы, растительные лакказоподобные мультимедные оксидазы и билирубиноксидазы. Термин «laccases *sensu stricto*» был принят для описания типичных лакказ из грибов отдела Basidiomycota (*bona fide* laccases по Вальдеррама и др. [54]) и Ascomycota. В настоящее время термин «лакказа» употребляется именно в данном

контексте. Одной из наиболее интересных особенностей дерева в работе Хёггера и др. [55] было то, что многие гены *sensu stricto* лакказ располагались на филогенетическом дереве, повторяя филогенетические взаимоотношения между видами грибов-обладателей этих генов. Такое расположение генов лакказ указывало как на отсутствие конверсии генов, так и на небольшое количество видоспецифических дупликаций данных генов.

### **1.2.5 Применение для биодеструкции ксенобиотиков и валоризации лигнина**

С экологической точки зрения ксенобиотики – это любые попадающие в окружающую среду вещества, которые не могут естественным образом в ней образовываться. В качестве типичных ксенобиотиков, встречающихся в больших количествах, как в водных, так и в почвенных экосистемах, можно упомянуть пестициды, пластификаторы, антибиотики и синтетические красители [56]. Загрязнение окружающей среды ксенобиотиками, возникающее в результате строительства крупномасштабных промышленных предприятий и интенсификации сельскохозяйственной деятельности, представляют собой серьезную глобальную проблему. Наиболее яркими примерами негативных последствий воздействия ксенобиотиков на окружающую среду и ее обитателей являются нарушение обменных процессов в живых организмах, ведущее к морфофункциональным патологиям, задержке роста и гибели [57], патологические нарушения работы эндокринной системы [58], провоцирование аллергических реакций и стимулирование развития злокачественных новообразований [59].

Поскольку большинство ксенобиотиков представляют из себя трудно разлагаемые соединения, для предотвращения их опасного накопления в почвах и водоемах необходимо применять комплекс очистных мероприятий, одним из которых может являться очистка с использованием метаболического потенциала биологических объектов (таких как бактерии, растения и грибы) – биоремедиация [60]. Однако часто загрязненные районы слишком бедны питательными веществами, чтобы поддерживать рост живых организмов. Более того, рост и развитие живых организмов, наиболее способных обезвреживать загрязнитель, могут подавляться другими, присутствующими в окружающей среде веществами [61]. Одним из вариантов обхода описанной проблемы является использование изолированных ферментов или ферментных систем. Отказ от использования живых организмов для биоремедиации также является более экологически безопасным, поскольку позволяет смягчить любые неблагоприятные воздействия на окружающую среду, которые могут возникнуть в результате интродукции новых видов, особенно подвергнутых генетическим модификациям [62].

На данный момент потенциал использования в процессах биоремедиации наиболее широко исследован для таких ферментов, как цитохромы P450, лакказы, пероксидазы, гидролазы, дегалогеназы, дегидрогеназы, протеазы и липазы [63]. При этом особое внимание уделяется лакказам и лигнинолитическим пероксидазам грибов белой гнили, многие из которых отличаются высокой рН и температурной стабильностью, способностью катализировать реакции в органических растворителях и сохранением активности при высоких концентрациях солей [64]. Низкая субстратная специфичность и высокие окислительно-восстановительные потенциалы лакказ и лигнинолитических пероксидаз грибов белой гнили позволяет использовать эти ферменты для биоремедиации от широкого спектра ксенобиотиков [65]. Также стоит отметить, что во многих случаях продукты окисления устойчивых к деградации в природных условиях ксенобиотиков в дальнейшем значительно легче разлагаются естественным путем и, следовательно, последующие технологические стадии для их изъятия из загрязненных объектов не требуются [66,67].

Поскольку и лакказы, и лигнинолитические пероксидазы катализируют сходные реакции, протекающие через стадию образования свободных радикалов, круг ксенобиотиков, для биодеструкции которых предлагается применять данные ферменты, весьма схож. В ранее проводимых работах была показана возможность успешного применения лакказ и лигнинолитических пероксидаз для биоремедиации почв при загрязнении отходами целлюлозно-бумажных производств, биодеструкции пестицидов, гербицидов, антибиотиков, пластификаторов и синтетических красителей [68–73]. Как правило, вещества, которые предлагается биodeградировать лакказами и лигнинолитическими пероксидазами представляют из себя фенольные соединения, такие как полифенолы и хлорфенолы [74]. Спектр нефенольных соединений, для которых была показана биодеструкция лакказами и лигнинолитическими пероксидазами, включает в себя гетероциклические соединения, соединения с сопряженными системами двойных связей и полиядерные ароматические углеводороды [75,76].

Среди более сотни наименований ксенобиотиков, которые могут деградироваться лакказами и лигнинолитическими пероксидазами, особо следует отметить группу синтетических красителей. В настоящее время в продаже имеется более 100 000 различных синтетических красителей и пигментов. По химическому строению около 60-70% всех производимых красителей составляют азокрасители, имеющие более 3000 различных структур. Этот класс характеризуется одной или несколькими азогруппами ( $-N=N-$ ), замещенными бензольными или нафталиновыми группами, нередко он содержит группы – $SO_3H$ , повышающие растворимость красителей, и ауксохромные группы (например,  $-COOH$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-NHR$ ,  $-NR_2$ ), которые усиливают цвет и повышают способность красителей

связываться с волокнами [77]. Также широкое распространение получили индиго-красители, используемые при окраске джинсы, три- и дифенилметановые красители, применяемые для крашения хлопка, шелка и бумаги, и антрахиноновые красители, которыми окрашивают шерсть, хлопок и искусственные волокна [78,79]. Поскольку разнообразие химических структур синтетических красителей делает очистку стоков и грунтов от них весьма сложной задачей, возможность напрямую или опосредованно через медиаторы окислять структуры практически всех упомянутых красителей делает лакказы и лигнинолитические пероксидазы уникальными ферментами для использования в биоремедиации.

Лигнин является одним из трех основных компонентов клеточной стенки сосудистых растений и вторым по распространенности после целлюлозы биополимером на Земле [80]. Являясь нерегулярным полимером, лигнин состоит из трех основных фенилпропаноидных звеньев, широко известных как монолигнолы – кониферилового, синапилового и п-кумарилового спиртов. Монолигнолы чаще всего связаны  $\beta$ -O-4'-связью (45-60 %), реже 5-5' (3-22 %),  $\beta$ -5 (3-12 %),  $\beta$ - $\beta$  (2-12 %),  $\beta$ -1 (1-9 %) и 4-O-5 (4-9 %) связями [81]. Образуя сложную сетчатую структуру, лигнин придает жесткость клеточной стенке растения. Механически структура древесины напоминает структуру железобетона: волокна целлюлозы, как стальные стержни, обеспечивают прочность на растяжение, а лигнин, подобно бетону, обеспечивает устойчивость к сжатию [82]. Помимо своей механической роли, лигнин также делает клеточную стенку растения трудно проницаемой для воды и патогенов. С экологической точки зрения, лигнин, оставшийся от мертвых растений, вносит существенный вклад в глобальный углеродный цикл и имеет большое значение в формировании органического вещества почвы [83]. С технологической же точки зрения, лигнин является основным побочным продуктом целлюлозно-бумажной и биоэтанольной промышленности. По современным оценкам, мировое производство лигнина составляет несколько десятков миллионов тонн в год [84].

На данный момент существует два концептуальных подхода, предлагаемых для валоризации лигнина – валоризация через изменение свойств полимерных молекул лигнина и валоризация через низкомолекулярные соединения, образующиеся в результате деполимеризации лигнина. Из модифицированного лигнина предлагается производить гидрогели, адсорбенты, углеродные волокна, биотопливо и материал для 3D печати [85], а среди экономически востребованных продуктов деполимеризации лигнина можно упомянуть полигидроксиалкановые, феруловую, сиреневую, ванильную, муконовую и жирные кислоты [86]. Основным же товарным продуктом, получаемым на данный момент в результате каталитической окислительной деполимеризации лигнина, является ванилин, около 85 %

которого синтезируется из продуктов переработки нефти и только 15 % – окислением лигносульфонатов [87].

Среди подходов к валоризации лигнина через низкомолекулярные соединения особенно стоит выделить активно разрабатываемый в последнее время подход с использованием микробных клеточных фабрик [88,89]. Благодаря современным подходам к исследованию метаболических путей для ряда микроорганизмов практически полностью изучен набор конвергентных катаболических путей, преобразующих смесь ароматических соединений (монолигнолы, дилигнаны и сходные вещества) в промежуточные соединения центрального метаболизма [89]. Также технология ферментации прокариот достаточно хорошо разработана, а бурно развивающиеся подходы метаболического инжиниринга позволяют эффективно “перепрограммировать” метаболизм подходящих для промышленного культивирования бактериальных штаммов в направлении получения высокого выхода целевых продуктов [90,91]. Однако для достижения эффективной микробной конверсии лигнин сначала должен быть деполимеризован, для чего естественным решением является использование ферментных систем грибов белой гнили [92,93].

В настоящее время основной проблемой при изучении модификации лигнина дереворазрушающими грибами и их ферментными системами является определение и характеристика отдельных соединений, образующихся в данном процессе. К сожалению, как традиционные методы химического анализа, так и современные методы аналитической спектроскопии (например, УФ спектроскопия, ИК-Фурье спектроскопия, спектроскопия комбинационного рассеяния и ЯМР) могут обеспечить только грубые осредненные оценки структурных компонентов и функциональных групп в лигнине [94,95]. С другой стороны, недавно появившаяся технология масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией и масс-анализатором ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием (ESI FT-ICR MS) позволяет выполнять полный покомпонентный анализ образца лигнина. Благодаря своей огромной разрешающей способности ESI FT-ICR MS может одновременно обнаруживать тысячи продуктов разложения лигнина, которым могут быть присвоены элементарные молекулярные формулы [96,97].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Микробиологические работы

#### 2.1.1 Используемый в работе штамм базидиального гриба белой гнили

Используемый в данной работе штамм базидиального гриба белой гнили *Trametes hirsuta* (LE-BIN 072) был получен из коллекции культур базидиомицетов ФГБУН Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН (ЛЕБИН) [98]. После получения из коллекции штамм хранился при температуре +4 °С на скошенном сусло-агаре, готовившемся путем разбавления пивного сусла (12 %) водой в объемном соотношении 1:4 с добавлением 2 % агара. Культуры хранили без пересева от шести месяцев до одного года без потери биосинтетической активности.

#### 2.1.2 Получение посевного материала

Для получения посевного материала грибной мицелий пересевался со скошенного сусло-агара на чашки Петри (d = 90 мм), содержащие сусло-агар того же состава. Чашки Петри культивировались в темноте при 28 °С до полного покрытия поверхности чашки мицелием гриба. Затем в коническую колбу объемом 750 мл, содержащую керамические бусы и 200 мл глюкозопептонной (GP) среды, вносили кусочки мицелия с чашек Петри (~ 1/4 чашки). Засеянные колбы инкубировали в темноте при 26-28 °С в течение 6-8 сут. Перед дальнейшим посевом на исследуемые среды мицелий гриба измельчали керамическими бусами при 250 об/мин в течение 15 мин. Засев осуществляли 20 мл полученной суспензии.

GP среда имела следующий состав (г/л): глюкоза – 10,0; пептон – 3,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,6;  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,4;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,0005;  $\text{MnSO}_4$  – 0,05;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{CaCl}_2$  – 0,25 [99]. Автоклавирование среды проводили при 120 °С и 1 атм. в течение 30 мин.

#### 2.1.3 Глубинное жидкофазное культивирование на средах различного состава

Процесс глубинного жидкофазного культивирования *T. hirsuta* проводили на контрольной GP среде и на средах, содержащих потенциальные индукторы биосинтеза ферментов лигнинолитического комплекса – 100 мг/л сульфонфталеинового красителя бромкрезолового зеленого (Sigma-Aldrich, США) и 2 г/л крафт лигнина (CAS 8068-05-1, Sigma-Aldrich, США). Внесение в среду крафт лигнина осуществлялось до ее автоклавирования, а внесение бромкрезолового зеленого – после автоклавирования через 0,2 мкм фильтр (Sartorius, Германия). После засева культивирование проводили при постоянном перемешивании (180 об/мин), при температуре 25 °С в темной аэрируемой камере Innova 44 (New Brunswick Scientific, США).

## 2.2 Биохимические работы

### 2.2.1 Исследование состава экзопротеома методом

Масс-спектрометрическое исследование секрета *T. hirsuta* проводилось 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) по методике аналогичной описанной в [100,101].

#### Пробоподготовка:

По окончании процесса культивирования полученную культуральную жидкость (~200 мл) отфильтровывали через бумажный складчатый фильтр с последующим продавливанием через 0,45 мкм шприцевый фильтр (Sartorius, Германия). Полученный фильтрат концентрировался (в 10 раз) и одновременно обессаливался с использованием тангенциальной ультрафильтрационной системы Labscale TTF (Millipore, США) и мембраны MW Biomax 5 (Millipore, США) с отсечением в 5 кДа. Дальнейшее концентрирование (в 30 раз) осуществляли с использованием фильтрационных пробирок Amicon Ultra Ultracel-15 (Millipore, США) с отсечением в 3 кДа. Полученный концентрат ресуспендировали восстанавливающим буфером (0,2 М Tris-HCl, pH 8,5; 2,5 мМ ЭДТА; 8 М мочевины) до концентрации белка 10 мг/мл.

После восстановления 0,1 М дитиотреитолом в течение 4 ч при 37 °С и алкилирования 0,05 М йодацетамидом в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре, белки осаждали добавлением 10 объемов ацетона, содержащего 0,1 % (v/v) трифторуксусной кислоты, при -20 °С в течение ночи. Полученный осадок отделяли центрифугированием (12000 g; 10 мин; 4 °С), дважды промывали 96 % этанолом, высушивали в роторном испарителе при 45 °С в течение 1 ч и ресуспендировали в 200 мМ аммоний-бикарбонатном буфере (pH 8,0) до концентрации белка 1 мг/мл. Полученный образец белков гидролизовали свиным трипсином (Promega, США) (фермент/белок 1:100) в течение 6 ч при 37 °С.

Полноту трипсинолиза проверяли с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE). Концентрация акриламида в линейном разрешающем геле составляла 12 %, а в концентрирующем – 5 %. Перед нанесением на гель образец инкубировали при 95 °С в течение 5 мин в денатурирующем загрузочном буфере (62,5 мМ Tris-HCl, pH 6,8; 2 % SDS; 25 % глицерина; 100 мМ DTT; бромфенолового синего). Нанесение осуществляли из расчета 1,5 мкг белка на лунку. Параллельно с образцом на гель также наносились стандарты молекулярных весов PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, США). Электрофорез проводили с использованием модуля Mini-Protean-

III (Bio-Rad, США) при постоянном напряжении в 200 V, пока фронт бромфенолового синего не достигал конца геля. Визуализацию геля осуществляли путем окрашивания 0,2 % раствором Кумасси бриллиантового синего.

На всех вышеперечисленных стадиях общая концентрация белка в образце определялась при помощи Bradford Protein Kit (Bio-Rad, США) в соответствии с инструкцией производителя.

#### **Масс-спектрометрическая идентификация:**

Подвергнутые трипсинулизу образцы (2 мкл) анализировались в трех повторностях на тандемной системе, включающей в себя: (1) высокоэффективную жидкостную хроматографию на nano-HPLC Agilent 1100 system (Agilent Technologies, США) с колонкой (75 мкм×12 см) Reprosil-Pur Basic C18 [3 мкм, 100 Å] (Dr. Maisch HPLC GmbH, Германия); (2) 7-Tesla LTQ-FT Ultra mass spectrometer (Thermo Electron, Германия) с электроспрей-источником ионов.

Разделение пептидов проводили при скорости потока 0,3 мкл/мин, используя 0,1 % (v/v) раствор муравьиной кислоты в воде (Растворитель А) и 0,1 % (v/v) муравьиной кислоты в ацетонитриле (Растворитель В). Колонку предварительно уравнивали: 3 % (v/v) Растворителем В в течение 15 мин с последующим линейным градиентом от 3 % до 50 % Растворителя В в течение 90 мин и изократическим элюированием 95 % Растворителя В в течение 15 мин. Возвратный шаг с 95 % до 3 % Растворителя В в течении 5 мин использовали для разделения пептидов.

Сбор данных MS/MS анализа выполнялся с использованием программы Xcalibur (ThermoFinnigan, США). Спектры ионов-предшественников ( $m/z$  300-1600) были получены в ICR-ловушке с разрешением  $R = 50000$  при  $m/z$  400. Пять наиболее интенсивных ионов были выделены и фрагментированы в LTQ, было использовано динамическое исключение с длительностью исключения 30 сек.

### **2.2.2 Исследование продуктов деградации крафт лигнина методом**

Для анализа с помощью масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье с ионизацией электрораспылением в режиме отрицательных ионов (англ. (-)ESI FT-ICR MS) образцы разбавляли водно-метанольным раствором (1:1) до концентрации 100 мг/л. Анализы проводили на масс-спектрометре FT MS Bruker Apex Ultra с гармонизированной ячейкой [102] (Bruker Daltonics, Германия), оснащенном сверхпроводящим магнитом 7 Тл и источником ионов ионизирующего электрораспыления (ESI). Описание условий получения спектров для анализа FT-ICR MS подробно описано в [103,104]. Данные FT-ICR MS обрабатывали с использованием браузерного приложения с

открытым исходным кодом UltraMassExplorer (<http://dockersrv1.awi.de:3838/ume>). Сгенерированные формулы CHONS были проверены путем установления разумных химических ограничений [105]: отношение  $O/C \leq 1$ ,  $0,3 < \text{отношение } H/C \leq 2,2$ ; количество элементов [ $C \leq 120$ ,  $H \leq 200$ ,  $0 < O \leq 60$ ,  $N \leq 2$ ,  $S \leq 1$ ]; и окно точности массы  $< 0,5$  ppm. Относительные интенсивности (далее просто интенсивности) компонентов получали нормированием на общую интенсивность приписываемых ионов. Обработка данных и разведочный анализ проводились с использованием R-пакетов «tidyverse» и «factoextra». Цветовые палитры были взяты из пакетов RColorBrewer и Polychrome R. Для анализа методом главных компонент использовались центрированные нестандартизированные данные. В тексте данные представлены как: Медиана [Нижний квартиль, Верхний квартиль].

Для молекулярных формул в формате  $C_cH_nO_oN_nS_s$  отнесение соединений к разным областям диаграммы ван Кревелена выполняли со следующими пороговыми значениями [106,107]: ( $0,00 \leq O/C < 0,30$ ,  $1,50 \leq H/C \leq 2,20$ ) для липидоподобной области, ( $0,30 \leq O/C < 0,65$ ,  $1,50 \leq H/C \leq 2,20$ ) для алифатической/пептидоподобной области, ( $0,65 \leq O/C \leq 1,00$ ,  $1,50 \leq H/C \leq 2,20$ ) для углеводоподобной области, ( $0,10 \leq O/C < 0,50$ ,  $0,70 \leq H/C < 1,50$ ) для области слабоокисленного лигнина, ( $0,50 \leq O/C \leq 1,00$ ,  $0,70 \leq H/C < 1,50$ ) для области окисленного лигнина, ( $0,00 \leq O/C < 0,50$ ,  $0,30 \leq H/C < 0,70$ ) для области конденсированных танинов и ( $0,50 \leq O/C \leq 1,00$ ,  $0,30 \leq H/C < 0,70$ ) для области гидролизуемых танинов.

Количество эквивалентов двойных связей (англ. double-bond equivalents, DBE) приходящееся на один атом углерода в молекуле рассчитывали по формуле:  $DBE = (1 + C + N/2 - H/2)/C$  [108]. Индексы CHO (англ. CHO indexes) рассчитывались по формуле:  $CHO \text{ index} = (2*O - H)/C$  [109,110].

## 2.3. Молекулярно-генетические работы

### 2.3.1 Экстракция суммарной РНК и обратная транскрипция

Для экстракции суммарной РНК мицелий гриба предварительно растирали в жидком азоте до появления гомогенного порошка белесого цвета. Экстракцию суммарной РНК проводили из ~ 100 мкл растертого мицелия с использованием реактива Trizol (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией производителя. В случае высокого пигментирования полученную суммарную РНК дополнительно очищали с использованием набора RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Количество и целостность полученного препарата суммарной РНК оценивали спектрофотометрически с применением наноспектрофотометра Nanodrop ND-1000 (LabTech International,

Великобритания) и методом электрофореза в 1,4 % агарозном геле. Перед дальнейшим использованием полученный препарат суммарной РНК обрабатывали DNase I (Thermo Scientific, США). Отсутствие контаминации геномной ДНК в обработанном DNase I препарате суммарной РНК проверяли с помощью набора Qubit dsDNA HS Assay Kit на флуориметре Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя. Также концентрацию итогового препарата суммарной РНК измеряли флуориметрически с помощью набора Qubit RNA HS Assay Kit на флуориметре Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США).

### 2.3.2 Измерение уровней транскрипции генов лакказ методом ПЦР в реальном времени

#### Подбор праймеров:

Конструирование геноспецифических праймеров для проведения ПЦР в реальном времени (qPCR) осуществлялось вручную на основе множественного выравнивания лакказных генов. Параметры подобранных праймеров оценивались с помощью программы Primer3 [111]. Последовательности праймеров приведены в таблице 1.

**Таблица 1. Последовательности праймеров, использованные при постановке qPCR.**

Целевой ген	Направление	5'-[Последовательность Праймера]-3'
<i>actin</i>	Прямой	5'-ACGTACAACCTCGATCTACAAGTG-3'
	Обратный	5'-TCCTTCTGCATACGGTCCGCAATACC-3'
<i><math>\beta</math>-tubulin</i>	Прямой	5'-CTCGTCTCCACTTCTTC-3'
	Обратный	5'-CCTCAACCTCCTTCATC-3'
<i>gapdH</i>	Прямой	5'-AACAACATCATCCCCTCCT-3'
	Обратный	5'-CGACCTTCTCCTCCGTGTA-3'
<i>rpb1</i>	Прямой	5'-CCACCCAACCTCAAATC-3'
	Обратный	5'-GTCGTTTGTCTGGCTG-3'
<i>rpb2</i>	Прямой	5'-ACCAACAACCTCCTTCTAC-3'
	Обратный	5'-GCAGATCATCACCGTCTCCTC-3'
<i>tef1</i>	Прямой	5'-TCTCCTCGCTTTCACC-3'
	Обратный	5'-TGTAGCCGACCTTCTT-3'
<i>lacA</i>	Прямой	5'-AGGGCCGCGCTCCCAGTG-3'
	Обратный	5'-AGCGGGCGCGCCGTCATAG-3'
<i>lacB</i>	Прямой	5'-CGTTCGCGGAAACCCCT-3'
	Обратный	5'-CGGGAGCTCCCTTGTACCGTAGAATAG-3'
<i>lacC</i>	Прямой	5'-AACGGTCTGGGCCGCTTT-3'
	Обратный	5'-TGCGGAGTTGATCCCGTC-3'
<i>lacD</i>	Прямой	5'-CCCACCTCTGAGCTCGCC-3'
	Обратный	5'-ACCCAGTGGCATTGAGGTTCT-3'

<i>lacE</i>	Прямой	5'-CGCTCGAATGGCACTCTCAC-3'
	Обратный	5'-TCGTAAGATGGCGGAGTTTACACCT-3'
<i>lacF</i>	Прямой	5'-GGCCGTACGACCACCAACAC-3'
	Обратный	5'-CCCGCAAATCCAGTCGTG-3'
<i>lacG</i>	Прямой	5'-GGTTTGGGCCGGTTCACT-3'
	Обратный	5'-TGACACCGCCAGAGAACGA-3'

#### **Валидация генов внутреннего контроля:**

Для выбора оптимальной комбинации генов внутреннего контроля была проверена транскрипционная стабильность шести генов-кандидатов: *actin*,  *$\beta$ -tubulin*, *gapdH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), *rpb1* (the largest subunit of RNA polymerase II), *rpb2* (RNA polymerase II second largest subunit), and *tef1* (translation elongation factor 1-alpha). Выбор генов внутреннего контроля осуществлялся с применением программы geNorm [112]. В результате проведенного анализа было выбрано два гена внутреннего контроля, а именно  *$\beta$ -tubulin* и *rpb2*, геометрическое среднее которых в дальнейшем использовалось для нормализации всех qPCR экспериментов [112].

#### **Параметры qPCR реакций:**

Все qPCR реакции проводились с использованием прибора StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, США). Все реакции проводились в объеме 20 мкл и включали 4 мкл qPCRmix-HS SYBR+ROX (Евроген, Россия), 0,3 мкМ прямого и обратного праймера и 125 нг кДНК, доведение объема осуществляли деионизованной водой Milli-Q® (mQH<sub>2</sub>O). Термоциклирование проводили по следующей схеме: начальная денатурация при 95 °С в течение 10 мин; 40 циклов амплификации (15 сек при 95 °С, 20 сек при 60 °С, 30 сек при 72 °С). После амплификации дополнительно проводился анализ кривых плавления полученных ПЦР продуктов, кривая плавления строилась в диапазоне от 70 °С до 95 °С с шагом в 1 °С/сек. Все реакции проводились минимум в трех технических повторностях, и ПЦР реакционная смесь без кДНК матрицы использовалась в качестве отрицательного контроля при каждом запуске прибора.

### 2.3.4 Измерение уровней транскрипции генов пероксидаз методом цифровой капельной ПЦР

#### Подбор праймеров:

Конструирование геноспецифических праймеров и TaqMan проб для проведения цифровой капельной ПЦР (ddPCR) осуществлялось вручную на основе множественного выравнивания пероксидазных генов. Параметры подобранных праймеров оценивались с помощью программы Primer3 [111]. Везде, где это было возможно, подобранные TaqMan пробы покрывали экзон-интронные границы. Последовательности праймеров приведены в таблице 2.

**Таблица 2.** Последовательности праймеров, использованные при постановке ddPCR.

Целевой ген	Направление	5'-[Репортер]-[Последовательность праймера]-[Гаситель]-3'
<i>MnP1</i>	Прямой	5'-AGTCTCTCCGCTCACAT-3'
	Обратный	5'-AACGTGATGATGGAGCCG-3'
	TaqMan проба	5'-Fam-CCCTGCCCTCTTTCGCCAGCACA-BHQ1-3'
<i>MnP2</i>	Прямой	5'-CATTGCCCGTCACAACAT-3'
	Обратный	5'-AGGATGCTATCGACGGTG-3'
	TaqMan проба	5'-R6G-TCGTCTTGATGTCTTTGTTGGACGCATAG-BHQ2-3'
<i>MnP3</i>	Прямой	5'-AGACACTCTACGCCCTCAC-3'
	Обратный	5'-GTTTCGTTCGCGGTGTTACAG-3'
	TaqMan проба	5'-Fam-AACCGCTAGCGCCGCACTCACTCGTC-BHQ1-3'
<i>MnP4</i>	Прямой	5'-AGAAGCTAAGTCCCCCATCC-3'
	Обратный	5'-GCTGCTGGTTGGTGACGAA-3'
	TaqMan проба	5'-Fam-CCTAGCGATGAGGTCGTCCGAGG-BHQ1-3'
<i>MnP5</i>	Прямой	5'-GGCTTTGCAGAGGAGAAGT-3'
	Обратный	5'-TGACCATCGAAGCCTGGTC-3'
	TaqMan проба	5'-Fam-TCAGATGCCGAACCTCGCCAGG-BHQ1-3'
<i>MnP6</i>	Прямой	5'-GGAGGTGCATGAGTCCCTC-3'
	Обратный	5'-CGTGGAAGTTGGTCTCGAT-3'
	TaqMan проба	5'-R6G-GCCCAAGATCCAGGCTACGGGCG-BHQ2-3'
<i>MnP7</i>	Прямой	5'-CGTCTCTTGTAGCGGTTCTT-3'
	Обратный	5'-GCGTTGGAGGCGGTGTTAA-3'
	TaqMan проба	5'-R6G-CAGGCTACCAACGGTGCTATTACTCGTTCG-BHQ2-3'
<i>LiP1</i>	Прямой	5'-GTTGGCTTCCTTCGTCTCTC-3'
	Обратный	5'-TTGCTCGCGACGTTCTTG-3'
	TaqMan проба	5'-Fam-CAGCGGAAGTCCAGCGGGGGCCAA-BHQ1-3'
<i>LiP2</i>	Прямой	5'-TTGCTCCCTTCCTTCGTTCG-3'
	Обратный	5'-AGCACGCTGCATTGGAAG-3'
	TaqMan проба	5'-R6G-TGCTGCTGTGCCGCTTCAGCGCCGT-BHQ2-3'
<i>LiP3</i>	Прямой	5'-GAACGCCGCGCTCACC-3'
	Обратный	5'-AAGTTCTCCTGGAGGTCGT-3'
	TaqMan проба	5'-Fam-TGGAAGAACAACGGCGACGAACGCCGCG-BHQ1-3'

<i>LiP4</i>	Прямой	5'-CAAGTTTGGTGGTGGAGGTG-3'
	Обратный	5'-GTTCGAAGCACCGATGGCA-3'
	ТақМан проба	5'-Fam-ACGCCATAACCTCTCGCACGCT-BHQ1-3'
<i>LiP5</i>	Прямой	5'-CTCACTCGGCGCGTTCG-3'
	Обратный	5'-AAGTTCTCCTGGAGGTCGT-3'
	ТақМан проба	5'-R6G-CGGCAAGAATACCGCAACCAACGCCGCA-BHQ2-3'
<i>LiP6</i>	Прямой	5'-CTCTCTGTTGTCTCCGTTGT-3'
	Обратный	5'-GTTGGTTCGCGGTGTTCTTG-3'
	ТақМан проба	5'-Fam-CGCGAATGCGGCGTTGACCCGC-BHQ1-3'
<i>LiP7</i>	Прямой	5'-CCTCCTTTGTCTCTCTCGCC-3'
	Обратный	5'-TTGCTCGCGACGTTCTTG-3'
	ТақМан проба	5'-R6G-CATCGGAGGTCCCGCTGGCGGCCAA-BHQ2-3'
<i>LiP8</i>	Прямой	5'-TATCGCGTTCTCTCCCGC-3'
	Обратный	5'-CCAGGGCAGTTCGAGACG-3'
	ТақМан проба	5'-R6G-CCAGAGATTGAGACAAACTTCCACCCCAA-BHQ2-3'

#### **Получение капельной эмульсии для ddPCR реакции:**

Исходная смесь (20 мкл) для получения капельной эмульсии содержала 10 мкл 2×ddPCR Supermix (Bio-Rad, США), 1 мкл смеси праймеров и пробы (500 нМ каждого праймера и зонда) и приблизительно 87,5 нг кДНК. Эмульсия приготавливалась на приборе QX100™ Droplet Generator (Bio-Rad, США) в картридже DG8 (Bio-Rad, США) с использованием 70 мкл Droplet Generator oil (Bio-Rad, США) и 20 мкл образца на лунку.

Все реакции проводились в трех технических повторностях, и исходная смесь без кДНК матрицы использовалась в качестве отрицательного контроля.

#### **Проведение ddPCR реакции:**

Полученная эмульсия каплей (33 мкл) переносилось в 96-луночный ПЦР планшет путем аспирации многоканальной пипеткой. ПЦР планшет герметизировали уплотнением из фольги и помещали в термоциклер T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Термоциклирование проводили по следующей схеме: начальная денатурация при 95 °С в течение 10 мин; 40 циклов амплификации (30 сек при 94 °С, 1 мин при 60 °С); финальная элонгация при 98 °С в течение 10 мин; охлаждение до 4 °С. Скорость нагрева составляла 2 °С/сек.

#### **Детектирование результатов ddPCR реакции:**

После амплификации капли считывались с помощью QX100™ Droplet Reader (Bio-Rad, США) для подсчета количества положительных и отрицательных капель на основе флуоресценции. Количество матричных молекул на микролитр исходного материала оценивалось программным обеспечением QuantaSoft Software (Bio-Rad, США) с использованием внутреннего алгоритма Пуассона.

## 2.4 Биоинформатика и статистическая обработка данных

### 2.4.1 Поиск генов лакказ и лигнинолитических пероксидаз в геноме *T. hirsuta* и *in silico* анализ предсказанных аминокислотных последовательностей

Для поиска генов лакказ и лигнинолитических пероксидаз, геном *T. hirsuta* был проаннотирован с использованием Funannotate pipeline v1.5.0 (<https://github.com/nextgenusfs/funannotate>). Дополнительно к полученной аннотации также использовался BLAST поиск [113] против ранее отсеквенированных генов лакказ и лигнинолитических пероксидаз *T. hirsuta* и других полипоровых грибов.

*In silico* расчет гипотетических молекулярных масс и изоэлектрических точек для каждой предсказанной аминокислотной последовательности проводили с помощью Sequence Manipulation Suite [114], инструментов ресурса ExPASy [115]. Сайты гликозилирования были предсказаны с помощью NetNGlyc 1.0 [116] (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/>).

### 2.4.2 Исследование эволюции мультигенных семейств лакказ и лигнинолитических пероксидаз полипоровых грибов

Для исследования эволюции мультигенных семейств лакказ и лигнинолитических пероксидаз полипоровых грибов, кроме генов, обнаруженных в геноме *T. hirsuta*, были использованы гены, проаннотированные в геноме *Steccherinum ochraceum* (доступном в GeneBank) и следующих 11 геномах (доступных в JGI): *Trametes versicolor* v1.0; *Trametes gibbosa* CIRM-BRFM 1770 v1.0; *Pycnoporus coccineus* CIRM-BRFM 310 v1.0; *Pycnoporus sanguineus* CIRM-BRFM 1264 v1.0; *Pycnoporus cinnabarinus* CIRM-BRFM 50 v1.0; *Polyporus arcularius* v1.0; *Polyporus brumalis* CIRM-BRFM 1820 v1.0; *Fomitopsis pinicola* FP-58527 SS1 v3.0; *Wolfiporia cocos* MD-104 SS10 v1.0; *Phanerochaete chrysosporium* RP-78 v2.2; *Phlebia brevispora* HNB-7030 SS6 v1.0.

Когда это было возможно, автоматически полученные геномные аннотации перепроверялись против экспериментально установленных структур генов, находящихся в GeneBank.

#### **Топология дерева видов:**

Топология дерева видов для выбранных грибов была извлечена из филогенетических деревьев, конструированных в рамках проекта PolyPEET [7,8], а основные события на эволюционной шкале развития отряда Polyporales были взяты из [50,117,118].

### **Первичное дерево генов:**

Для построения первичного филогенетического дерева генов множественное выравнивание последовательностей на основе кодонов было сделано с использованием MUSCLE алгоритма [119,120]. Подходящая модель замен, GTRГ + I, была выбрана с использованием программы jModelTest2 [121] с использованием информационного критерия Акаике (англ. Akaike information criterion, AIC). Реконструкция филогенетического дерева была проведена с использованием критерия максимального правдоподобия (англ. maximum likelihood criterion, ML) с применением программы RAxML-HP BlackBox (8.2.10) [122], запускавшейся на CIPRES Science Gateway сервере [123] (<https://www.phylo.org/>).

### **Направляемое синтенией, максимально экономичное согласование дерева генов с деревом видов с локальной перегруппировкой слабоподдерживаемых ветвей:**

Первичное дерево генов было в дальнейшем согласовано с деревом видов, с использованием процедуры направляемого синтенией, максимально экономичного согласования дерева генов с деревом видов с локальной перегруппировкой слабоподдерживаемых ветвей (англ. synteny-aware gene-tree/species-tree most parsimonious reconciliation procedure with simultaneous local rearrangements of the low supported branches). Эта методология была ранее теоретически описана и алгоритмически формализована в работах [124–127]; однако в нашем случае ручной коррекции было достаточно. Слабо поддерживаемые ветви на первичном геномном дереве были вручную перегруппированы (топологически ограничены, англ. topologically constrained) таким образом, чтобы свести к минимуму количество случаев потерь/дупликаций генов и поместить наиболее близко расположенные на хромосомах гены в ближайшей возможной топологической близости на дереве генов.

Итоговое дерево лакказных генов было реконструировано с применением программы RAxML-HP BlackBox (8.2.10) [122], запускавшейся на сервере CIPRES Science Gateway [123] (<https://www.phylo.org/>) при использовании GTRГ + I модели замен и описанными ранее топологическими ограничениями. Статистическая эквивалентность исходных и модифицированных топологий геномных деревьев была установлена с использованием критерия отношения правдоподобия. Значения бутстрапов было приписано ветвям с использованием программы SumTrees [128], основываясь на полученных при построении первичного дерева бутстрап-репликах.

### 2.4.3 Статистическая обработка данных

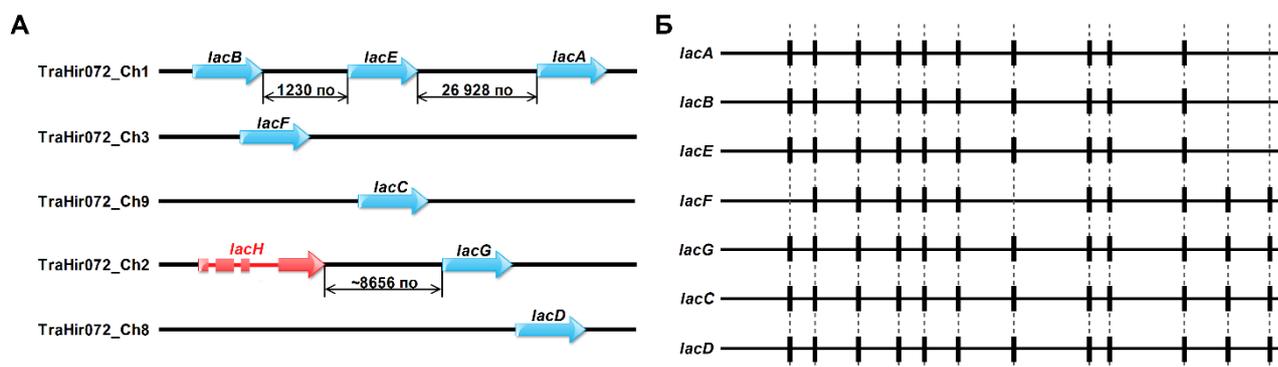
Во всех процедурах сравнения, результаты сначала анализировались с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с применением  $F$ -теста для проверки наличия значимых различий ( $p < 0,05$ ) между всеми средними. При обнаружении значимых различий, ANOVA сопровождалась апостериорными тестами HSD Тьюки (честно значимое различие) ( $p < 0,05$ ). Когда уместно, данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

#### 3.1.1 Геномная локализация и общая характеристика

В случае лакказ, *in silico* анализ отсеквенированного генома *T. hirsuta* показал наличие в нем 7 генов (*lacA* – *lacG*) со средней идентичностью в 65 % по нуклеотидным и в 68 % по аминокислотным последовательностям. Некоторые из этих генов, а именно *lacA*, *lacB*, *lacC*, *lacD* and *lacE*, были описаны ранее [129]. Транслированные открытые рамки считывания всех 7 лакказных генов содержали типичные для лакказ аминокислотные паттерны, включающие в себя необходимые для формирования активного центра остатки аминокислот [19,130], что говорит о полной функциональности белковых продуктов данных генов. Анализ экзон-интронной структуры лакказных генов показал ее существенную консервативность, так как 8 из 12 возможных мест расположения интронов были обнаружены у всех 7 генов (рисунок 4А). В дополнение к 7 описанным полнофункциональным генам лакказ был обнаружен один непроцессированный лакказный псевдоген *lacH*. Открытая рамка считывания этого непроцессированного псевдогена нарушается включением нескольких тандемно повторяющихся последовательностей, а область кодирования включает ряд нонсенс-мутаций.



**Рисунок 4.** Экзон-интронная структура генов лакказ *T. hirsuta* (А); взаимное расположение генов лакказ *T. hirsuta* на хромосомах гриба (Б).

Только 3 из 7 обнаруженных функциональных генов лакказ, а именно *lacB*, *lacE* и *lacA*, расположены на одной и той же хромосоме (TraHir072\_Ch1) с межгенными расстояниями 1230 п.о. между *lacB* и *lacE* и 28928 п.о. между *lacE* и *lacA* (рисунок 4Б). Все остальные обнаруженные гены лакказ располагаются на отдельных хромосомах. Кроме того, следует отметить, что обнаруженный непроцессированный псевдоген *lacH* расположен на той же хромосоме (TraHir072\_Ch2), что и *lacG* на расстоянии 8668 п.о.

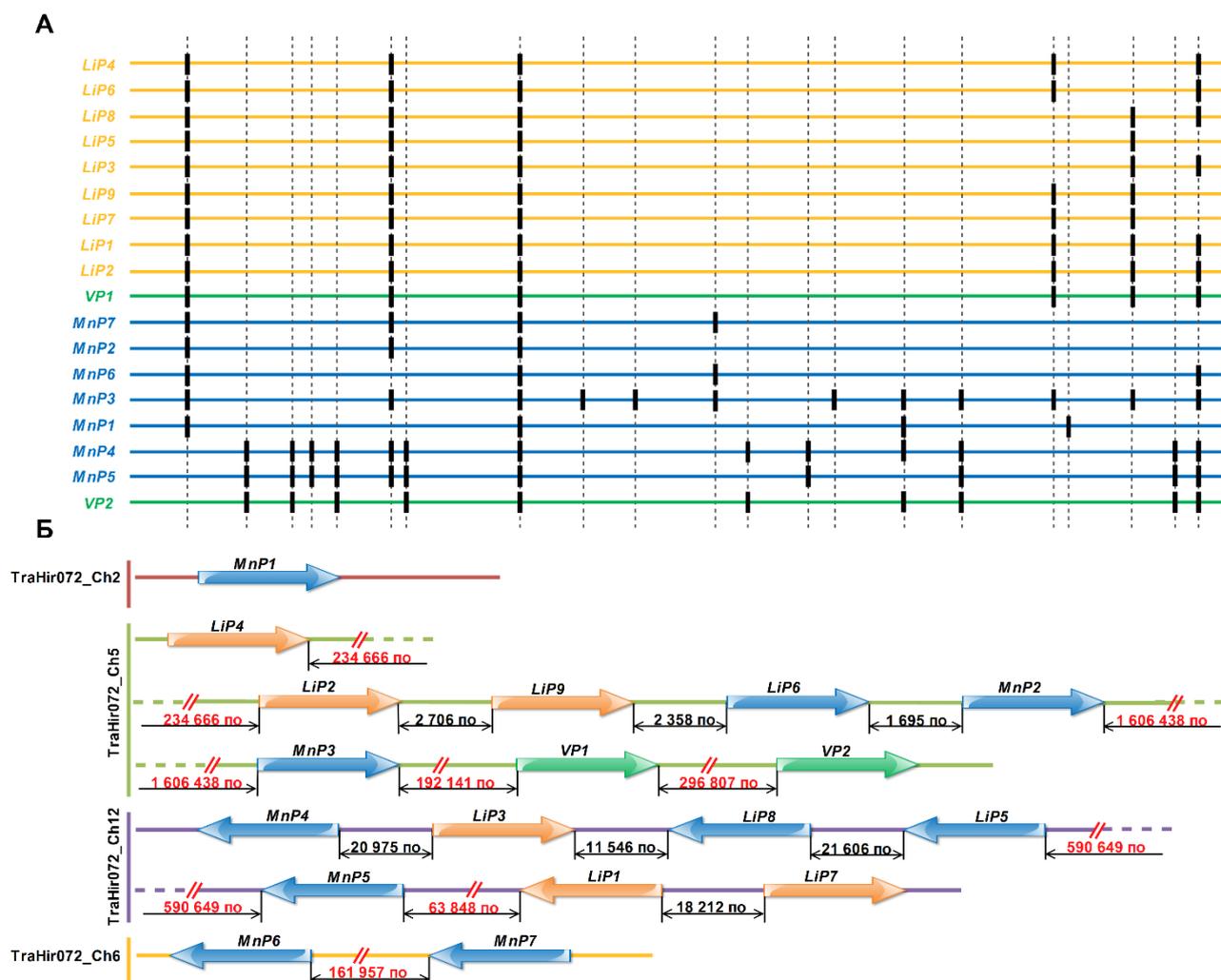
*In silico* анализ предсказанных аминокислотных последовательностей позволил рассчитать молекулярную массу  $M_w$ , изоэлектрическую точку  $pI$  и идентифицировать потенциальные сайты гликозилирования в белковых последовательностях лакказ *T. hirsuta* (таблица 3). Все последовательности содержали сигнальный пептид, типичный для секретируемых белков. Рассчитанные по аминокислотным последовательностям  $pI$  и молекулярные массы отличались незначительно и соответствовали типичным значениям для лакказ базидиальных грибов. Количество предсказанных сайтов гликозилирования варьировалось в диапазоне от 4 (у LacB) до 11 (у LacD).

**Таблица 3.** Свойства различных изоферментов лакказ *T. hirsuta*, предсказанные на основе первичных аминокислотных последовательностей.

Изофермент	$pI$	$M_w$ , кДа	Потенциальные сайты N-гликозилирования
LacA	5,39	55,9	72 NLTN
			238 NLTI
			313 NQTT
			354 NGSN
			457 NVTI
LacB	6,45	56,2	238 NLTI
			354 NGTN
			362 NATF
			457 NVTI
LacC	4,77	55,6	77 NSTM
			121 NVTD
			204 NSTN
			207 NLTV
			240 NMTI
			315 NQTT
			356 NGSA
			400 NSTV
			458 NVTI
LacD	5,97	57,6	75 NETM
			203 NPTS
			233 NFTI
			240 NMTI
			292 NATG
			316 NTTQ
			357 NFTK
			367 NVSF
			383 NGTL
			460 NVTV
			520 NITV
LacE	6,23	56,6	198 NGTL
			237 NMTI

			355 NGTN
			363 NVTF
			456 NVTI
<b>LacF</b>	5,33	56,2	79 NHTM
			320 NSTK
			358 NGTN
			402 NATI
			459 NVTI
<b>LacG</b>	4,75	55,9	74 NLTN
			204 NSTD
			240 NMTV
			315 NQTL
			356 NGS N
			400 NSTI
			458 NVTI

В случае лигнинолитических пероксидаз, *in silico* анализ генома *T. hirsuta* показал наличие в нем 18 генов. Одной из особенностей пероксидазного мультигенного семейства *T. hirsuta* является высокий процент идентичности как кодирующих нуклеотидных последовательностей генов, так и кодируемых ими первичных аминокислотных последовательностей белков. Почти для каждого гена семейства можно найти, по меньшей мере, еще два других гена с как минимум 70 % сходством нуклеотидных и 80 % сходством аминокислотных последовательностей. При этом основной вклад в различия между последовательностями вносят области с удалениями/вставками, а не с заменами аминокислотных остатков. Исходя из транслированных открытых рамок считывания, все детектированные в геноме *T. hirsuta* гены пероксидаз были отнесены в зависимости от наличия или отсутствия каталитических аминокислотных остатков [25] к MnP (семь штук, MnP1-MnP7), LiP (девять штук, LiP1-LiP9) и VP (две штуки, VP1 и VP2). Следует отметить, что для одной из марганец пероксидаз, MnP5, было обнаружено наличие нестандартных остатков в активном центре: аминокислотные замены E39/Q39 и D175/E175. Наличие подобных «нестандартных» остатков ранее уже наблюдалось, например, для MnP *T. versicolor*, *Heterobasidion annosum* и других грибов [50]. В целом, исходя из схожести экзон-интронной структуры генов (рисунок 5А), пероксидазы могут быть разделены на три группы: 1) группа, включающая все LiP и VP1; 2) группа, включающая MnP2, MnP6 и MnP7; 3) группа, включающая MnP4, MnP5 и VP2. При этом два гена – MnP1 и MnP3 – значительно отличались экзон-интронными структурами от остальных и поэтому не были отнесены ни к одной группе.



**Рисунок 5.** Экзон-интронная структура генов лигнинолитических пероксидаз *T. hirsuta* (А); Взаимное расположение генов лигнинолитических пероксидаз *T. hirsuta* на хромосомах гриба (Б).

Анализ расположения генов пероксидаз на хромосомах гриба позволил выявить наличие трех генных кластеров (рисунок 5Б): первый кластер (хромосома TraHir072\_Ch5) содержит гены LiP2, LiP9, LiP6 и MnP2 со средним межгенным расстоянием 2000 п.о.; второй кластер (хромосома TraHir072\_Ch12) содержит гены MnP4, LiP3, LiP8 и LiP5 со средним межгенным расстоянием 15000 п.о.; третий кластер (хромосома TraHir072\_Ch12) содержит гены LiP1 и LiP7, расположенные на расстоянии 18212 п.о. друг от друга. Другие гены пероксидаз располагаются либо на расстоянии более чем 60000 п.о. от вышеупомянутых, либо на отдельных хромосомах.

*In silico* анализ предсказанных аминокислотных последовательностей позволил рассчитать молекулярную массу, изоэлектрическую точку и идентифицировать потенциальные сайты гликозилирования в последовательностях белков лигнинолитических пероксидаз *T. hirsuta* (таблица 4). Все последовательности содержали сигнальный пептид, типичный для секретируемых белков. Рассчитанные по аминокислотным

последовательностям рI и молекулярные массы отличались незначительно и соответствовали типичным значениям для семейства лигнинолитических пероксидаз. Наибольшее количество потенциальных сайтов гликозилирования (три) было предсказано для изоферментов MnP5 и VP2.

**Таблица 4.** Свойства различных изоферментов лигнинолитических пероксидаз *T. hirsuta*, предсказанные на основе первичных аминокислотных последовательностей.

Изофермент	рI	Mw, кДа	Потенциальные сайты N-гликозилирования
MnP1	5,48	37,8	129 NLTA
MnP2	4,43	38,4	129 NISV
MnP3	4,70	38,4	129 NITA
MnP4	5,10	38,8	159 NVSR
			242 NGSN
MnP5	4,41	37,9	129 NVSF
			161 NDSQ
			237 NGTA
MnP6	4,82	38,7	128 NITT
MnP7	4,48	37,9	129 NITT
LiP1	5,10	39,8	287 NQTK
LiP2	4,73	39,4	287 NQTK
LiP3	4,72	39,3	129 NLSH
LiP4	4,63	38,6	129 NLSH
LiP5	4,63	38,6	129 NLSH
LiP6	4,89	39,6	129 NLSH
LiP7	4,86	39,2	287 NQTK
LiP8	4,55	39,3	129 NLSV
LiP9	4,41	38,3	129 NLSN
			240 NGTT
VP1	4,89	39,6	129 NLSH
VP2	4,52	38,8	127 NVSF
			159 NDSQ
			235 NGTL

### 3.2.2 Эволюционная история и ортологические группы

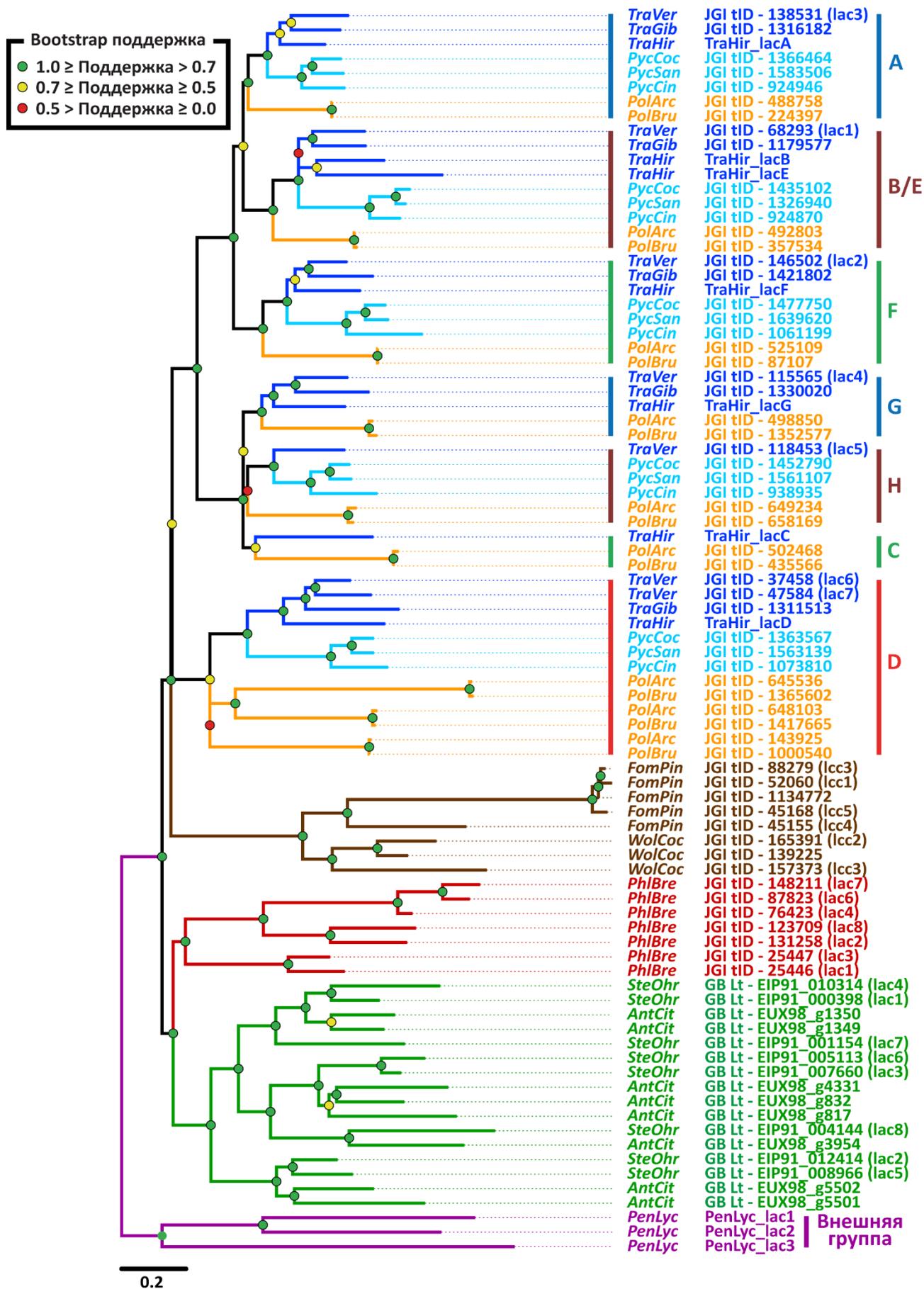
Для выявления ортологических групп лакказ и лигнинолитических пероксидаз, включающих изоферменты *T. hirsuta*, был проведен филогенетический анализ и построены эволюционные деревья, содержавшие кроме генов *T. hirsuta* гены 13 других грибов из порядка Polyporales. Выборка грибов для проведения анализа включала в себя типичных представителей всех четырех основных клад порядка Polyporales [7,8]: Базовая полипороидная клада была представлена восемью грибами – *T. hirsuta*, *Trametes versicolor*, *Trametes gibbosa*, *Pycnoporus coccineus*, *Pycnoporus sanguineus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Polyporus arcularius* и *Polyporus brumalis*; Антродиевая клада была представлена двумя грибами – *Fomitopsis pinicola* и *Wolfiporia cocos*; Флебиоидная клада была представлена двумя грибами – *Phanerochaete chrysosporium* и *Phlebia brevispora*; и Остаточная полипороидная клада была представлена двумя грибами – *Steccherinum ochraceum* и *Antrodiella citrenella*. Относительно типа разрушения древесины, все выбранные грибы были представителями белой гнили, исключение составляли два гриба бурой гнили из Антродиевой клады. Топология видового дерева для выбранных грибов была извлечена из ряда супер-деревьев, построенных под эгидой проекта PolyPEET [7,8] и объединена с временной шкалой эволюции порядка Polyporales, ранее полученной в работах [50,117,118].

В результате поиска генов лакказ и лигнинолитических пероксидаз в геномах вышеперечисленных грибов было собрано 86 неповторяющихся последовательностей лакказных генов и 166 неповторяющихся последовательностей генов лигнинолитических пероксидаз. Когда это было возможно, автоматически полученные геномные аннотации перепроверялись против экспериментально установленных структур генов. В случае генов лакказ, все выбранные грибы содержали в своем геноме от трех до девяти неаллельных копий генов, исключение составлял гриб *P. chrysosporium*, в геноме которого гены лакказ полностью отсутствовали. В случае генов лигнинолитических пероксидаз, все выбранные грибы содержали в своем геноме от восьми до 25 неаллельных копий генов, исключение составляли два гриба из Антродиевой клады, в чьих геномах гены лигнинолитических пероксидаз полностью отсутствовали.

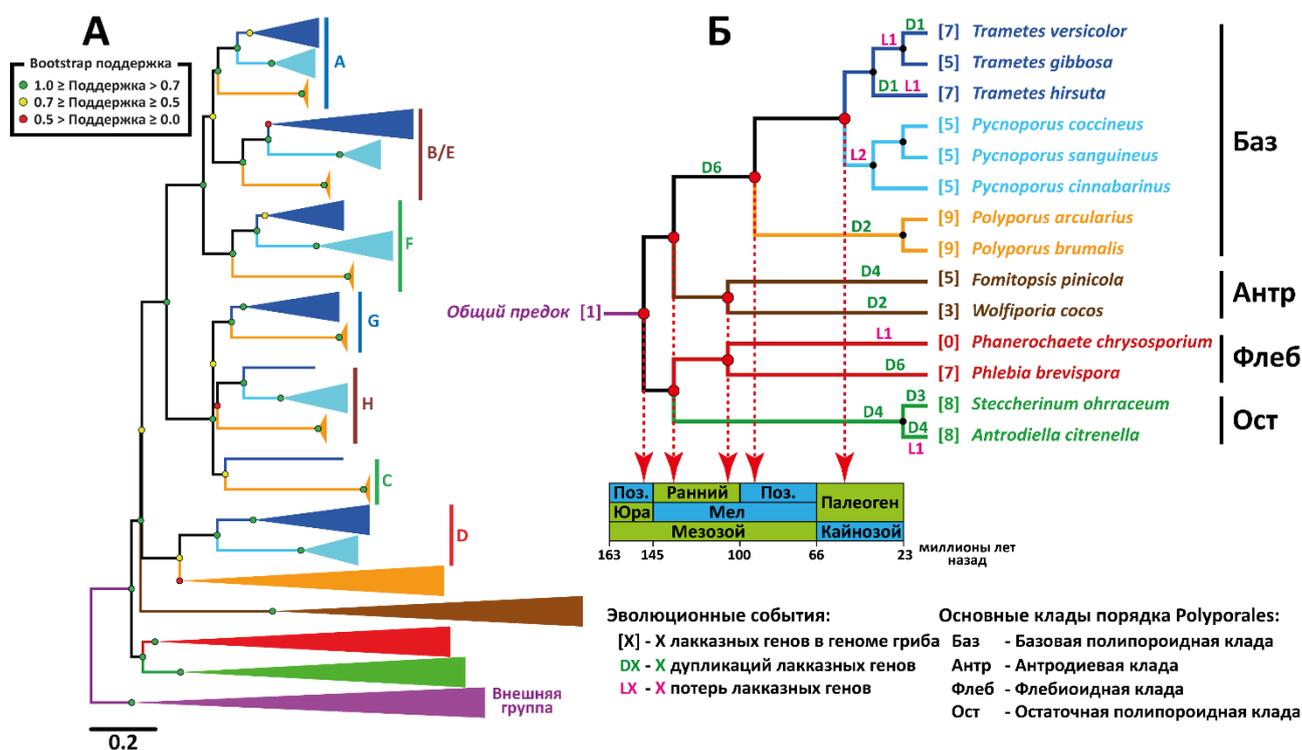
Реконструкция эволюционных взаимоотношений между генами проводилась в два этапа. На первом этапе исходное филогенетическое дерево генов было построено методом максимального правдоподобия, основываясь исключительно на выравнивании нуклеотидных последовательностей, и уровни поддержки каждой ветви на дереве были оценены Бутстрап-методом. Окончательное дерево было получено в результате применения процедуры “направляемого синтением, максимально экономичного согласования дерева генов с деревом

видов с локальной перегруппировкой слабоподдерживаемых ветвей” [124–127]. Вкратце, низко поддерживаемые ветви были перегруппированы таким образом, чтобы: (1) минимизировать количество случаев потери/дубликации генов; и (2) поместить наиболее поздно дублицированные и, как следствие, наиболее близко расположенные на хромосомах гены в ближайшей топологической близости на дереве.

Окончательное дерево лакказных генов представлено на рисунке 6, а основные результаты согласования дерева генов с деревом видов представлены на рисунке 7. Проведенный анализ согласования дерева генов с деревом видов позволяет предположить, что все гены лакказ в грибах порядка Polyporales произошли от одного предкового гена, однокопийность которого (отсутствие дубликаций) сохранялась до момента разделения порядка Polyporales на его четыре основные клады в позднем Юрском периоде. После того, как разделение порядка Polyporales на его четыре основные клады было завершено, единственный лакказный ген, пришедший в Базовую полипоридную кладу, дублицировался шесть раз в период между отделением этой клады в раннем Меловом периоде и до начала ее дальнейшего разделения в позднем Меловом периоде. После начала разделения Базовой полипоридной клады потери и дубликации генов лакказ были относительно редкими событиями: две дубликации, произошедшие после позднего Мелового периода, были обнаружены на ветви, ведущей к грибам *Polyporus* spp.; две потери гена, произошедшие после начала Палеогенового периода, были обнаружены на ветви, ведущей к грибам *Pycnoporus* spp.; одна потеря гена была обнаружена на ветви, ведущей к *T. versicolor* и *T. gibbosa*; одна дубликация гена была обнаружена на ветви, ведущей исключительно к *T. gibbosa* (видоспецифическая дубликация); одна видоспецифическая дубликация и одна видоспецифическая потеря гена были установлены для *T. hirsuta*. Для *P. brevispora* и грибов из Антродиевой клады наблюдались исключительно видоспецифические дубликации. Для *P. chryso sporium* была обнаружена потеря единственного предкового гена, что объясняет полное отсутствие генов лакказ в данном грибе. Для грибов Остаточной полипоридной клады были установлены четыре дубликации, произошедшие в предковой популяции грибов. После чего, на ветви ведущей к *S. ohrraceum*, было обнаружено три дубликации, а на ветви, ведущей к *A. citronella*, – четыре дубликации и одна потеря гена.



**Рисунок 6.** Эволюционные взаимоотношения между генами лакказ полипоровых грибов, и выделение ортологических групп, включающих в себя лакказы *T. hirsuta*

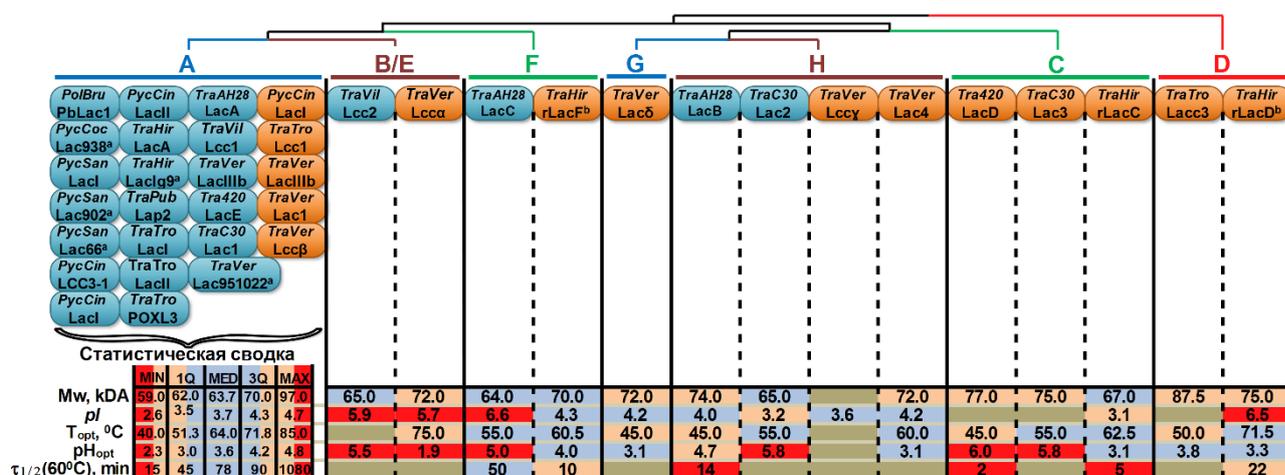


**Рисунок 7.** Результаты согласования дерева генов лакказ (А) с деревом видов грибов порядка Polyporales (Б). Исходя из установленных событий дупликаций и потерь лакказных генов (отмеченных на дереве видов), на дереве генов были выделены ортологические группы генов, содержащие лакказы *T. hirsuta*. Ортологические группы были названы исходя из названия входящих в них лакказных генов *T. hirsuta*.

Проведенный филогенетический анализ позволил выделить семь ортологических групп, включающих в себя лакказы *T. hirsuta*, при этом каждой группе было присвоено сокращенное название (от А до Н) в соответствии с названием входящих в нее лакказ данного гриба (рисунок 6). Стоит отметить, что ортологическая группа Н включает в себя непроцессированный псевдоген *lacH*, который не указан на дереве, поскольку фактически является потерянным геном, остатки которого все еще детектируются в геноме. Уровень объединения генов в ортологические группы был выбран таким образом, чтобы каждый входящий в группу ген находился в отношении ортологии к любому другому гену в группе. Исключение составила только ортологическая группа В/Е, включившая в себя два гена *T. hirsuta*, являющихся продуктами видоспецифической дупликации. Такое объединение генов в ортологические группы позволяет осуществлять прямое обобщение свойств лакказ, относящихся к одной группе, то есть применять ортологическую гипотезу [131–133].

Относя ранее охарактеризованные и систематизированные в работе [134] 37 изоферментов лакказ из 12 грибов Базовой полипороидной клады к упомянутым выше ортологическим группам (рисунок 8), можно заключить, что почти все нативно полученные лакказы, которые были описаны в литературе до сих пор, принадлежат к группе А. Эти

изоферменты продуцируются грибами Базовой полипорной кланды при большом разнообразии условий культивирования, сохраняя при этом стабильно высокий уровень транскрипции. Напротив, нативная продукция лакказы из других ортологических групп всегда наблюдалась в очень специфических условиях культивирования, таких как: индукция 2,5-ксилидином для лакказы группы **В/Е** из *T. villosa* [135]; совместное культивирование с *Trichoderma* sp. ZH1 для лакказы группы **F** из *Trametes* sp. AH28-2 [136]; комбинированная индукция CuSO<sub>4</sub> и *n*-гидроксибензоатом для лакказы группы **Н** из *Trametes* sp. C30 [137]; и наличие в среде культивирования целлобиозы и 3,5-дигидрокситолуола для лакказы группы **Н** из *Trametes* sp. AH28-2 [138].



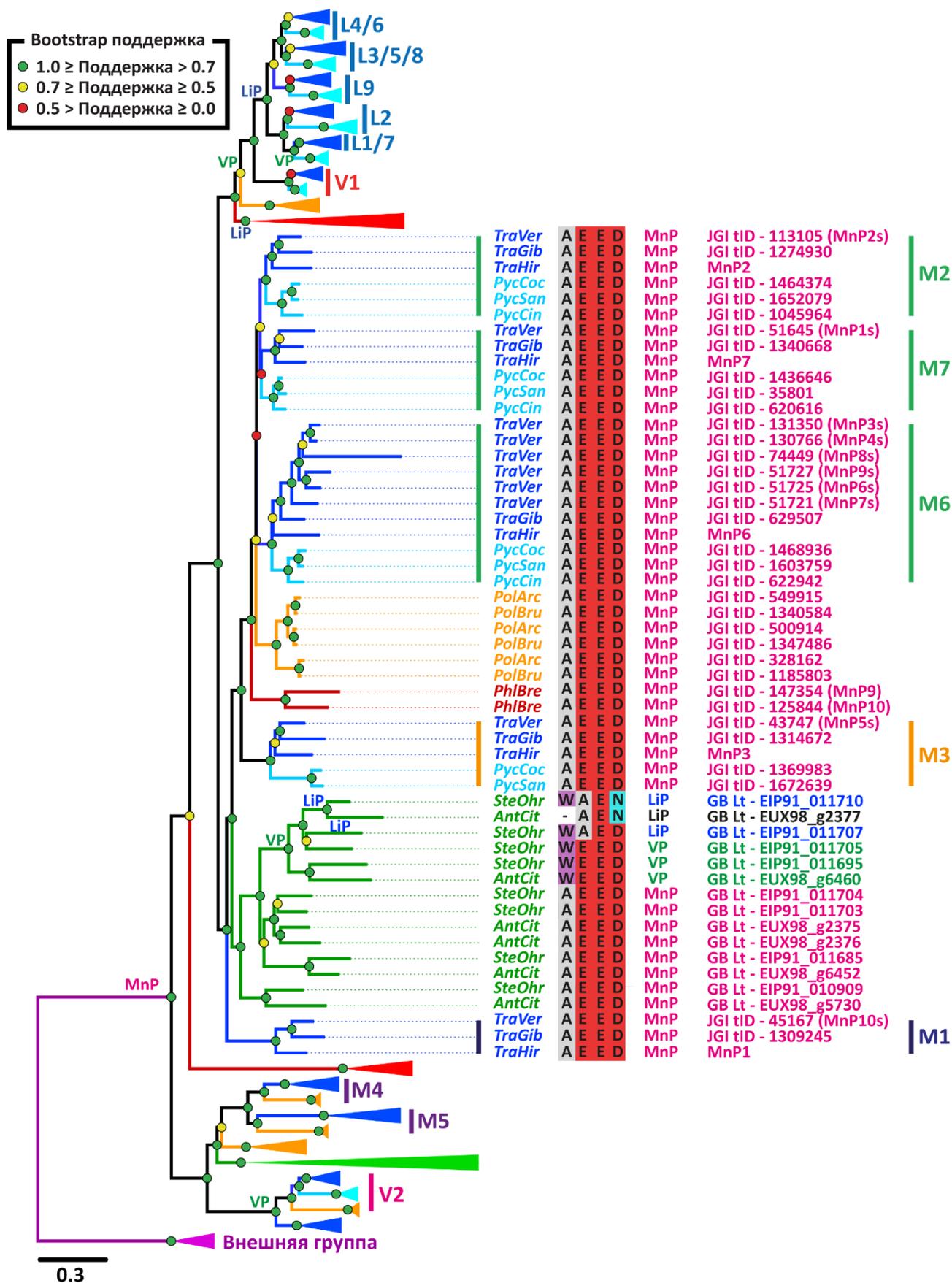
**Рисунок 8.** Результаты классификация изоферментов лакказ с ранее охарактеризованными свойствами на основе ортологии. Филогенетические отношения между различными ортологическими группами представлены дендрограммой. Синие овалы представляют изоферменты лакказ, полученные нативно, а оранжевые – рекомбинантно. 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.

При сопоставлении физико-химических свойств лакказ из различных ортологических групп можно отметить, что по сравнению со средними значениями для лакказ из группы **A** все описанные в настоящее время лакказы групп **В/Е** и **F** характеризовались необычно высокими значениями *pI* – около шести; *pH* оптимумы многих лакказ из групп **В/Е-Н** находились в нейтральной, а не в кислой области; лакказы из групп **В/Е-Н** почти всегда характеризовались более низкой термостабильностью. К сожалению, основанная на ортологии классификация изоферментов лакказ выявила существенный пробел в современных знаниях об их каталитических свойствах (*K<sub>M</sub>* и *k<sub>cat</sub>*). Небольшое количество очищенных изоферментов лакказ из групп **В/Е-Н** и различные условия (например,

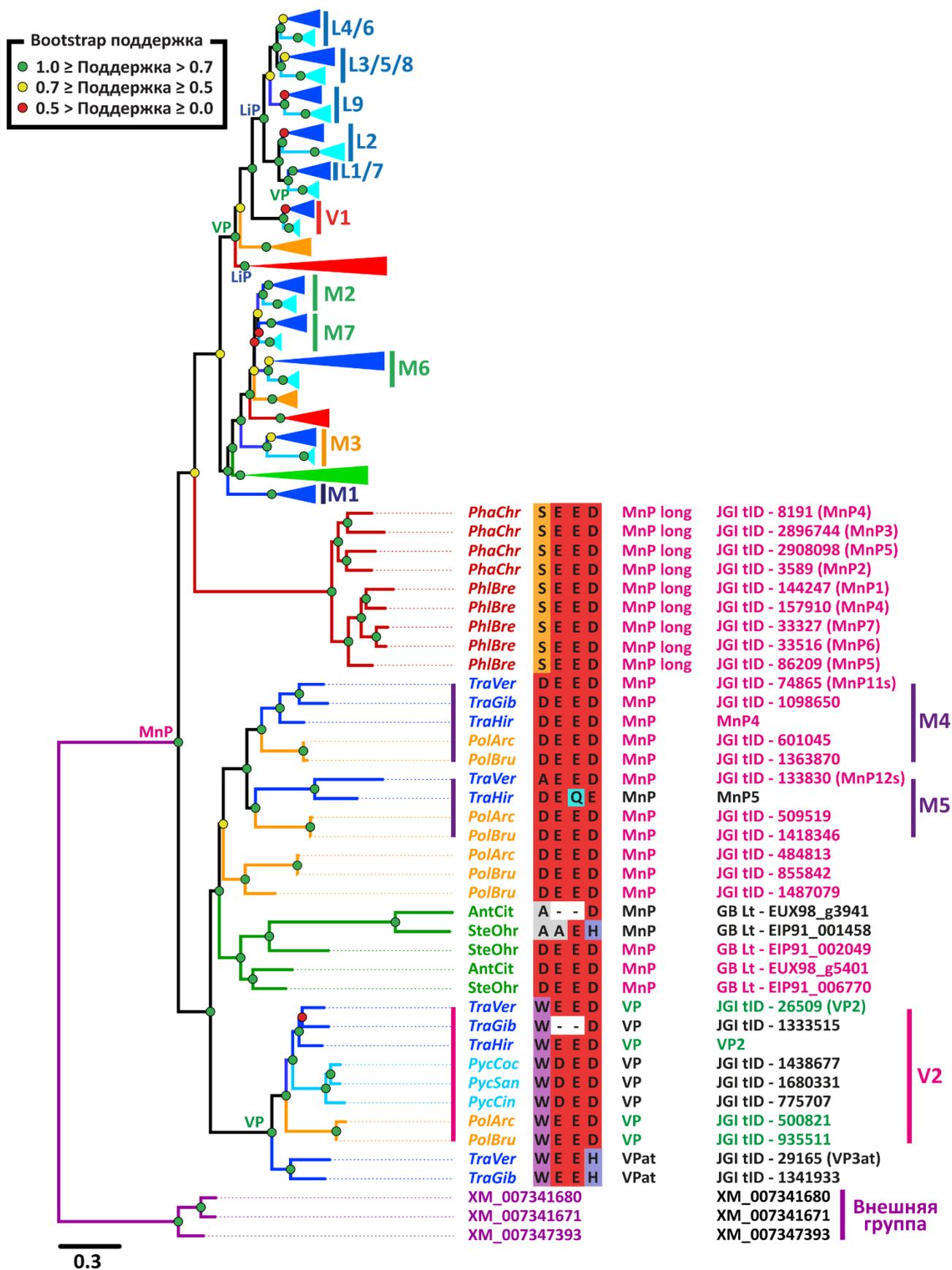
субстраты, буферы, рН и температура), при которых были измерены их свойства, не позволяют выявить какие-либо определенные тенденции.

Окончательное дерево генов лигнинолитических пероксидаз представлено на рисунке 9, а основные результаты согласования дерева генов с деревом видов представлены на рисунке 10. Проведенный анализ согласования дерева генов с деревом видов предполагает, 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. Это соответствует ранее полученным результатам, предполагавшим обширную дупликацию генов лигнинолитических пероксидаз в период между Каменноугольным и Юрским периодами [50]. 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 полипоройдной клады в раннем Меловом периоде и до начала ее дальнейшего разделения в позднем Меловом периоде, на которой было зафиксировано три дупликации гена. В предковой популяции грибов Антродиевой клады множественные потери привели к полному отсутствию генов лигнинолитических пероксидаз в данных грибах. После начала разделения Базовой полипоройдной клады наблюдались как множественные события дупликаций, так и потерь генов. Однако, число дупликаций (от 4 до 10) значительно превышало число потерь (от 1 до 4). Отдельно следует отметить значительное число видоспецифичных дупликаций для *T. versicolor* (10) и *T. hirsuta* (4), а также переход одного гена VP в LiP, произошедший между поздним Меловым периодом и началом Палеогенового периода, четыре дупликации которого привели к формированию отдельной клады LiP (содержащей подкладу VP у грибов *Pycnoporus* spp., образовавшуюся в результате ревертантной мутации) у грибов *Pycnoporus* spp. и *Trametes* spp. Для грибов Флебиоидной клады произошедший в предковой популяции переход одного гена VP в LiP привел к полному отсутствию VP в данных грибах и образованию отдельной клады LiP. Для грибов Остаточной полипоройдной клады в результате перехода в предковой популяции одного гена MnP в VP с последующим переходом в LiP (что фактически независимо повторяет данный процесс в грибах Базовой полипоройдной клады) сформировалась отдельная подклада, содержащая все типы лигнинолитических пероксидаз.

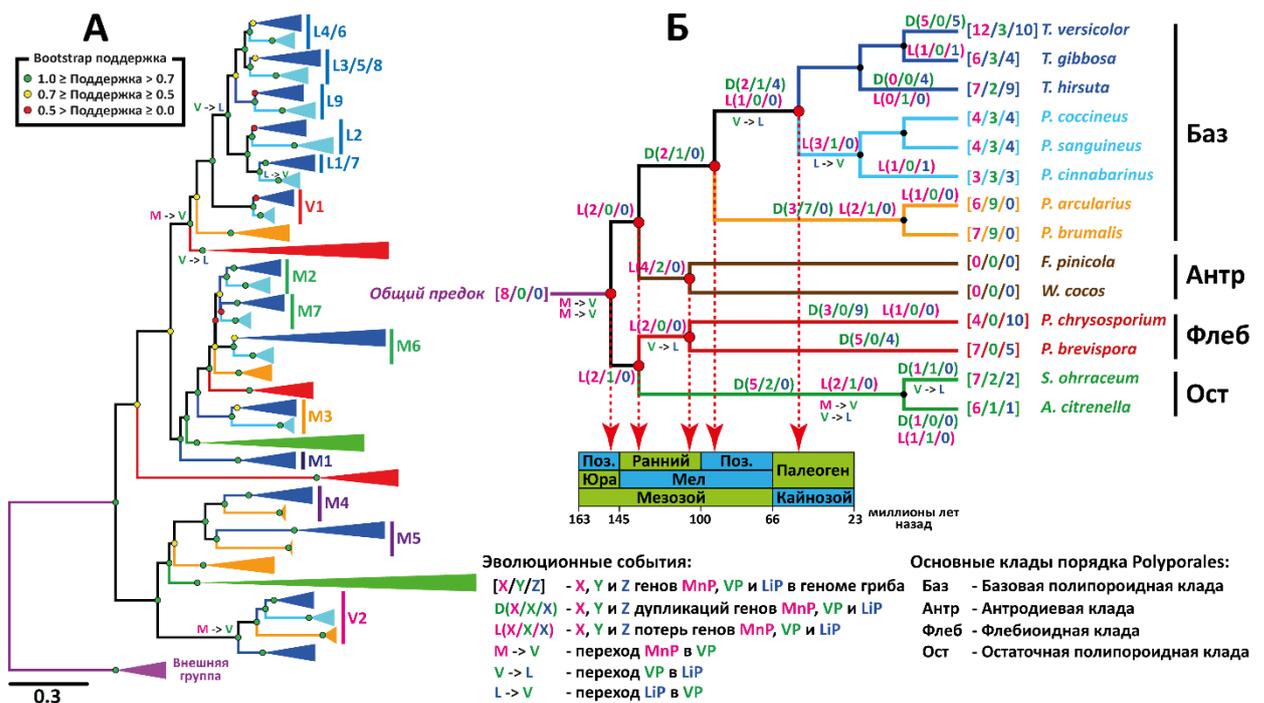




**Рисунок 9 (продолжение).** Эволюционные взаимоотношения между генами лигнинолитических пероксидаз полипоровых грибов и выделение ортологических групп, включающих в себя пероксидазы *T. hirsuta*. Аминокислоты, принимающие участие в связывании гема и катализе, показаны рядом с соответствующим геном.



**Рисунок 9 (продолжение).** Эволюционные взаимоотношения между генами лигнинолитических пероксидаз полипоровых грибов и выделение ортологических групп, включающих в себя пероксидазы *T. hirsuta*. Аминокислоты, принимающие участие в связывании гема и катализе, показаны рядом с соответствующим геном.



**Рисунок 10.** 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*.

Проведенный филогенетический анализ позволил выделить 14 ортологических групп, включающих в себя лигнинолитические пероксидазы *T. hirsuta* (рисунок 9), при этом каждой группе было присвоено сокращенное название в соответствии с типом входящих в группу пероксидаз (М – для MnP, L – для LiP и V – для VP) и нумерацией (от 1 до 8) входящих в нее генов *T. hirsuta* (например, L4/6 и V1). Из-за большого числа видоспецифичных дупликаций для *T. versicolor* и *T. hirsuta* уровень объединения генов в ортологические группы был выбран таким образом, чтобы каждый входящий в группу ген находился в отношении ортологии к любому другому гену в группе или в отношении паралолии к генам, принадлежащим тому же виду гриба. К сожалению, ввиду малого количества охарактеризованных изоферментов пероксидаз, которые возможно было бы отнести к той или иной выделенной ортологической группе на основе полных или частичных нуклеотидных/аминокислотных последовательностей, на данный момент никаких обобщений, аналогичных лакказам, сделать невозможно.

Таким образом, в геноме *T. hirsuta* было обнаружено 7 генов, кодирующих лакказы, и 18 генов, кодирующих лигнинолитические 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 образовывать кластеры на хромосомах. Как для пероксидаз, так и для лакказ была предсказана принципиальная возможность секреции нескольких изоформ, отличающихся гликозилированием. В целом для лакказ было предсказано значительно больше потенциальных сайтов гликозилирования, нежели для пероксидаз.

Результаты согласования дерева генов с деревом видов, для которого имелась временная шкала, показали, что все гены лакказ *T. hirsuta* (как и других грибов Базовой полипороидной кланды) произошли от одного предкового гена, множественная дупликация которого может быть приблизительно отнесена ко второй половине раннего Мелового периода – времени начала расцвета покрытосеменных растений, приведшего в конечном итоге к их преобладанию над голосеменными в конце Мелового периода [139,140]. Несмотря на то, что покрытосемянные растения предоставляли новую мега-нишу для дереворазрушающих грибов, в особенности грибов белой гнили [117], специфика состава их древесины существенно затрудняла 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 [141–145]. Новый тип лигнина был не только более устойчивым к разрушению [146], но и его деградация приводила к большему разнообразию фенольных продуктов, которые было необходимо детоксифицировать. Хотя дереворазрушающие грибы того времени уже имели несколько копий генов лигнинолитических пероксидаз в их геномах, по-видимому, этого было недостаточно для быстрого, эффективного и конкурентного освоения вновь образованной экологической ниши. Более того, проведенное исследование показало, что в течение рассматриваемого периода времени происходило сравнительно небольшое количество дупликаций генов пероксидаз, обширная параллельная дупликация которых в разных линиях порядка Polyporales относится к более поздним периодам времени.

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 [117]. 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 тоже 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 [147,148]. 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 ( $Fe_2O_3 \times nH_2O$ ). В тоже время биодоступность меди возрастала ввиду образования хорошо растворимых и менее токсичных по сравнению с  $Cu^+$  соединений  $Cu^{2+}$  [149].

Таким образом, для дереворазрушающих грибов на ранних стадиях адаптации к новому субстрату – древесине покрытосеменных растений – наличие нескольких копий лакказных генов, по-видимому, было эволюционно более выгодным, чем расширение мультигенного семейства пероксидаз. В случае грибов из подклады *Phanerochaetaceae*, которые потеряли предковый лакказный ген на ранней стадии эволюции, можно предположить, что расширение структурно сходного и эволюционно связанного мультигенного семейства лакказоподобных мультимедных оксидаз в этих грибах компенсировало потерю *sensu stricto* лакказ, хотя для более определенных выводов необходим дополнительный анализ времени дупликаций этих генов.

Позиционирование изоферментов лакказ и лигнолитических пероксидаз с ранее описанными свойствами в выделенные на основе сконструированных филогенетических деревьев ортологические группы 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 же время 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.

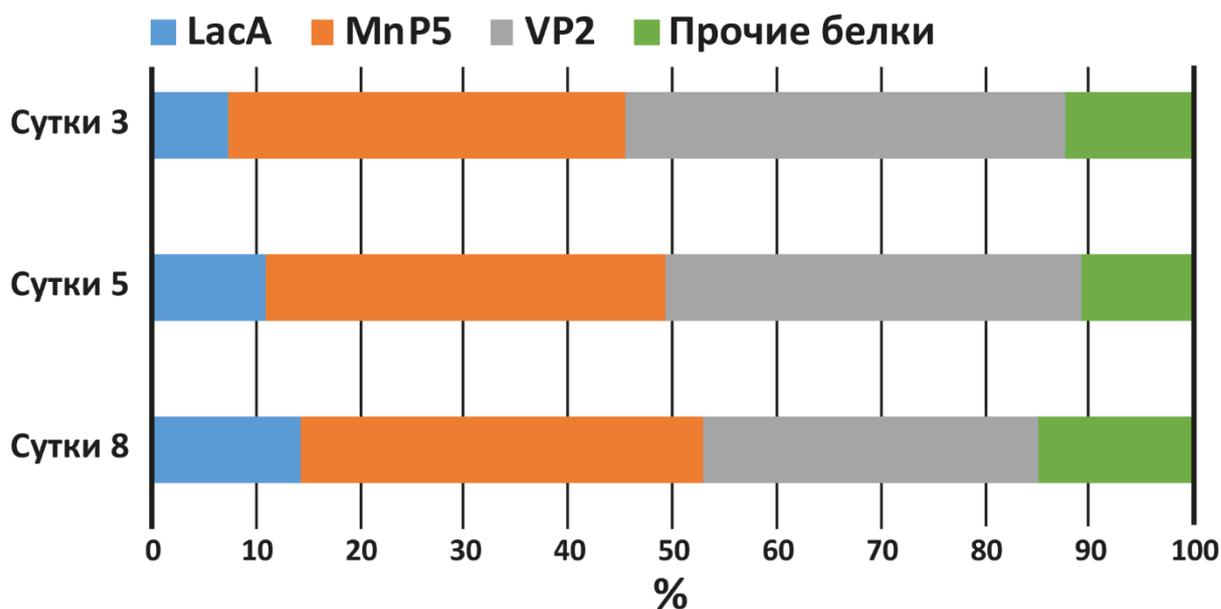
## **3.2 Секретия и транскрипция лакказ и лигнинолитических пероксидаз при культивировании на контрольной среде**

### **3.2.1 Изменение состава экзопротеома**

Для исследования секретии лигнинолитических пероксидаз и лакказ *T. hirsuta* культивировали на GP среде. Отбор культуральной жидкости осуществляли на 3-и, 5-е и 8-е сутки культивирования, соответствовавшие началу логарифмической, середине логарифмической и началу стационарной фаз роста гриба. Отобранная культуральная жидкость концентрировалась, а из полученного концентрата производилось высаживание белков.

Высаженные белки экзопротеома анализировались методом HPLC-(+)ESI FT-ICR MS/MS: Смесь белков подвергалась трипсинолизу, и разделялась высокоэффективной жидкостной хроматографией с последующей масс-спектрометрической идентификацией пептидов на приборе с электрораспылительной ионизацией и масс-анализатором ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием.

Результаты исследования экзопротеома представлены на рисунке 11. На всех сутках культивирования из 7 возможных изоферментов лакказ в экзопротеоме была обнаружена только LacA, а из 18 возможных изоферментов лигнинолитических пероксидаз – только MnP5 и VP2. В течение культивирования вклад LacA в экзопротеом незначительно увеличивался с 7 % на 3-и сутки культивирования до 17 % на 8-е сутки. В то же время вклад VP2 незначительно снижался с 42 % на 3-и сутки до 31 % на 8-е сутки. Вклад MnP5 в общий экзопротеом оставался постоянным в течение всего процесса культивирования и составлял 38 %.



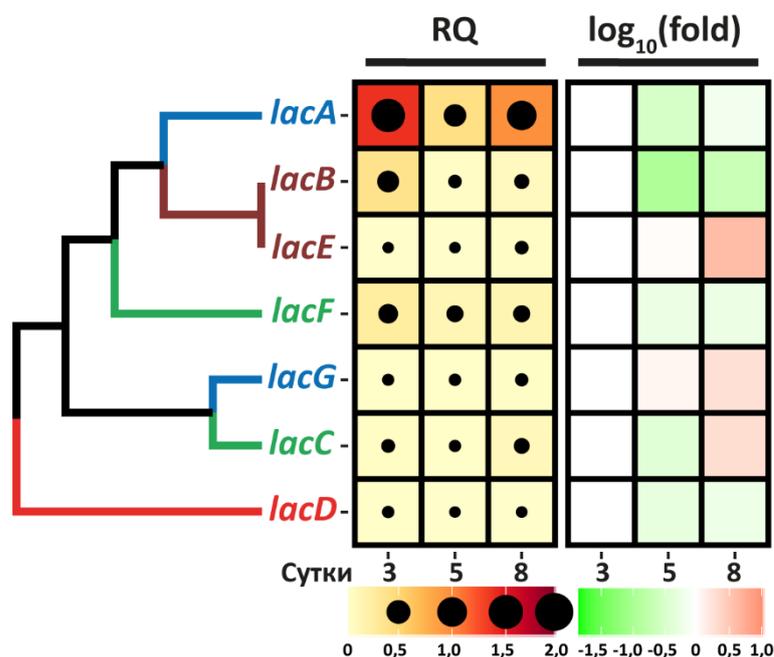
**Рисунок 11.** Изменение относительного содержания белков в экзопротеоме *T. hirsuta* при культивировании на контрольной GP среде. Прочие белки – все белки, кроме лакказ и пероксидаз.

### 3.2.2 Закономерности транскрипции

Для исследования транскрипции лигнинолитических пероксидаз и лакказ, мицелий *T. hirsuta*, отобранный на 3-и, 5-е и 8-е сутки культивирования на GP среде (тоже самое культивирование, что и для экзопротеомного исследования, п. 3.3.1), растирали в жидком азоте. Из растертого мицелия осуществляли выделение тотальной РНК с последующей обратной транскрипцией поли(А)-РНК. Уровни транскрипции генов лакказ измерялись методом qPCR. Уровни транскрипции генов лигнинолитических пероксидаз, в виду высокой степени их идентичности, измерялись методом ddPCR.

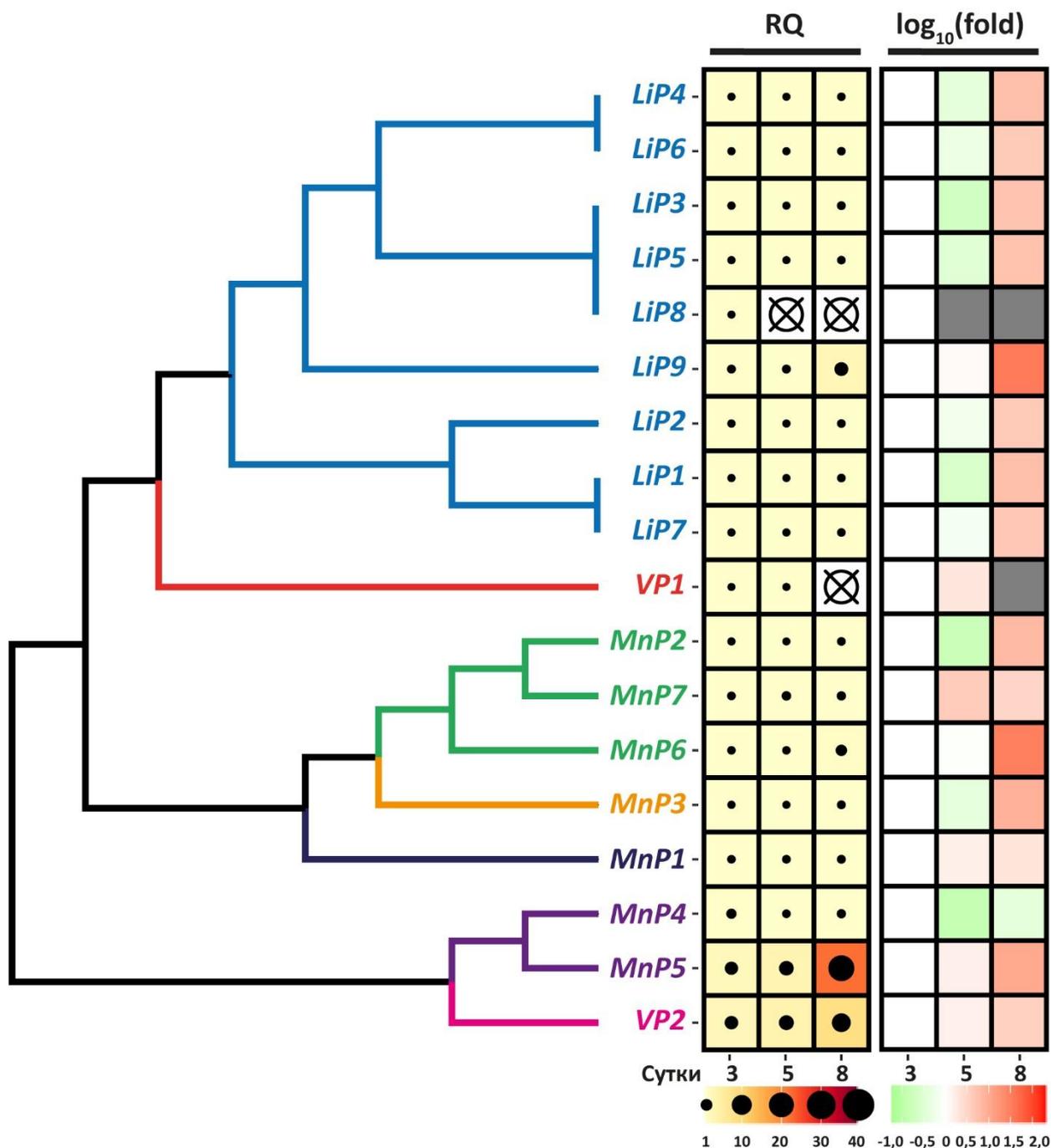
Изменение уровня транскрипции генов лакказ приведено на рисунке 12. На всех сутках культивирования была отмечена транскрипция всех 7 генов лакказ. При этом в течение всего культивирования преобладающим по уровню транскрипции геном являлся *lacA* – уровень его транскрипции был примерно на 1-2 порядка (в 10-100 раз) выше, чем у остальных генов. Максимальный уровень транскрипции *lacA* наблюдался на 3-и сутки культивирования, после чего его транскрипция уменьшалась в 4 раза на 5-е сутки и увеличивалась почти до исходного уровня на 8-е сутки. Для *lacB*, *lacD* и *lacF* уровни транскрипции уменьшались после 3-их суток культивирования, оставаясь постоянными на 5-е и 8-е сутки. В случае *lacB* уровни транскрипции на 5-е и 8-е сутки культивирования были в 8 раз ниже, чем на 3-и сутки, а в случае *lacD* и *lacF* – в 2 раза. Для *lacE* уровни транскрипции на 3-и и 5-е сутки культивирования не отличались и были в 5 раз меньше, чем на 8-е сутки. Для *lacC* уровень транскрипции на 5-е сутки культивирования был в 3 раза ниже, чем на 3-и сутки, а на 5-е

сутки в 2 раза выше. Уровень транскрипции *lacG* оставался практически неизменным на протяжении всего культивирования.



**Рисунок 12.** 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-е сутки культивирования.

Изменение уровня транскрипции генов лигнинолитических пероксидаз приведено на рисунке 13. В целом, на всех сутках культивирования была отмечена транскрипция практически всех 18 генов пероксидаз, исключение составляли *LiP8* и *VP1*. Транскрипция *LiP8* не обнаруживалась на 5-е и 8-е сутки культивирования, а *VP1* – на 8-е 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. Для всех генов пероксидаз было характерно уменьшение уровня транскрипции в 2-4 раза на 5-е сутки культивирования с последующим увеличением на 8-е сутки. В основном на 8-е сутки культивирования транскрипция пероксидаз увеличивалась в 5-10 раз по сравнению с 3-ми сутками. Наибольшее увеличение уровня транскрипции наблюдалось для *MnP6* и *LiP9*, чья транскрипция на 8-е сутки культивирования увеличилась соответственно в 35 и 40 раз по сравнению с 3-ми сутками. Только для *MnP4* уровень транскрипции на 8-е сутки культивирования был меньше (в 3 раза) по сравнению с 3-ми сутками.



**Рисунок 13.** 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-е сутки культивирования.

Таким образом, при росте *T. hirsuta* на контрольной GP среде основными секретируемыми белками являлись один изофермент лакказы (LacA) и два изофермента лигнинолитических пероксидаз (MnP5 и VP2). Видимое отсутствие в экзопротеоме других изоферментов лакказ и пероксидаз, несмотря на их ненулевые уровни транскрипции, может объясняться их малой представленностью и невысокой стабильностью, что крайне затрудняет их масс-спектрометрическую идентификацию. Действительно, ранее было

установлено [134], что стабильность двух рекомбинантно полученных изоферментов лакказ *T. hirsuta* (rLacF и rLacD) существенно ниже таковой для LacA (рисунок 8). Так же 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 *Pycnoporus* (*P. coccineus*, *P. sanguineus* и *P. cinnabarinus*) только 50 % всех секретируемых ферментов, для которых была установлена транскрипция, обнаруживались в экзопротеомах [150].

Полученные данные подкрепляют ранее выдвинутую гипотезу о конститутивной (т.е. в отсутствие индукторов) продукции ряда лигнинолитических экзоферментов дереворазрушающими грибами [151]. Предполагается, что при появлении в среде культивирования лигнинсодержащего субстрата данные экзоферменты осуществляют его первичную деполимеризацию, а появляющиеся в этом процессе молекулы продуктов деструкции действуют как индукторы продукции других лигнинолитических экзоферментов (также допускается индукция по принципу обратной связи и самих конститутивных экзоферментов). Однако, в рамках данной гипотезы, роль основных конститутивных экзоферментов отводится лакказам [151], в то время как в данной работе для *T. hirsuta* была продемонстрирована конститутивная продукция и лакказы (LacA), и пероксидаз (MnP5 и VP2).

Интересным является тот факт, что ген, кодирующий конститутивно продуцируемую *T. hirsuta* лакказу (LacA), принадлежит к одной из наиболее поздно отделившихся ортологических групп (группа **A**), в то время как оба гена конститутивно продуцируемых лигнинолитических пероксидаз (MnP5 и VP2) принадлежат к самым эволюционно рано отделившимся ортологическим группам (группы **M5** и **V2**). Данное наблюдение согласуется с предположением о том, что в предковой популяции грибов (до начала дупликации генов лакказ) лакказа не принимала участие в деградации лигнина, и после дупликации к данному процессу адаптировался освободившийся от эволюционного давления новодуплицированный ген. Напротив, лигнинолитическая пероксидаза уже на первых этапах эволюции (до начала дупликаций) принимала непосредственное участие в деградации лигнина, и после дупликации эволюционное давление сохранило эту функцию за первоначальным геном, от которого произошли гены MnP5 и VP2.

В данное время существует ряд теоретических работ, обсуждающих, при каких условиях конститутивная продукция ферментов дает клетке (организму) преимущество по сравнению с индуцируемой [152]. Первоначально предполагалось, что конститутивная продукция ферментов может быть адаптивно предпочтительной только при условии, когда

“стоимость” рецепторного и регуляторного каскадов для их индуцируемой продукции высока [153]. Очевидно, что данное предположение не подходит для описания конститутивной продукции лакказ и лигнинолитических пероксидаз дереворазрушающими грибами, поскольку сложность рецепторного и регуляторного каскадов продукции этих ферментов вряд ли выше таковой у углеводов-разрушающих экзоферментов (CAZymes), практически все из которых являются индуцируемыми. С другой стороны, недавно предложенная модель [154] дает заключение, что конститутивная продукция фермента является адаптивно предпочтительной в условиях асимметричной окружающей среды (т.е. различные состояния окружающей среды отличаются как по продолжительности, так и по влиянию на приспособленность каждого фенотипа) и/или невозможности быстрого ответа на резкие изменения окружающей среды. Весьма вероятно, что именно данная модель (и дальнейшее ее развитие) может описывать конститутивную продукцию лакказ и лигнинолитических пероксидаз дереворазрушающим грибам. В естественных условиях произрастания окружающая среда этих грибов весьма асимметрична, а продукция лакказ и лигнинолитических пероксидаз является весьма долгим процессом (в сравнении с CAZymes) поскольку для их “созревания” требуется встраивание кофакторов в белковую глобулу (меди в медные центры лакказы и гемовой группы в пероксидазы).

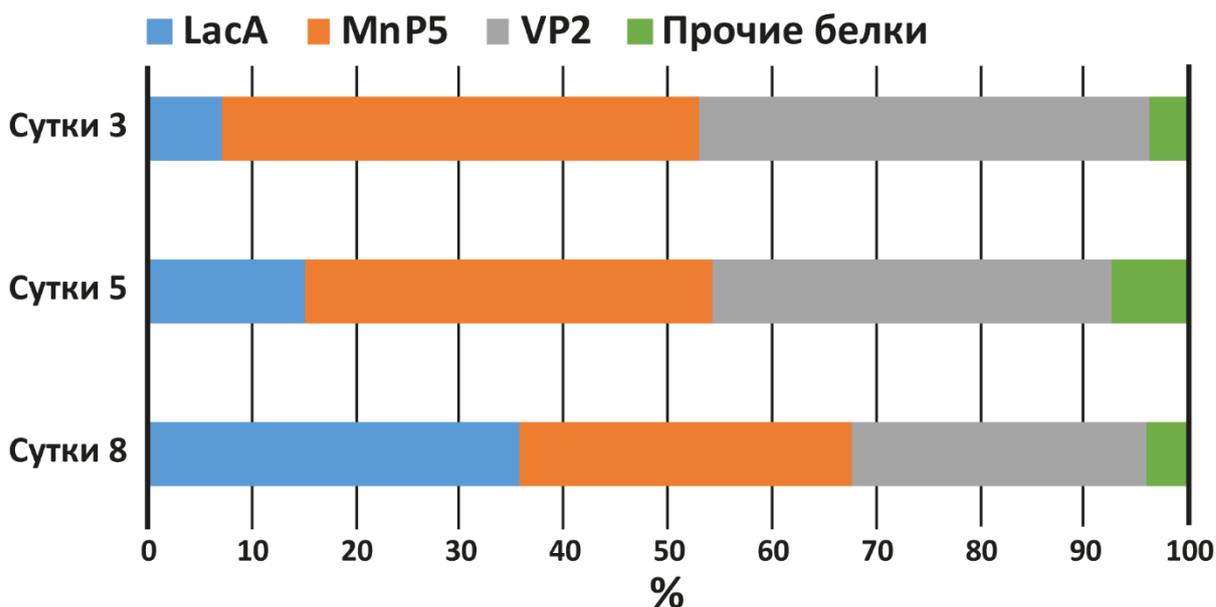
### **3.3 Секретия и транскрипция лакказ и лигнинолитических пероксидаз при культивировании в присутствии синтетического красителя**

#### **3.3.1 Изменение состава экзопротеома**

Для исследования секретии лигнинолитических пероксидаз и лакказ в ответ на присутствие в среде ксенобиотка *T. hirsuta* культивировали на GP среде, содержащей сульфонфталеиновый краситель бромкрезоловый зеленый (GP+Bг среда). Отбор культуральной жидкости осуществляли на 3-и, 5-е и 8-е сутки культивирования, соответствовавшие началу логарифмической, середине логарифмической и началу стационарной фаз роста гриба. Отобранная культуральная жидкость концентрировалась, а из полученного концентрата производилось высаживание белков. Высаженные белки экзопротеома были проанализированы методом HPLC-(+)ESI FT-ICR MS/MS (аналогично с п. 3.3.1).

Результаты исследования экзопротеома представлены на рисунке 14. Как и в случае роста на контрольной GP среде, на всех сутках культивирования в экзопротеоме обнаруживались только изоферменты LacA, MnP5 и VP2. Однако, если на GP среде

относительное количество данных изоферментов оставалось практически постоянными в процессе культивирования, на GP+Vr среде их вклады существенно изменялись. Для LacA наблюдалось постепенное увеличение вклада в экзопротеом с 7 % на 3-и сутки культивирования до 15 и 36 % на 5-е и 8-е сутки соответственно. В тоже время, относительное количество лигнинолитических пероксидаз уменьшалось: для MnP 5 они составляли 46, 39 и 32 % на 3-и, 5-е и 8-е сутки культивирования соответственно; для VP2 – 43, 38 и 28 % на 3-и, 5-е и 8-е сутки соответственно.



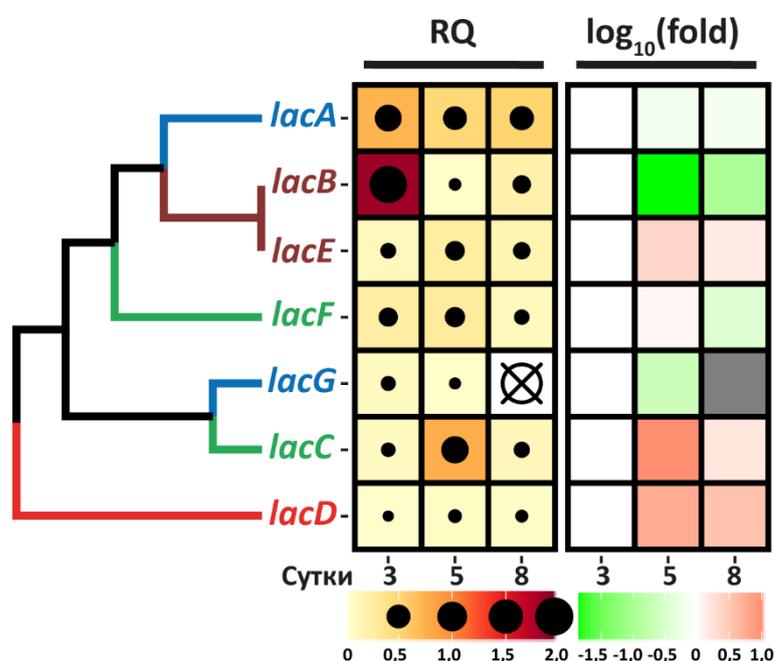
**Рисунок 14.** Изменение относительного содержания белков в экзопротеоме *T. hirsuta* при культивировании на GP+Vr среде. Прочие белки – все белки, кроме лакказ и пероксидаз.

### 3.3.2 Закономерности транскрипции

Для исследования транскрипции лигнинолитических пероксидаз и лакказ на GP+Vr среде, мицелий *T. hirsuta*, отобранный на 3-и, 5-е и 8-е сутки культивирования (то же самое культивирование, что и для экзопротеомного исследования, п. 3.3.1), растирали в жидком азоте. Из растертого мицелия осуществляли выделение тотальной РНК с последующей обратной транскрипцией поли(А)-РНК. Уровни транскрипции генов лакказ измерялись методом qPCR, а уровни транскрипции генов лигнинолитических пероксидаз – ddPCR (аналогично с п. 3.2.1).

Изменение уровня транскрипции генов лакказ приведено на рисунке 15. Уровни транскрипции *lacA* на протяжении всего времени культивирования существенно не отличались и были незначительно (не более чем в 2 раза) ниже таковых на контрольной GP среде. Для *lacE* и *lacD* уровни транскрипции увеличивались после 3-их суток культивирования (в 3 и 7 раз соответственно), оставаясь постоянными на 5-е и 8-е сутки.

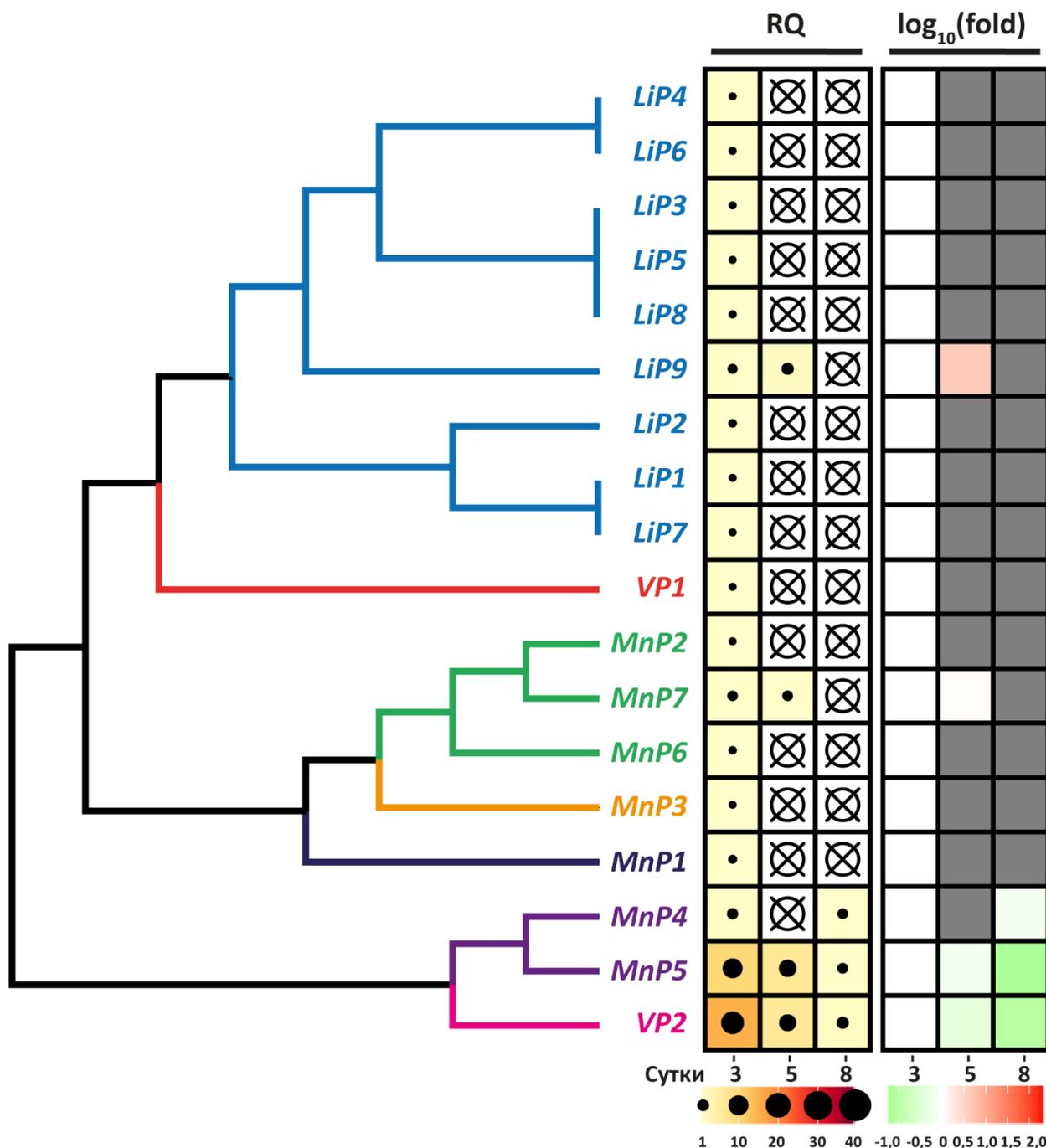
Уровень транскрипции *lacF* на 3-и и 5-е сутки культивирования был одинаков и уменьшался в 3 раза на 8-е сутки. Для *lacG* наблюдалось уменьшение уровня транскрипции с 3-их по 5-е сутки культивирования в 5 раз, после чего на 8-е сутки транскрипция отсутствовала. Наиболее сильные изменения транскрипции наблюдались для *lacB* и *lacC*. Уровень транскрипции *lacB* значительно снижался (в 80 раз) с 3-их по 5-е сутки культивирования, после чего на 8-е сутки транскрипция увеличивалась в 8 раз (по сравнению с 5-ми сутками). Напротив, уровень транскрипции *lacC* сильно увеличивался (в 12 раз) с 3-их по 5-е сутки культивирования, после чего на 8-е сутки транскрипция уменьшалась в 7 раз (по сравнению с 5-ми сутками). Также стоит отметить, что для *lacB* на 3-и сутки культивирования и *lacC* на 5-е сутки уровни транскрипции были выше, чем таковые для *lacA*, в 3 и 2 раза соответственно.



**Рисунок 15.** Изменение уровня транскрипции генов лакказ *T. hirsuta* при культивировании на контрольной GP+Vg среде. RQ – уровень транскрипции относительно генов внутреннего контроля (*β-tubulin* и *rpb2*); fold – кратность изменения транскрипции относительно таковой на 3-е сутки культивирования.

Изменение уровня транскрипции генов лигнинолитических пероксидаз приведено на рисунке 16. В целом, в течение культивирования для всех генов пероксидаз наблюдалось существенное подавление транскрипции. Для 8 генов лигнинпероксидаз (*LiP1-LiP8*), 4 генов марганец пероксидаз (*MnP1-MnP3* и *MnP6*) и одного гена версатилпероксидазы (*Vp1*) транскрипция отсутствовала, начиная с 5-х суток культивирования; на 3-и сутки культивирования уровни транскрипции этих генов были сопоставимы с таковыми на контрольной GP среде. Для *LiP9* и *MnP7* уровни транскрипции на 5-е и 8-е сутки культивирования не отличались и были сопоставимы с таковыми на контрольной GP среде;

на 8-е сутки транскрипция этих генов отсутствовала. Уровни транскрипции *MnP4* на 3-и и 8-е сутки культивирования не отличались и были соответственно в 2 и 4 раза выше таковых на контрольной GP среде, в тоже время на 5-е сутки транскрипция этого гена отсутствовала. Хотя уровни транскрипции *MnP5* и *VP2* на 3-и сутки культивирования были выше таковых на контрольной GP среде соответственно в 5 и 7 раз, при дальнейшем культивировании наблюдалось их существенное снижение: в 2 и в 15 раз на 5-е и 8-е сутки соответственно (по сравнению с 3-ми сутками).



**Рисунок 16.** 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-и сутки культивирования.

Таким образом, 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). Однако, если на GP среде на всех сутках культивирования процентные вклады 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. Уровни транскрипции генов лакказ на GP+Br среде в целом были сопоставимы или выше таковых на контрольной GP среде. Исключение составляли *lacB* и *lacC*, существенная индукция которых наблюдалась на 3-и и 5-е 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. Транскрипция генов лигнинолитических 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-е сутки культивирования; транскрипция остальных генов либо полностью прекращалась на 8-е сутки, либо была незначительной.

Описанные выше закономерности позволяют заключить, что, по крайней мере для *T. hirsuta*, основными экзоферментами, участвующими в деградации сульфонфталеинового красителя бромкрезолового, зеленого являются лакказы. Ранее уже предполагалось, что основной ролью лакказ дереворазрушающих грибов может быть не прямая деполимеризация макромолекул лигнина, а детоксификация образующихся в этом процессе низкомолекулярных соединений [151]. При этом данные соединения могут образовываться как в результате деятельности самого гриба, так и в результате деятельности его “соседей”, что объясняет наличие лакказ у грибов бурой гнили, не способных деполимеризовать лигнин. Второстепенная роль лакказ в процессе деполимеризации лигнина также подкрепляется полным отсутствием их генов у грибов белой гнили из подклады/семейства *Phanerochaetaceae*. Однако, стоит отметить, что геномы этих грибов содержат значительно большее число генов (5-7 против 1-2 у других грибов порядка Polyporales) лакказоподобных мультимедных оксидазы, которые потенциально могут исполнять аналогичные лакказам функции.

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

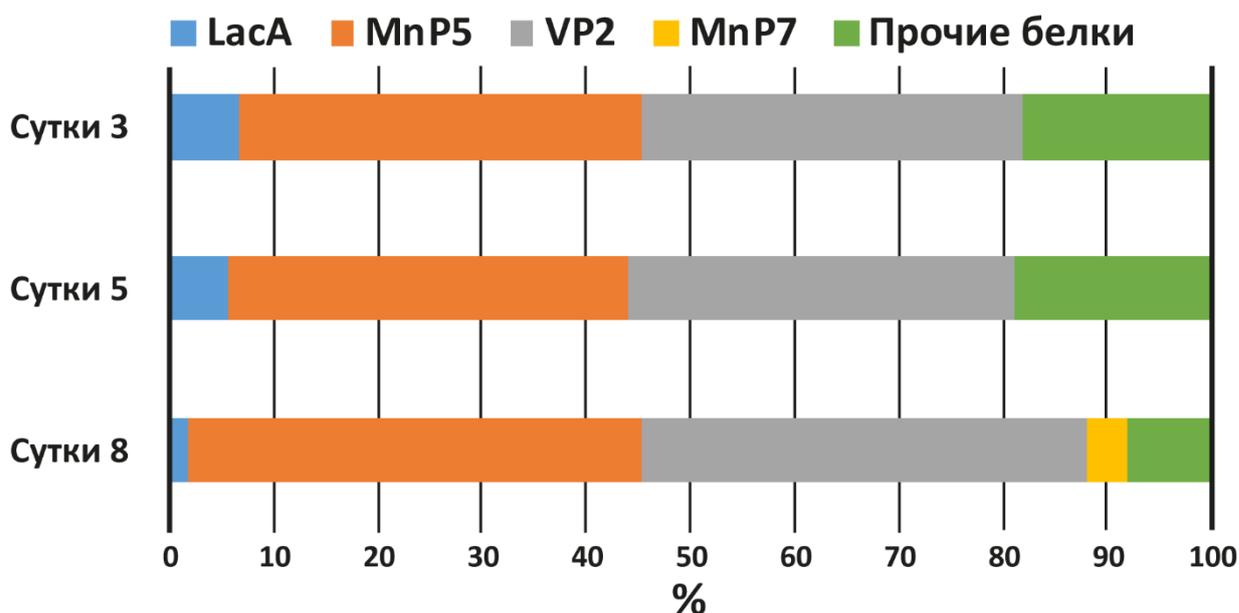
каталитическими параметрами. Отличие каталитических параметров различных изоферментов лакказ *T. hirsuta* ранее было показано в [155,156]. Хотя работы с различными изоформами лакказ для *T. hirsuta* ранее не проводились, ранее для изофермента лакказы из *Steccherinum ochraceum* было показано, что его различные по гликозилированию изоформы отличаются по своей субстратной специфичности [157].

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

#### **3.4.1 Изменение состава экзопротеома**

Для исследования секреции лигнинолитических пероксидаз и лакказ, *T. hirsuta* культивировали на GP среде, содержащей крафт-лигнин (CAS 8068-05-1, Sigma-Aldrich, США), полученный в результате сульфатного процесса щелочной делигнификации древесины (GP+KL среда). Отбор культуральной жидкости осуществляли на 3-и, 5-е и 8-е сутки культивирования, соответствовавшие началу логарифмической, середине логарифмической и началу стационарной фаз роста гриба. Отобранная культуральная жидкость концентрировалась, а из полученного концентрата производилось высаживание белков. Высаженные белки экзопротеома были проанализированы методом HPLC-ESI FT-ICR MS/MS (аналогично с п. 3.2.1).

Результаты исследования экзопротеома методом HPLC-ESI FT-ICR MS/MS представлены на рисунке 17. В целом, изменение состава экзопротеома на GP+KL среде были противоположны таковым, наблюдаемым на GP+Br среде. Так, в отличие от GP+Br среды, на GP+KL среде их вклад LacA в экзопротеом постепенно уменьшался с 7 % на 3-и сутки культивирования до 5 % на 5-е, а на 8-е сутки его величина была почти на пределе возможностей обнаружения и составляла лишь 1 %. В тоже время, вклад в экзотпротеом лигнинолитических пероксидаз постепенно увеличивался: для MnP 5 он составлял 40, 42 и 45 % на 3-и, 5-е и 8-е сутки культивирования соответственно; для VP2 – 35, 38 и 42 % на 3-и, 5-е и 8-е сутки соответственно. Также отличительной особенностью экзопротеома на GP+KL среде является появление на 8-е сутки нового изофермента MnP7, не обнаруженного до этого ни в одном из исследованных экзопротеомов. Относительное количество MnP7 на 8-е сутки составляло 5 %.

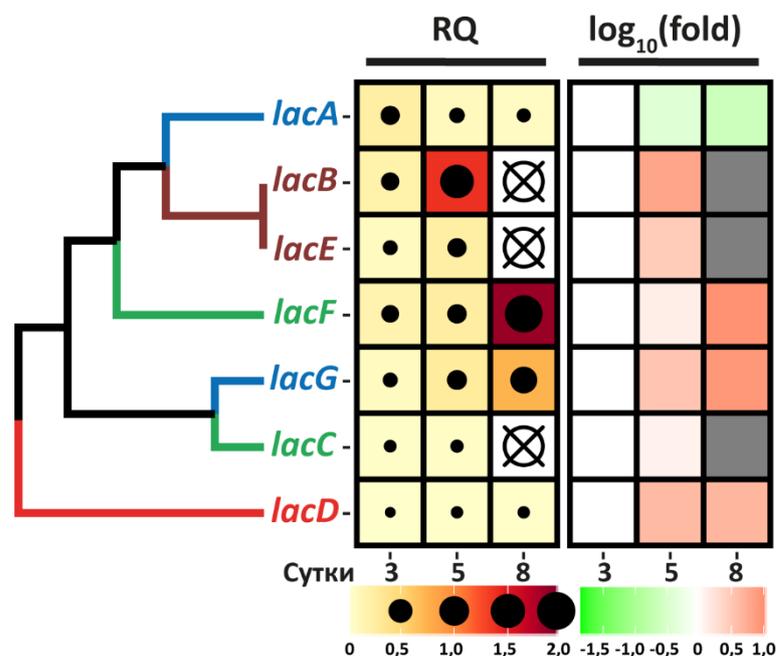


**Рисунок 17.** Изменение относительного содержания белков в экзопротеоме *T. hirsuta* при культивировании на GP+KL среде. Прочие белки – все белки, кроме лакказ и пероксидаз.

### 3.4.2 Закономерности транскрипции

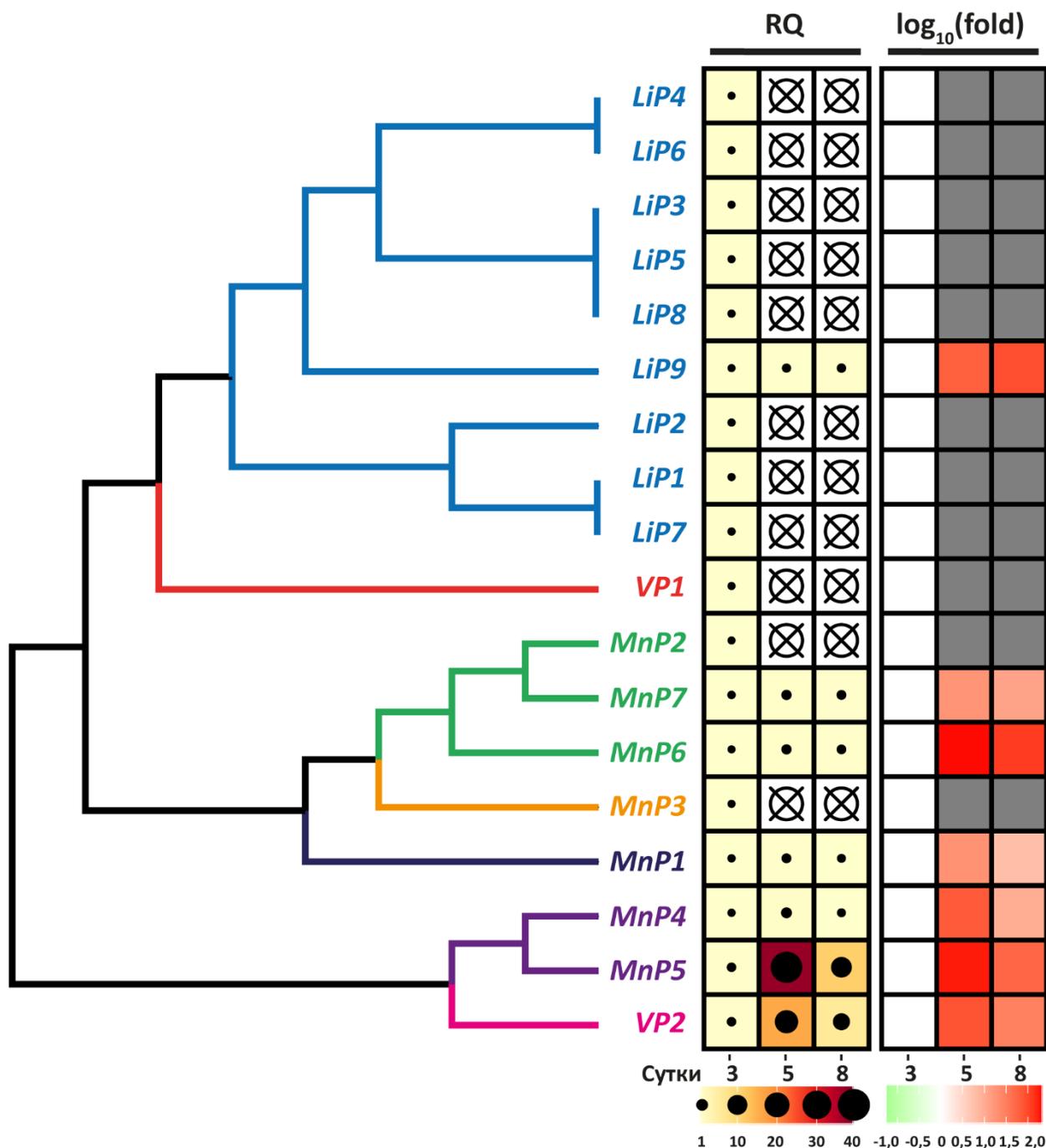
Для исследования транскрипции лигнинолитических пероксидаз и лакказ, мицелий *T. hirsuta*, отобранный на 3-и, 5-е и 8-е сутки культивирования на GP+KL среде (тоже самое культивирование что и для экзопротеомного исследования, п. 3.4.1), растирали в жидком азоте. Из растертого мицелия осуществляли выделение тотальной РНК с последующей обратной транскрипцией поли(А)-РНК. Уровни транскрипции генов лакказ измерялись методом qPCR, а уровни транскрипции генов лигнинолитических пероксидаз – ddPCR (аналогично с п. 3.2.2).

Изменение уровня транскрипции генов лакказ приведено на рисунке 18. В течение всего времени культивирования для *lacA* наблюдалось существенное подавление транскрипции: уже на 3-и сутки культивирования уровень транскрипции был в 6 раз меньше таковой на контрольной GP среде, а на 5-е и 8-е сутки транскрипция была соответственно в 5 и 19 раз меньше. Для остальных генов на 3-и сутки культивирования уровни транскрипции были сопоставимы с таковыми на контрольной GP среде. Для *lacB*, *lacE* и *lacC* на 5-е сутки культивирования наблюдалось увеличение уровней транскрипции в 7, 3 и 2 раза, соответственно; после чего на 8-е сутки транскрипция отсутствовала. Для *lacF*, *lacG* и уровни транскрипции постепенно увеличивались: на 5-е сутки культивирования их транскрипция была больше, чем на 3-и сутки, соответственно в 2 и 4 раза, а на 8-е сутки – в 12 и 10 раз. Уровень транскрипции *lacD* на 5-е сутки увеличивался в 5 раз по сравнению с 3-ми сутками, после чего оставался неизменным.



**Рисунок 18.** 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-и сутки культивирования.

Изменение уровня транскрипции генов лигнинолитических пероксидаз приведено на рисунке 19. В целом, в течение культивирования для 8 генов лигнин пероксидаз (*LiP1-LiP8*), 2 генов марганец пероксидаз (*MnP2* и *MnP3*) и одного гена версатил пероксидазы (*VP1*) наблюдалось существенное подавление транскрипции: на 3-и сутки культивирования уровни транскрипции этих генов были сопоставимы или в 2-6 раз меньше таковых на контрольной GP среде, а начиная с 5-х суток культивирования транскрипция отсутствовала. Уровень транскрипции *LiP9* на 3-и сутки культивирования был в 41 раз ниже такового на контрольной GP среде и постепенно увеличивался в течение культивирования: на 5-е и 8-е сутки транскрипция была соответственно в 76 и 106 раз больше по сравнению с 3-ми сутками. Хотя для остальных генов пероксидаз на 3-и сутки культивирования уровни транскрипции были сопоставимы с таковыми на контрольной GP среде, на 5-е сутки их транскрипция существенно увеличилась и была в среднем на 1-2 порядка (в 10-100 раз) выше по сравнению с 3-ми сутками. На 8-е сутки культивирования уровни транскрипции этих генов уменьшались примерно в 3 раза (по сравнению с 5-ми сутками). В течение всего культивирования преобладающими по уровню транскрипции генами являлись *MnP5* и *VP2* – уровень их транскрипции были на 1-2 порядка (в 10-100 раз) выше, чем у остальных генов.



**Рисунок 19.** Изменение уровня транскрипции генов лакказ *T. hirsuta* при культивировании на контрольной GP+KL среде. RQ – уровень транскрипции относительно гена внутреннего контроля (*β-tubulin*); fold – кратность изменения транскрипции относительно таковой на 3-и сутки культивирования.

Таким образом, проведённое экзопротеомное исследование показало, что основными секретируемыми белками при росте *T. hirsuta* на GP+KL среде являлись один изофермент лакказы – LaccA, и три изофермента лигнинолитических пероксидаз – MnP5, VP2 и MnP7. При этом существенный уровень секреции LaccA наблюдался только на 3-и и 5-е сутки культивирования, после чего секреция практически исчезала. Секреция MnP5 и VP2 наблюдалась на всех сутках культивирования, а секреция MnP7 – только на восьмых. Уровни

транскрипции генов лакказ на GP+AL среде в целом были сопоставимы с таковыми на контрольной GP среде. Исключение составляли *lacB*, существенная индукция которой наблюдалась на 3-и сутки культивирования, а также *lacF* и *lacG*, существенная индукция которых наблюдалась на 5-е сутки. Особенно стоит подчеркнуть существенное подавление транскрипции *lacA* на всех сутках культивирования. В случае лигнинолитических пероксидаз транскрипция 11 из 18 кодируемых в геноме пероксидаз отсутствовала после 3-их суток культивирования. Для остальных пероксидаз (в особенности *MnP5* и *VP2*) на 5-е сутки наблюдалась существенная индукция. 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-е сутки культивирования *MnP7*, которая до этого не была выявлена 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 потребовалась новая изоформа MnP.

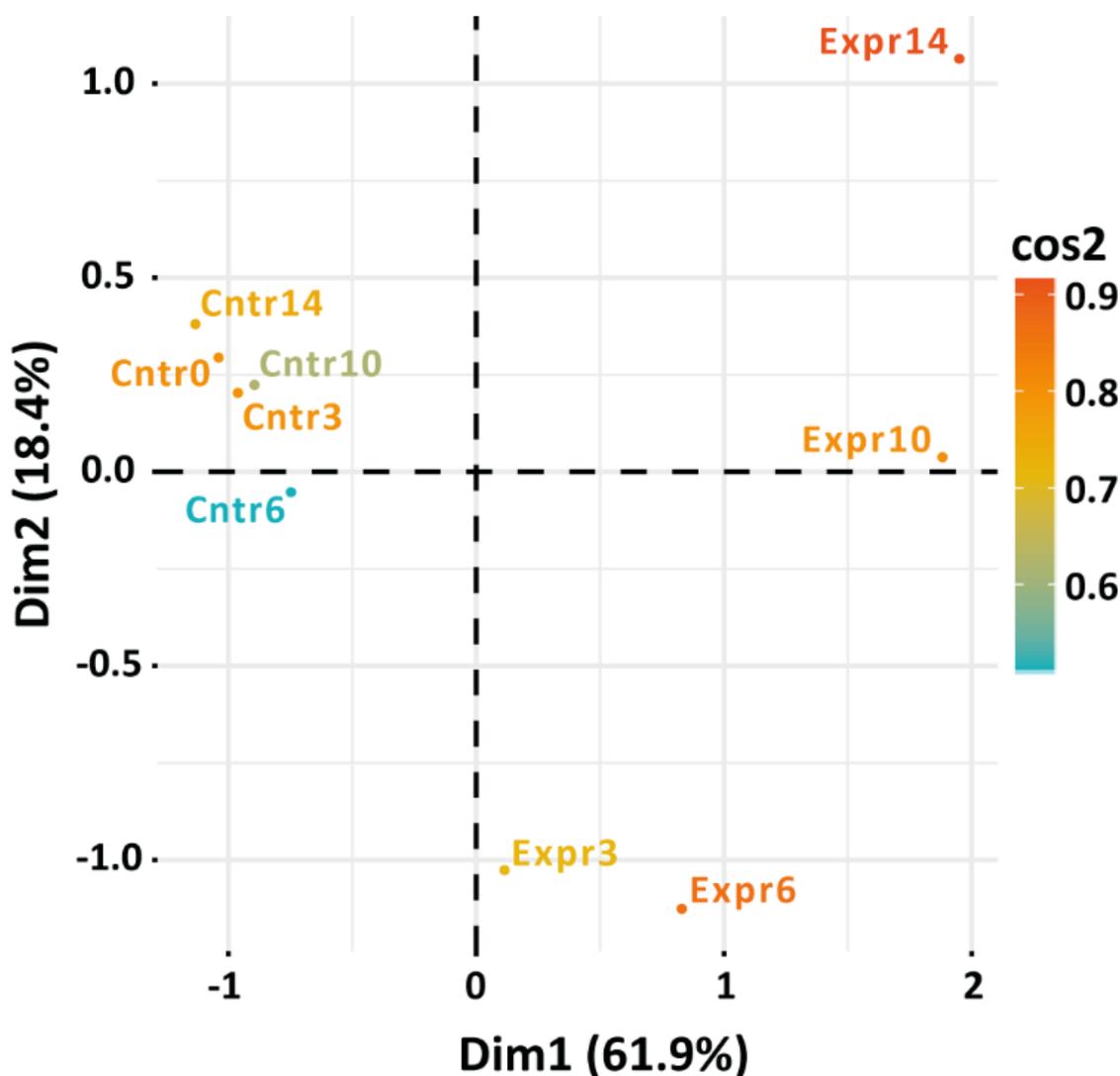
### **3.5 Участие лакказ и лигнинолитических пероксидаз в процессе деградации крафт лигнина**

#### **3.5.1 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 (CAS 8068-05-1, Sigma-Aldrich, США), полученный в результате сульфатного процесса щелочной делигнификации древесины (GP+KL среда). 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-и, 6-е, 10-е и 14-е сутки. Образец интактного крафт-лигнина и образцы лигнина из неинокулированных грибом сред, инкубированных параллельно с инокулированными, использовали в качестве контролей. По завершению эксперимента все образцы лигнина анализировались с помощью (-)ESI FT-ICR MS.

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 20), что все контрольные образцы образовывали одну гомогенную группу, при этом разделение

контрольных и экспериментальных образцов наблюдалось в основном по первой компоненте.



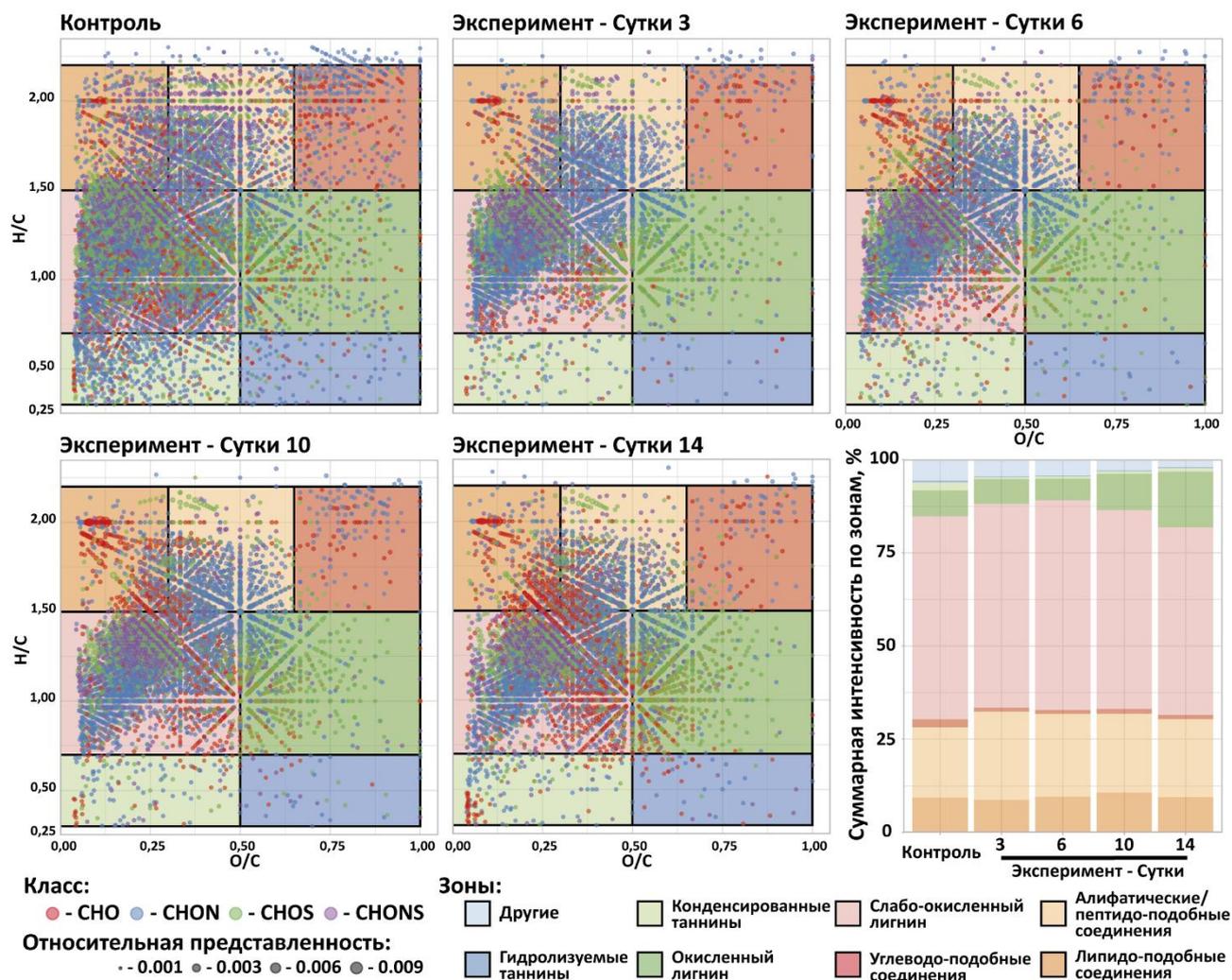
**Рисунок 20.** Анализ главных компонент для элементарных молекулярных формул определенных с помощью (-)ESI FT-ICR MS. Контрольные образцы, отобранные на X сутки, обозначены, как CntrX; экспериментальные образцы, отобранные на X сутки, обозначены, как ExprX.

Ни в одном образце не было обнаружено соединений с СН-формулами. В ходе культивирования суммарная интенсивность соединений с CHO-формулами обычно возрастала с одновременным уменьшением интенсивности соединений с CHON, CHOS и CHONS-формулами. Если в контроле суммарные интенсивности соединений CHO, CHON, CHOS и CHONS-формулами составляли 12, 45, 31 и 13 %, то на 14-е сутки культивирования они составили 38, 34, 21 и 7 % соответственно. Большое количество формул соединений, содержащих серу и азот, можно объяснить происхождением лигнина. Изучаемый здесь лигнин был произведен с помощью крафт-процесса, в результате которого в структуре лигнина могут появляться тиоловые группы [158]. Азот может быть введен в лигнин в

результате как природного выветривания древесины [96], так и в виде комплексов белок-лигнин, образующихся в процессе делигнификации [159].

В процессе культивирования средние молекулярные массы соединений стабильно снижались с 498 [398; 595] Да в контроле до 435 [357; 524] Да на 14-е сутки культивирования. Как для значения DBE/C, так и для СНО-индекса соединений изменений обнаружено не было: для всех образцов, их медианы составляли 0,45 [0,33; 0,55] и -0,7 [-0,9; -0,4] соответственно. В то время как DBE/C является хорошо известным показателем ненасыщенности соединений [108], индекс СНО является относительно новым показателем потенциальной способности соединений к биоразложению. Первоначально предложенный Kroll et al. для характеристики атмосферных органических аэрозолей [110], этот показатель был независимо повторно предложен Mann et al. для общего описания органического вещества почвы [109]. Для соединений с низким содержанием N и S атомов СНО-индекс можно рассматривать как приближение к средней степени окисления атомов углерода в соединении [110].

Для графического представления общих композиционных особенностей полученных образцов, были построены диаграммы ван Кревелена (атомные отношения Н/С против О/С) [160], представленные на рисунке 21. Ранее различные области диаграммы ван Кревелена были отнесены к разным биомолекулярным типам соединений [106,107,161]; однако следует отметить, что это не строгое отнесение, а скорее удобный способ общего описания диаграммы [106]. Чтобы частично решить такую хорошо известную проблему диаграмм ван Кревелена, как наложение молекул с разными формулами, но с одинаковыми отношениями Н/С и О/С [162], был построен дополнительный сводный график (рисунок 21).



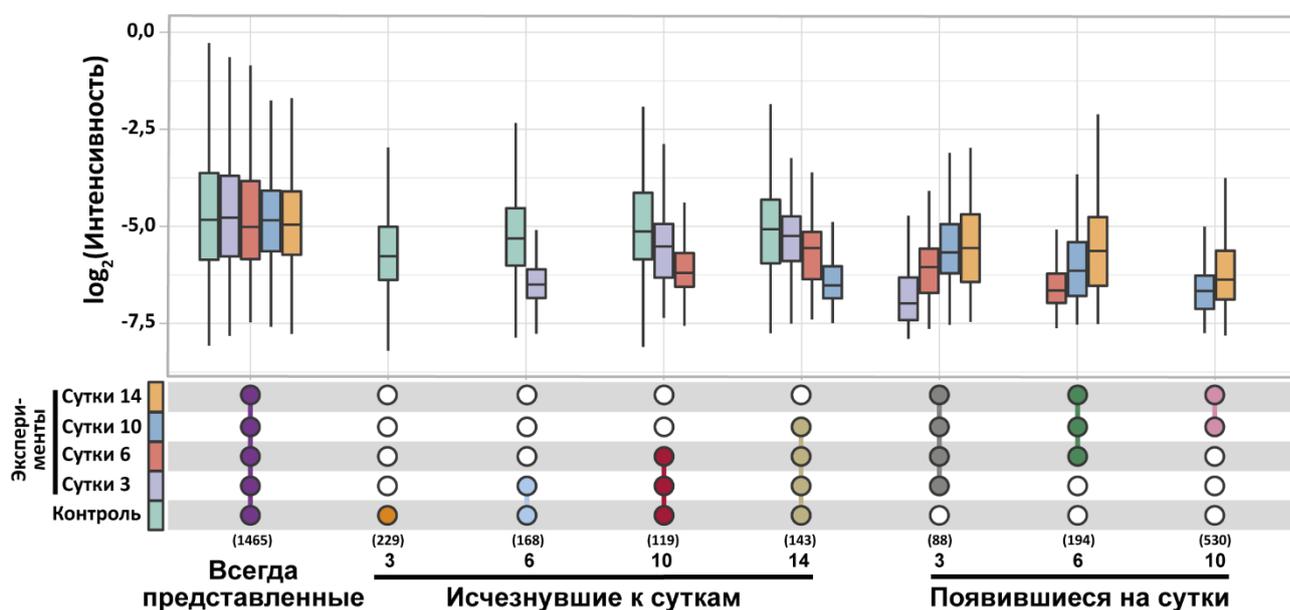
**Рисунок 21.** Диаграммы ван Кревелена и сводный график для всех элементных формул соединений, определенных с помощью (-)ESI FT-ICR MS. Данные для контрольных образцов усреднялись.

Как видно из диаграмм ван Кревелена и сводного графика (рисунок 21), идентифицированные соединения в основном располагались в области слабо-окисленного лигнина, за которой следовали области алифатических/пептидоподобных соединений, липидоподобных соединений и окисленного лигнина. Суммарная интенсивность соединений из областей гидролизуемых и конденсированных танинов была незначительной – около 1-2 % во всех образцах. 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-е сутки культивирования, тогда как суммарная интенсивность соединений из области окисленного лигнина увеличивалась с 7 % в контроле до 15 % на 14-е сутки культивирования.

Таким образом, на данном этапе анализа наблюдаются две основные тенденции в процессе модификации крафт-лигнина ферментной системой *T. hirsuta*. Во-первых, средние

молекулярные массы соединений постепенно уменьшались, что в целом может указывать на деполимеризацию крафт-лигнина. Во-вторых, перераспределение соединений между областями слабо-окисленного и окисленного лигнина предполагает оксигенацию лигнина. Ранее обе эти тенденции были подчеркнуты в нескольких экспериментах, в которых моделировалось абиотическое разложение лигнина под действием продуктов реакций Фентона [163,164] и фотоокисление лигнина под воздействием искусственного УФ-излучения [165]. Также эти процессы наблюдались во время разложения лигнина грибом белой гнили *P. chrysosporium* [166].

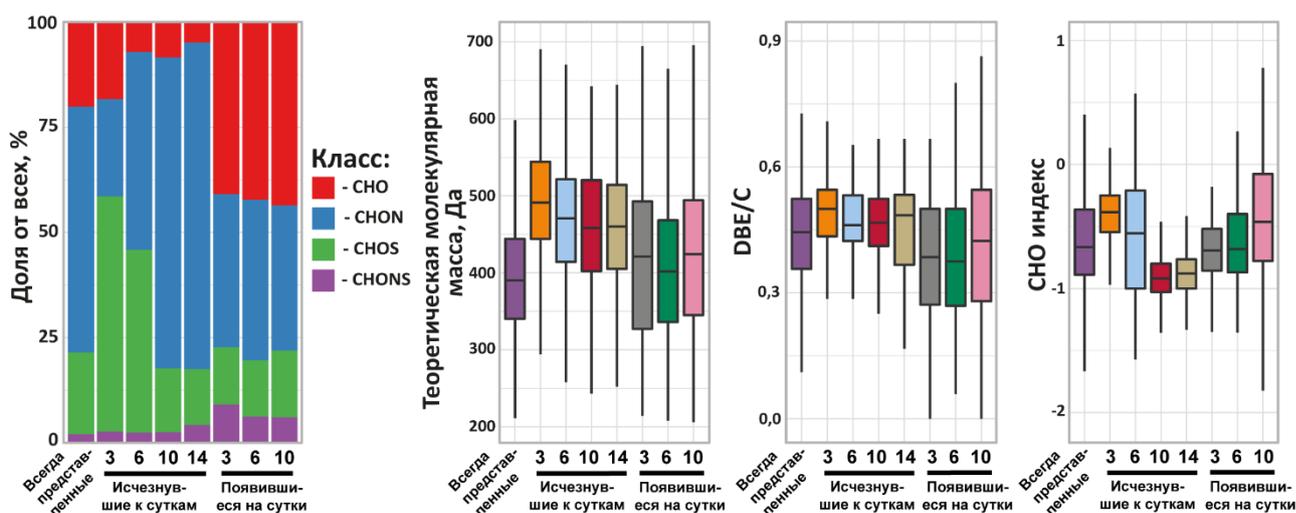
Для более глубокого исследования закономерностей биотрансформации лигнина *T. hirsuta*, было выделено несколько специфических групп формул соединений, связанных с изменениями в составе лигнина (рисунок 22): 1) группа **всегда представленных** соединений содержала формулы, которые присутствовали в течение всего процесса культивирования; 2) четыре группы **исчезнувших к определенным суткам** соединений содержали формулы, которые присутствовали до 3-их, 6-ых, 10-ых или 14-ых суток культивирования и отсутствовали в дальнейшем; 3) четыре группы **появившихся на определенные сутки** соединений содержали формулы, которые появлялись после 3-их, 6-ых, 10-ых или 14-ых суток культивирования и присутствовали в дальнейшем до окончания культивирования.



**Рисунок 22.** Диаграмма взаимоотношения подмножеств групп формул, UpSet [167], с распределением интенсивностей соединений. В нижней части диаграммы исходные множества располагаются по строкам, а производные – по столбцам. Производные множества были получены из исходных как теоретико-множественная разность между пересечением отмеченных сплошными кружками множеств и объединением отмеченных пустыми кружками множеств. Мощность (число элементов) производных множеств указана в скобках. В верхней части диаграммы данные для контрольных образцов были объединены.

Как видно из рисунка 22, для группы **всегда представленных** соединений медианные значения интенсивностей соединений были практически одинаковыми – около 0,016 (0,011-0,031) % во время культивирования. Для групп **исчезнувших к определенным суткам** соединений медианные значения постепенно уменьшались с резким падением в конце культивирования. Для групп **появившихся на определенные сутки** соединений медианные значения неуклонно росли. Следовательно, группа **всегда представленных** соединений содержит много соединений, практически одинаковое количество которых сохранялись на протяжении всего культивирования. Группы **исчезнувших к определенным суткам** соединений содержат соединения, которые систематически модифицировались, разрушались, грибом. Различная скорость их модификации может быть объяснена либо разной степенью их устойчивости, либо изменением состава ферментативной системы гриба в процессе культивирования. Группы **появившихся на определенные сутки** соединений содержат очень устойчивые к модификации соединения – однажды образовавшись, эти соединения не могут подвергаться дальнейшей модификации ферментами гриба и, следовательно, накапливаются в процессе культивирования.

Что касается пропорций основных классов молекул в каждой группе (рисунок 23), следует выделить две основные особенности. Во-первых, группы **появившихся на определенные сутки** соединений содержат самую высокую долю СНО-соединений (около 42 %) среди всех групп (от 5 до 20 %). Во-вторых, в группах **исчезнувших к определенным суткам** соединений доля СНОН-соединений увеличивалась в ходе культивирования с 23 % на 3-е сутки культивирования до 77 % на 14-е, а доля СНОС-соединений снижалась с 56 % до 13 % на 3-е и 14-е сутки соответственно. Однако этот процесс не был постепенным: резкие изменения наблюдались между 6-ми и 10-ми сутками культивирования.

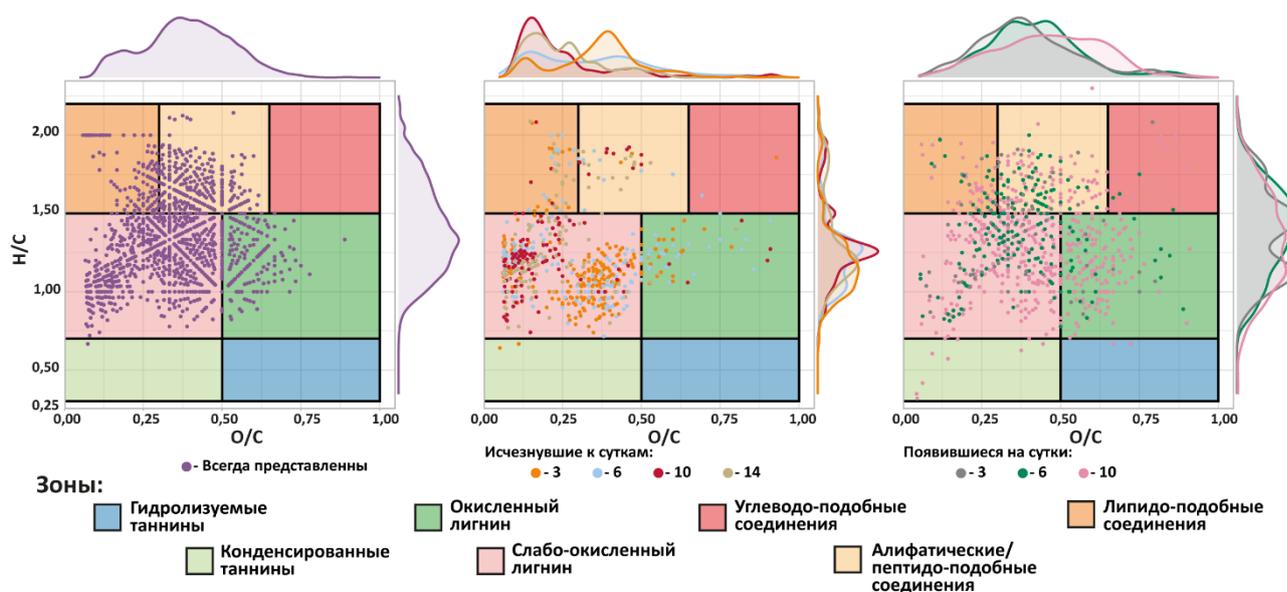


**Рисунок 23.** Сводные характеристики для различных групп формул определенных с помощью (-)ESI FT-ICR MS.

Распределение молекулярных масс соединений для каждой группы представлено на рисунке 23. Чтобы определить основной тип соединений, были использованы пороговые значения для лигниноподобных молекул, предложенные Jarrell et al. [168]: (< 250 Да) для мономеров; (250-400 Да) для димеров; и (> 400 Да) для полимерных молекул более высокого порядка. Следовательно, группы **всегда представленных и появившихся на определенные сутки** соединений содержат почти равное количество димерных молекул и полимерных молекул более высокого порядка, в то время как группы **исчезнувших к определенным суткам** соединений почти полностью состоят из полимерных молекул более высокого порядка.

В целом, значения DBE/C для групп **исчезнувших к определенным суткам** соединений (рисунок 23) были выше, чем для групп **появившихся на определенные сутки** соединений. Для всех групп значение СНО-индекса в основном варьировалось от -1 до 0. Ранее было показано, что органические вещества почвы в пределах этого интервала, как правило, подвержены микробной деградации [109] – соединения со значениями СНО-индекса выше -0,5 легче разлагаются, чем соединения со значениями СНО-индекса ниже -0,5. В целом, медианные значения СНО-индекса незначительно отклонялись от -0,5 для всех групп. Основное исключение составили группы **исчезнувших к 10-ым суткам** соединений и **исчезнувших к 14-ым суткам** соединений, для которых медианные значения СНО-индекса находились вблизи -1.

Как видно на диаграммах ван Кревелена (рисунок 24), соединения из группы **всегда представленных** соединений преимущественно располагаются в областях слабо-окисленного лигнина и алифатических/пептидоподобных соединений, и в меньшей степени – в областях окисленного лигнина и липидоподобных соединений. Соединения из групп **исчезнувших к определенным суткам** соединений 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 соединений из групп **исчезнувших к определенным суткам** соединений произошел между 6-ми и 10-ми сутками культивирования. Соединения из групп **появившихся на определенные сутки** соединений 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.



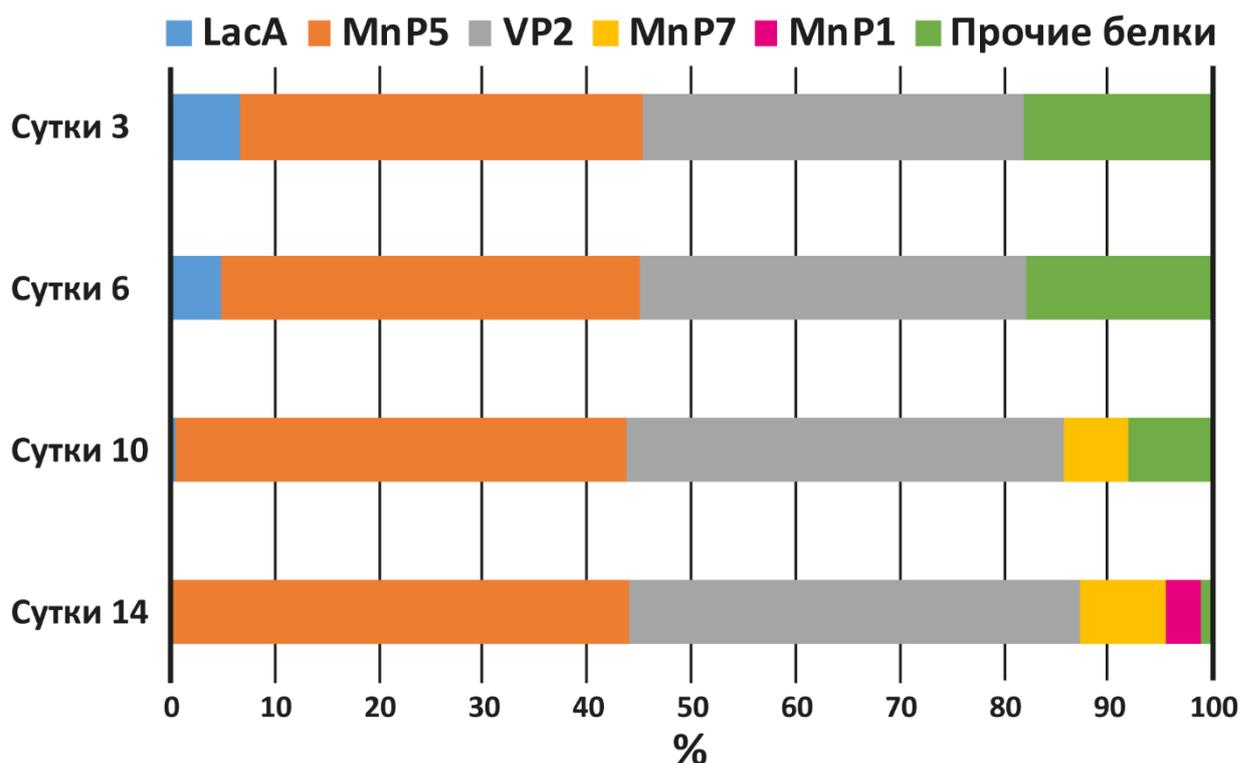
**Рисунок 24.** Диаграммы ван Кревелена для различных групп формул определенных с помощью (-)ESI FT-ICR MS.

Таким образом, проведенное выделение специфических групп формул соединений позволило эффективно снизить уровень «шума», присутствовавший в исходных данных, и выявить основные закономерности в процессе модификации лигнина *T. hirsuta*. Все систематические модификации лигнина, то есть те, которые происходят в группах **исчезнувших к определенным суткам соединений** и **появившихся на определенные сутки** соединений, в основном представляли из себя перераспределение соединений на диаграмме ван Кревелена между областями слабо-окисленного и окисленного лигнина. Сравнивая полученные данные с ранее опубликованными по абиотическому разложению лигнина под действием продуктов реакций Фентона [163,164], фотоокислению лигнина под воздействием искусственного УФ-излучения [165] и разложению лигнина грибом белой гнили *P. chrysosporium* [166] следует выделить две основные особенности: 1) во время УФ-окисления лигнина все вновь синтезированные соединения в основном располагались на диаграмме ван Кревелена в области слабо-окисленного лигнина, тогда как в нашем случае соединения из этой области разрушались; 2) в процессах фентоновской модификации лигнина и его деградации *P. chrysosporium* образовывалось много соединений с высоким содержанием кислорода, занимающих на диаграмме ван Кревелена область гидролизуемых танинов, чего в нашем случае не наблюдалось.

### 3.5.2 Изменения состава экзопротеома

Для исследования секреции лигнинолитических пероксидаз и лакказ, *T. hirsuta* культивировали на GP среде, содержащей крафт-лигнин (GP+KL среда). Отобранная на 3-и, 6-е, 10-е и 14-е сутки культивирования с крафт-лигнином (то же самое культивирование что и для исследования изменения молекулярного состава лигнина, п. 3.5.1) культуральная жидкость концентрировалась, а из полученного концентрата производилось высаживание белков. Высаженные белки экзопротеома были проанализированы методом HPLC-(+)ESI FT-ICR MS/MS (аналогично с п. 3.3.1).

Результаты проведённого экзопротеомного исследования (рисунок 25) в целом совпадали с описанными в предыдущем разделе (п. 3.4.1), однако увеличенное время культивирования и большее число точек отбора проб позволили более детально оценить закономерности секреции пероксидаз. На всех исследованных днях культивирования основными секретируемыми белками являлись лигнинолитические пероксидазы – MnP1, MnP7, MnP5 и VP2, вносящие от 75 до 99 % вклада в экзопротеом. При этом преобладающими изоферментами являлись MnP5 и VP2: вклад MnP5 на 3-и сутки культивирования составлял 39 % и возрастал к 14-ым суткам до 44 %; вклад VP2 на 3-и сутки культивирования составлял 37 % и возрастал к 14-ым суткам до 43 %. Впервые появившись в экзопротеоме на 10-е сутки культивирования, MnP7 вносила 6 % вклада в экзопротеом, при этом к 14-ым суткам ее вклад увеличился и составлял 8 %. Изофермент MnP1 был идентифицирован в экзопротеоме только на 14-е сутки культивирования, а его относительное количество составляло 4 %. Из всех возможных изоферментов лакказ в экзопротеоме присутствовал только изофермент LacA. На 3-е и 6-е сутки культивирования его вклад в экзопротеом составлял 7 % и 5 %, а на 10-е и 14-е сутки данный изофермент не обнаруживался. Важно отметить, что на всех исследованных днях культивирования ни одного изофермента LiP обнаружено не было.



**Рисунок 25.** Изменение относительного содержания белков в экзопротеоме *T. hirsuta* при культивировании на GP+KL среде. Прочие белки – все белки, кроме лакказ и пероксидаз.

Таким образом, полученные данные показали, что при росте *T. hirsuta* на лигнинсодержащей среде состав соединений, которые модифицировались секретлируемыми грибом ферментами, значительно изменялся между 6-ми и 10-ми сутками культивирования. Вплоть до 6-х суток грибные ферменты систематически модифицировали соединения, характеризующиеся СНО-индексом около -0,5, и значительная часть этих соединений содержала серу (предположительно в форме тиоловой группы) (рисунок 23). Напротив, с 10-х суток культивирования грибные ферменты систематически модифицировали соединения, характеризующиеся СНО-индексом близким к -1, и значительная часть этих соединений содержала азот (рисунок 23). Кроме того, оксигенация лигнина в основном начиналась с 10-х суток культивирования (рисунок 21 и рисунок 24).

Чтобы связать наблюдаемые в лигнине изменения с действием определенных групп экзоферментов *T. hirsuta*, было проведено экзопротеомное исследование. Основными секретлируемыми белками являлись один изофермент лакказы (LacA) и четыре изофермента лигнинолитических пероксидаз (MnP5, VP2, MnP7 и MnP1). При этом секреция LacA наблюдалась только на 3-и и 5-е сутки культивирования, после чего исчезала. В тоже время, профиль секреции пероксидаз во время культивирования гриба изменялся каскадно: новые изоферменты добавлялись к смеси уже секретлируемых, при этом относительное количество каждого секретлируемого изофермента увеличивалось в течение культивирования. MnP5 и

VP2 были впервые обнаружены на 3-и сутки культивирования, а MnP7 и MnP1 – на 10-е и 14-е сутки соответственно. Следовательно, секреция MnP5 и VP1 происходила почти с начала культивирования, секреция MnP7 – где-то между 6-ми и 10-ми сутками, а секреция MnP1 – где-то между 10-ми и 14-ми сутками.

Описанные выше закономерности позволяют заключить, что, по крайней мере для *T. hirsuta*, основными экзоферментами, участвующими в деградации крафт-лигнина являются марганец и версатил пероксидазы.

Секреция MnP7 и MnP1 на более поздних стадиях культивирования предполагает важность этих ферментов для модификации соединений из области слабо-окисленного лигнина на диаграмме ван Кревелена (рисунок 24). Скорее всего, присутствие этих изоферментов способствует раскрытию ароматических кольцевых структур лигнина, что приводит к образованию ненасыщенных алифатических структур и структур, содержащих гидроксильные карбоновые кислоты, как это было ранее предложено Стенсоном и др. [169]. Полное отсутствие LiP в экзопротеоме *T. hirsuta* может быть основной причиной отличия закономерностей модификации лигнина данным грибом от таковых у гриба белой гнили *P. chrysosporium* [166], который в основном задействует LiP при разложении лигнина [170].

Поиск в опубликованной литературе пероксидаз с описанными свойствами и из тех же ортологических групп что и VP2, MnP5, MnP7 и MnP1 из *T. hirsuta* дал два результата. Первой была версатил пероксидаза из *T. versicolor* (*TvVP2*), принадлежащая к той же группе, что и VP2 из *T. hirsuta*. Первоначально идентифицированная в экзопротеоме *T. versicolor* BRFM 1218, выращенного на древесине дуба, эта пероксидаза была дополнительно клонирована, и ее каталитические свойства были охарактеризованы [171]. Второй была марганец пероксидаза из *Trametes polyzona* KU-RNW027 (*TrMnP2*), принадлежащая к той же группе, что и MnP1 из *T. hirsuta*. Эта пероксидаза была очищена из культуральной жидкости гриба белой гнили *T. polyzona*, выращенного в присутствии ремазола бриллиантового красного F3B (Remazol brilliant red F3B) [172]. Таким образом, мы смогли найти охарактеризованные ортологи как для рано секретлируемой (VP2), так и для позднее секретлируемой пероксидазы (MnP1) *T. hirsuta* (т.е. *TvVP2* и *TrMnP2*, соответственно).

Сравнение *TvVP2* и *TrMnP2* продемонстрировало, что *TrMnP2* имеет в 3 раза меньшую аффинность к  $Mn^{2+}$  ( $K_M$  958,5 против 330,0 мкМ) и почти в 8 раз меньшую аффинность к 2,6-DMP ( $K_M$  2597 против 340,0 мкМ). Кроме того, высокая способность к разложению таких соединений, как амоксициллин и хинолоны, также была отличительной чертой субстратной специфичности *TrMnP2*.

Основываясь на ортологической гипотезе, можно предположить, что пероксидазы, секретируемые *T. hirsuta* в процессе модификации лигнина, также сильно различаются по своей субстратной специфичности. Скорее всего, секретируемые позже пероксидазы (MnP7 и MnP1) обладают более высоким субстратным сродством (более низкими значениями  $K_M$ ) к некоторым фенольным соединениям и действуют более специализированным образом, чем ранне секретируемые (VP2 и MnP5). Действие пероксидаз, секретируемых на ранней стадии, в течение первых 6-и суток культивирования гриба приводит к образованию устойчивых к ним лигниновых фрагментов. Эти фрагменты индуцируют синтез секретируемых позже пероксидаз, которые осуществляют их дальнейшую успешную модификацию.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных исследований в соответствии с поставленной целью диссертационной работы были описаны мультигенные семейства лакказ и лигнинолитических пероксидаз дереворазрушающего гриба белой гнили *Trametes hirsuta* (Polyporales, Basidiomycota), показаны особенности их эволюции и выявлены эволюционно связанные ортологические группы. Также для обоих семейств было проведено исследование особенностей транскрипции, секреции и участия в процессах биодеструкции сульфонфталеинового красителя (бромкрезолового зеленого) и лигнина, полученного в результате щелочной делигнификации древесины (крафт лигнина). На основании полученных результатов были сформулированы следующие выводы:

1. Для *T. hirsuta* в состав мультигенного семейства лакказ входит семь полнофункциональных генов (*lacA* – *lacG*) и один непроцессированный 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 полипоройдной кледы) 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 секретлируемыми 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 ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Glaeser J.A., Lindner D.L. Use of fungal biosystematics and molecular genetics in detection and identification of wood-decay fungi for improved forest management // For. Pathol. 2011. Vol. 41, № 5. P. 341–348.
2. Hartig R. Die Zerzetzungserscheinungen des Holzes der Nadelholzbäume und der Eiche in forstlicher, botanischer, und chemischer Richtung. Berlin: J. Springer, 1878.
3. Hartig R. Wichtige Krankheiten der Waldbäume. Berlin.: J. Springer, 1874.
4. Goodell B., Qian Y., Jellison J. Fungal decay of wood: soft rot – brown rot – white rot // ACS Symposium Series. 2008. Vol. 982. P. 9–31.
5. Riley R. et al. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi // Proc. Natl. Acad. Sci. 2014. Vol. 111, № 27. P. 9923–9928.
6. Floudas D. et al. Evolution of novel wood decay mechanisms in Agaricales revealed by the genome sequences of *Fistulina hepatica* and *Cylindrobasidium torrendii* // Fungal Genet. Biol. 2015. Vol. 76. P. 78–92.
7. Binder M. et al. Phylogenetic and phylogenomic overview of the Polyporales // Mycologia. 2013. Vol. 105, № 6. P. 1350–1373.
8. Justo A. et al. A revised family-level classification of the Polyporales (Basidiomycota) // Fungal Biol. 2017. Vol. 121, № 9. P. 798–824.
9. Worrall J.J., Anagnost S.E., Zabel R.A. Comparison of wood decay among diverse lignicolous fungi // Mycologia. 1997. Vol. 89, № 2. P. 199.
10. Blanchette R.A. Delignification by wood-decay fungi // Annu. Rev. Phytopathol. 1991. Vol. 29, № 1. P. 381–403.
11. Schwarze F.W.M.R. Wood decay under the microscope // Fungal Biol. Rev. 2007. Vol. 21, № 4. P. 133–170.
12. Arantes V., Jellison J., Goodell B. Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012. Vol. 94, № 2. P. 323–338.
13. Dashtban M. et al. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. // Int. J. Biochem. Mol. Biol. 2010. Vol. 1, № 1. P. 36–50.
14. Martínez A.T. et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. // Int. Microbiol. 2005. Vol. 8, № 3. P. 195–204.
15. B Fisher A., S Fong S. Lignin biodegradation and industrial implications // AIMS Bioeng. 2014. Vol. 1, № 2. P. 92–112.

16. Goodell B. Brown-rot fungal degradation of wood: our evolving view // *Wood Deterioration and Preservation*. 2003. Vol. 845. P. 97–118.
17. Lundell T.K., Mäkelä M.R., Hildén K. Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes – ecological, functional and phylogenetic review // *J. Basic Microbiol.* 2010. Vol. 50, № 1. P. 5–20.
18. Wong D.W.S. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2009. Vol. 157, № 2. P. 174–209.
19. Sirim D. et al. The Laccase Engineering Database: a classification and analysis system for laccases and related multicopper oxidases. // *Database (Oxford)*. 2011. Vol. 2011. P. bar006.
20. Wu J. et al. Comparative genomics platform and phylogenetic analysis of fungal laccases and multi-copper oxidases // *Mycobiology*. 2020. Vol. 48, № 5. P. 373–382.
21. Polyakov K.M. et al. Structural study of the X-ray-induced enzymatic reduction of molecular oxygen to water by *Steccherinum murashkinskyi* laccase: Insights into the reaction mechanism // *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol. International Union of Crystallography*, 2017. Vol. 73, № 5. P. 388–401.
22. Mester T., Tien M. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants // *Int. Biodeterior. Biodegradation*. 2000. Vol. 46, № 1. P. 51–59.
23. Martínez A.T. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases // *Enzyme Microb. Technol.* 2002. Vol. 30, № 4. P. 425–444.
24. Passardi F. et al. PeroxiBase: The peroxidase database // *Phytochemistry*. 2007. Vol. 68, № 12. P. 1605–1611.
25. Fernández-Fueyo E., Ruiz-Dueñas F.J., Martínez A.T. Engineering a fungal peroxidase that degrades lignin at very acidic pH // *Biotechnol. Biofuels*. 2014. Vol. 7, № 1. P. 114.
26. Bertrand G. Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons // *C R Hebd Seances Acad Sci*. 1896. № 123. P. 463–465.
27. Laborde J. Sur la casse des vins // *C R Hebd Seances Acad Sci*. 1896. № 123. P. 1074–1075.
28. Bavendamm W. Uber dad vorkommen und den nachweisvon oxydasen bei holzstorenden pilzen // *Z. Ptlkrankh. Schulz*. 1928. № 38. P. 257–276.
29. Bourbonnais R., Paice M.G. Oxidation of non-phenolic substrates // *FEBS Lett.* 1990. Vol. 267, № 1. P. 99–102.
30. Munk L. et al. Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? // *Biotechnol. Adv. Elsevier Inc.*, 2015. Vol. 33, № 1. P. 13–24.
31. Kunamneni A. et al. Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications // *Appl. Microbiol.* 2007. P. 233–245.

32. Rivera-Hoyos C.M. et al. Fungal laccases // *Fungal Biol. Rev.* 2013. Vol. 27, № 3–4. P. 67–82.
33. Baldrian P. Fungal laccases - occurrence and properties. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2006. Vol. 30, № 2. P. 215–242.
34. Hammel K., Cullen D. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2008. Vol. 11, № 3. P. 349–355.
35. Schilling J.S. et al. Using wood rot phenotypes to illuminate the “gray” among decomposer fungi // *Front. Microbiol.* 2020. Vol. 11.
36. Kirk T.K., Farrell R.L. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin // *Annu. Rev. Microbiol.* 1987. Vol. 41, № 1. P. 465–501.
37. Millis C.D. et al. Oxidation-reduction potentials and ionization states of extracellular peroxidases from the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* // *Biochemistry.* 1989. Vol. 28, № 21. P. 8484–8489.
38. Kersten P.J. et al. Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. // *Biochem. J.* 1990. Vol. 268, № 2. P. 475–480.
39. Doyle W.A. et al. Two substrate interaction sites in lignin peroxidase revealed by site-directed mutagenesis. // *Biochemistry.* 1998. Vol. 37, № 43. P. 15097–15105.
40. Baciocchi E., Fabbri C., Lanzalunga O. Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of nonphenolic trimeric lignin model compounds: fragmentation reactions in the intermediate radical cations. // *J. Org. Chem.* 2003. Vol. 68, № 23. P. 9061–9069.
41. Orth A.B., Royse D.J., Tien M. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. Vol. 59, № 12. P. 4017–4023.
42. Wariishi H., Valli K., Gold M.H. *In vitro* depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991. Vol. 176, № 1. P. 269–275.
43. Hammel K.E. et al. Ligninolysis by a purified lignin peroxidase. // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268, № 17. P. 12274–12281.
44. Ayuso-Fernández I., Martínez A.T., Ruiz-Dueñas F.J. Experimental recreation of the evolution of lignin-degrading enzymes from the Jurassic to date // *Biotechnol. Biofuels. BioMed Central*, 2017. Vol. 10, № 1. P. 1–13.
45. Ayuso-Fernández I., Ruiz-Dueñas F.J., Martínez A.T. Evolutionary convergence in lignin-degrading enzymes // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018. Vol. 115, № 25. P. 6428–6433.
46. Mester T., Tien M. Engineering of a manganese-binding site in lignin peroxidase isozyme H8 from *Phanerochaete chrysosporium* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. Vol. 284, № 3. P. 723–728.

47. Timofeevski S.L. et al. Addition of veratryl alcohol oxidase activity to manganese peroxidase by site-directed mutagenesis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. Vol. 256, № 3. P. 500–504.
48. Camarero S. et al. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 15. P. 10324–10330.
49. Mester T., Field J.A. Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273, № 25. P. 15412–15417.
50. Floudas D. et al. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes // *Science*. 2012. Vol. 336, № 6089. P. 1715–1719.
51. Ruiz-Dueñas F.J. et al. Lignin-degrading peroxidases in Polyporales: an evolutionary survey based on 10 sequenced genomes // *Mycologia*. 2013. Vol. 105, № 6. P. 1428–1444.
52. Semba Y. et al. Ancestral amino acid substitution improves the thermal stability of recombinant lignin-peroxidase from white-rot fungi, *Phanerochaete chrysosporium* strain UAMH 3641 // *Protein Eng. Des. Sel.* 2015. Vol. 28, № 7. P. 221–230.
53. Ayuso-Fernández I. et al. Peroxidase evolution in white-rot fungi follows wood lignin evolution in plants // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2019. Vol. 116, № 36. P. 17900–17905.
54. Valderrama B. et al. Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2003. Vol. 84, № 4. P. 289–299.
55. Hoegger P.J. et al. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. // *FEBS J.* 2006. Vol. 273, № 10. P. 2308–2326.
56. Qadir A., Hashmi M.Z., Mahmood A. Xenobiotics, types, and mode of action. 2017. P. 1–7.
57. Shankar Murthy K. et al. A review on toxicity of pesticides in fish // *Int. J. Open Sci. Res.* 2013. Vol. 1, № 1. P. 15–36.
58. Wang Y., Qian H. Phthalates and their impacts on human health // *Healthcare*. 2021. Vol. 9, № 5. P. 603.
59. Manzoor J., Sharma M. Impact of textile dyes on human health and environment. 2020. P. 162–169.
60. Kumar L., Bharadvaja N. Enzymatic bioremediation: a smart tool to fight environmental pollutants // *Smart Bioremediation Technologies*. Elsevier, 2019. P. 99–118.
61. Baker P., Tiroumalechetty A., Mohan R. Fungal enzymes for bioremediation of xenobiotic compounds. 2019. P. 463–489.
62. Sutherland T. et al. Enzymatic bioremediation: from enzyme discovery to applications // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2004. Vol. 31, № 11. P. 817–821.

63. Mousavi S.M. et al. Recent advances in enzymes for the bioremediation of pollutants // *Biochem. Res. Int.* / ed. Gutiérrez-Méndez N. 2021. Vol. 2021. P. 1–12.
64. Bhandari S. et al. Microbial enzymes used in bioremediation // *J. Chem.* / ed. Silva C.G. 2021. Vol. 2021. P. 1–17.
65. Baker P., Tiroumalechetty A., Mohan R. Fungal enzymes for bioremediation of xenobiotic compounds. 2019. P. 463–489.
66. Mate D.M., Alcalde M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology // *Microb. Biotechnol.* 2016.
67. Morsi R. et al. Laccases and peroxidases: The smart, greener and futuristic biocatalytic tools to mitigate recalcitrant emerging pollutants // *Sci. Total Environ.* 2020. Vol. 714. P. 136572.
68. Kumar A. et al. MnP enzyme: Structure, mechanisms, distributions and its ample opportunities in biotechnological application // *Bioprospecting of Microbial Diversity.* Elsevier, 2022. P. 185–202.
69. Kumar A., Arora P.K. Biotechnological applications of manganese peroxidases for sustainable management // *Front. Environ. Sci.* 2022. Vol. 10.
70. Saikia S. et al. Bioremediation mediated by manganese peroxidase – An overview // *Biocatal. Biotransformation.* 2022. P. 1–13.
71. Arregui L. et al. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation // *Microb. Cell Fact.* 2019. Vol. 18, № 1. P. 200.
72. Viswanath B. et al. Fungal laccases and their applications in bioremediation // *Enzyme Res.* 2014. Vol. 2014.
73. Strong P.J., Claus H. Laccase: A review of its past and its future in bioremediation // *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 2011. Vol. 41, № 4. P. 373–434.
74. Kumar L., Bharadvaja N. Enzymatic bioremediation: a smart tool to fight environmental pollutants // *Smart Bioremediation Technologies.* Elsevier, 2019. P. 99–118.
75. Singh A.K. et al. Bioremediation of lignin derivatives and phenolics in wastewater with lignin modifying enzymes: Status, opportunities and challenges // *Sci. Total Environ.* 2021. Vol. 777. P. 145988.
76. Sellami K. et al. Peroxidase enzymes as green catalysts for bioremediation and biotechnological applications: A review // *Sci. Total Environ.* 2022. Vol. 806. P. 150500.
77. Fobiri G.K. Synthetic dye application in textiles: A review on the efficacies and toxicities involved // *Text. Leather Rev.* 2022. Vol. 5. P. 180–198.
78. Sikaily A. El, Khaled A., El Nemr A. Textile dyes xenobiotic and their harmful effect // *Non-Conventional Textile Waste Water Treatment.* 2012. P. 31–64.
79. Ardila-Leal L.D. et al. A brief history of colour, the environmental impact of synthetic dyes

- and removal by using laccases // *Molecules*. 2021. Vol. 26, № 13. P. 3813.
80. Ponnusamy V.K. et al. A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential // *Bioresour. Technol.* 2019. Vol. 271. P. 462–472.
  81. Sheng Y. et al. Enzymatic conversion of pretreated lignocellulosic biomass: A review on influence of structural changes of lignin // *Bioresour. Technol.* 2021. Vol. 324. P. 124631.
  82. Mattheck C., Kubler H. *Wood - The internal optimization of trees*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1997.
  83. Lee J.G. et al. Artificial humification of lignin architecture: Top-down and bottom-up approaches // *Biotechnol. Adv.* 2019. Vol. 37, № 8. P. 107416.
  84. Bajwa D.S. et al. A concise review of current lignin production, applications, products and their environmental impact // *Ind. Crops Prod.* 2019. Vol. 139. P. 111526.
  85. Gaspar R., Fardim P. Lignin-based materials for emerging advanced applications // *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 2023. C. 100834.
  86. Nguyen L.T. et al. Valorization of industrial lignin to value-added chemicals by chemical depolymerization and biological conversion // *Ind. Crops Prod.* 2021. Vol. 161. P. 113219.
  87. Evstigneyev E.I. Lignin valorization problems // *Chem. plant raw Mater.* 2022. № 1. P. 11–33.
  88. Li C. et al. Recent advancement in lignin biorefinery: With special focus on enzymatic degradation and valorization // *Bioresour. Technol.* 2019. Vol. 291. P. 121898.
  89. Becker J., Wittmann C. A field of dreams: Lignin valorization into chemicals, materials, fuels, and health-care products // *Biotechnol. Adv.* 2019. Vol. 37, № 6. P. 107360.
  90. Liu H. et al. Bacterial conversion routes for lignin valorization // *Biotechnol. Adv.* 2022. Vol. 60. P. 108000.
  91. Zhang R. et al. Lignin valorization meets synthetic biology // *Eng. Life Sci.* 2019. Vol. 19, № 6. P. 463–470.
  92. Singhvi M., Kim B.S. Lignin valorization using biological approach // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2021. Vol. 68, № 3. P. 459–468.
  93. Li F. et al. Microbial lignin valorization through depolymerization to aromatics conversion // *Trends Biotechnol.* 2022. Vol. 40, № 12. P. 1469–1487.
  94. Stark N.M., Yelle D.J., Agarwal U.P. *Techniques for characterizing lignin* // *Lignin in Polymer Composites*. Elsevier, 2016. P. 49–66.
  95. Lupoi J.S. et al. Recent innovations in analytical methods for the qualitative and quantitative assessment of lignin // *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2015. Vol. 49. P. 871–906.
  96. Qi Y. et al. Assessment of molecular diversity of lignin products by various ionization techniques and high-resolution mass spectrometry // *Sci. Total Environ.* 2020. Vol. 713. P.

- 136573.
97. Banoub J. et al. A critique on the structural analysis of lignins and application of novel tandem mass spectrometric strategies to determine lignin sequencing // *J. Mass Spectrom.* 2015. Vol. 50, № 1. P. 5–48.
  98. Сивочуб О.А. Каталог культур базидиомицетов Коллекции Ботанического Института им. В.Л. Комарова РАН. С–П: Наука, 1992. 25 p.
  99. Koroljova-Skorobogat'ko O. V et al. Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1998. Vol. 28 ( Pt 1). P. 47–54.
  100. Agron I.A. et al. Accurate mass tag retention time database for urine proteome analysis by chromatography-mass spectrometry. // *Biochemistry. (Mosc).* 2010. Vol. 75, № 5. P. 636–641.
  101. Starodubtseva N.L. et al. Investigation of urine proteome of preterm newborns with respiratory pathologies // *J. Proteomics.* 2016. Vol. 149. P. 31–37.
  102. Nikolaev E.N. et al. Initial experimental characterization of a new ultra-high resolution FTICR cell with dynamic harmonization // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2011. Vol. 22, № 7. P. 1125–1133.
  103. Zhrebker A. et al. Optical Properties of soil dissolved organic matter are related to acidic functions of its components as revealed by fractionation, selective deuteromethylation, and ultrahigh resolution mass spectrometry // *Environ. Sci. Technol.* 2020. Vol. 54, № 5. P. 2667–2677.
  104. Zhrebker A. et al. Separation of benzoic and unconjugated acidic components of leonardite humic material using sequential solid-phase extraction at different pH values as revealed by fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and correlation nuclear magnetic resonance spectroscopy // *J. Agric. Food Chem.* 2018. Vol. 66, № 46. P. 12179–12187.
  105. Sleighter R.L., Hatcher P.G. The application of electrospray ionization coupled to ultrahigh resolution mass spectrometry for the molecular characterization of natural organic matter // *J. Mass Spectrom.* 2007. Vol. 42, № 5. P. 559–574.
  106. Rivas-Ubach A. et al. Moving beyond the van Krevelen diagram: A new stoichiometric approach for compound classification in organisms // *Anal. Chem.* 2018. Vol. 90, № 10. P. 6152–6160.
  107. Perminova I. V. et al. Signatures of molecular unification and progressive oxidation unfold in dissolved organic matter of the Ob-Irtysh river system along its path to the Arctic ocean // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, № 1. P. 19487.

108. Koch B.P., Dittmar T. From mass to structure: an aromaticity index for high-resolution mass data of natural organic matter // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006. Vol. 20, № 5. P. 926–932.
109. Mann B.F. et al. Indexing permafrost soil organic matter degradation using high-resolution mass spectrometry // *PLoS One* / ed. Hui D. 2015. Vol. 10, № 6. P. e0130557.
110. Kroll J.H. et al. Carbon oxidation state as a metric for describing the chemistry of atmospheric organic aerosol // *Nat. Chem.* 2011. Vol. 3, № 2. P. 133–139.
111. Rozen S., Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. // *Methods Mol. Biol.* 2000. Vol. 132. P. 365–386.
112. Vandesompele J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. // *Genome Biol.* 2002. Vol. 3, № 7. P. RESEARCH0034.
113. Altschul S.F. et al. Basic local alignment search tool // *J. Mol. Biol.* 1990. Vol. 215, № 3. P. 403–410.
114. Stothard P. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences // *Biotechniques.* 2000. Vol. 28, № 6. P. 1102–1104.
115. Gasteiger E. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis // *Nucleic Acids Res.* 2003. Vol. 31, № 13. P. 3784–3788.
116. Gupta R., Brunak S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. // *Pac. Symp. Biocomput.* 2002. P. 310–322.
117. Krah F.-S. et al. Evolutionary dynamics of host specialization in wood-decay fungi // *BMC Evol. Biol. BMC Evolutionary Biology*, 2018. Vol. 18, № 1. P. 119.
118. Garcia-Sandoval R. et al. Molecular phylogenetics of the Gloeophyllales and relative ages of clades of Agaricomycotina producing a brown rot // *Mycologia.* 2011. Vol. 103, № 3. P. 510–524.
119. Larsson A. AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets // *Bioinformatics.* 2014. Vol. 30, № 22. P. 3276–3278.
120. Edgar R.C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. // *Nucleic Acids Res.* 2004. Vol. 32, № 5. P. 1792–1797.
121. Darriba D. et al. jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing // *Nature Methods.* 2012. Vol. 9, № 8. P. 772–772.
122. Stamatakis A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies // *Bioinformatics.* 2014. Vol. 30, № 9. P. 1312–1313.
123. Miller M.A., Pfeiffer W., Schwartz T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees // 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE).

- IEEE, 2010. P. 1–8.
124. Noutahi E. et al. Efficient gene tree correction guided by genome evolution // PLoS One / ed. Robinson-Rechavi M. 2016. Vol. 11, № 8. P. e0159559.
  125. Lafond M., Swenson K.M., El-Mabrouk N. Error detection and correction of gene trees // Models and Algorithms for Genome Evolution / ed. Chauve C., El-Mabrouk N., Tannier E. London: Springer London, 2013. P. 261–285.
  126. Lafond M. et al. Gene tree correction guided by orthology // BMC Bioinformatics. 2013. Vol. 14, № Suppl 15. P. S5.
  127. Wu Y.-C. et al. TreeFix: Statistically informed gene tree error correction using species trees // Syst. Biol. 2013. Vol. 62, № 1. P. 110–120.
  128. Sukumaran J., Holder M.T. DendroPy: A Python library for phylogenetic computing // Bioinformatics. 2010. Vol. 26, № 12. P. 1569–1571.
  129. Vasina D. V. et al. The *Trametes hirsuta* 072 laccase multigene family: genes identification and transcriptional analysis under copper ions induction // Biochimie. 2015. Vol. 116. P. 154–164.
  130. Morozova O. V. et al. “Blue” laccases // Biochem. 2007. Vol. 72, № 10. P. 1136–1150.
  131. Altenhoff A.M. et al. Resolving the ortholog conjecture: Orthologs tend to be weakly, but significantly, more similar in function than paralogs // PLoS Comput. Biol. / ed. Eisen J.A. 2012. Vol. 8, № 5. P. e1002514.
  132. Chen X., Zhang J. The ortholog conjecture is untestable by the current gene ontology but is supported by RNA sequencing data // PLoS Comput. Biol. / ed. Ouzounis C.A. 2012. Vol. 8, № 11. P. e1002784.
  133. Gabaldón T., Koonin E. V. Functional and evolutionary implications of gene orthology // Nat. Rev. Genet. Nature Publishing Group, 2013. Vol. 14, № 5. P. 360–366.
  134. Савинова О. С. Получение рекомбинантных минорных изоферментов лакказ базидиомицета *Trametes hirsuta* 072 в *Penicillium canescens* и их сравнительная характеристика. 2019.
  135. Yaver D.S. et al. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa* // Appl. Environ. Microbiol. 1996. Vol. 62, № 3. P. 834–841.
  136. Zhang H. et al. Efficient production of laccases by *Trametes* sp. AH28-2 in cocultivation with a *Trichoderma* strain. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. Vol. 73, № 1. P. 89–94.
  137. Klonowska A. et al. Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30 // Eur. J. Biochem. 2002. Vol. 269, № 24. P. 6119–6125.
  138. Xiao Y.Z. et al. Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme

- from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2. // *Mycologia*. 2004. Vol. 96, № 1. P. 26–35.
139. Lupia R., Lidgard S., Crane P.R. Comparing palynological abundance and diversity: implications for biotic replacement during the Cretaceous angiosperm radiation // *Paleobiology*. 1999. Vol. 25, № 3. P. 305–340.
  140. Coiffard C. et al. Rise to dominance of angiosperm pioneers in European Cretaceous environments // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012. Vol. 109, № 51. P. 20955–20959.
  141. Sarkar P., Bosneaga E., Auer M. Plant cell walls throughout evolution: Towards a molecular understanding of their design principles // *J. Exp. Bot.* 2009. Vol. 60, № 13. P. 3615–3635.
  142. Weng J.-K., Chapple C. The origin and evolution of lignin biosynthesis // *New Phytol.* 2010. Vol. 187, № 2. P. 273–285.
  143. Espiñeira J.M. et al. Distribution of lignin monomers and the evolution of lignification among lower plants // *Plant Biol.* 2011. Vol. 13, № 1. P. 59–68.
  144. Popper Z.A. et al. Evolution and diversity of plant cell walls: From algae to flowering plants // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2011. Vol. 62, № 1. P. 567–590.
  145. Wang Y. et al. Plant cell wall lignification and monolignol metabolism // *Front. Plant Sci.* 2013. Vol. 4, № July. P. 1–14.
  146. Skyba O., Douglas C.J., Mansfield S.D. Syringyl-rich lignin renders poplars more resistant to degradation by wood decay fungi // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. Vol. 79, № 8. P. 2560–2571.
  147. Brand U. et al. Atmospheric oxygen of the Paleozoic // *Earth-Science Rev.* 2021. Vol. 216. P. 103560.
  148. Berner R.A., VandenBrooks J.M., Ward P.D. Oxygen and evolution // *Science* (80-. ). 2007. Vol. 316, № 5824. P. 557–558.
  149. Doerrer L.H. Cu in biology: Unleashed by O<sub>2</sub> and now irreplaceable // *Inorganica Chim. Acta.* 2018. Vol. 481. P. 4–24.
  150. Miyauchi S. et al. Conserved white-rot enzymatic mechanism for wood decay in the Basidiomycota genus *Pycnoporus* // *DNA Res.* 2020. Vol. 27, № 2.
  151. Aro N., Pakula T., Penttilä M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi // *FEMS Microbiol. Rev.* 2005. Vol. 29, № 4. P. 719–739.
  152. Bruggeman F.J. et al. Searching for principles of microbial physiology // *FEMS Microbiol. Rev.* 2020. Vol. 44, № 6. P. 821–844.
  153. Kussell E. Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments // *Science* (80-. ). 2005. Vol. 309, № 5743. P. 2075–2078.
  154. Geisel N. Constitutive versus responsive gene expression strategies for growth in changing environments // *PLoS One* / ed. Brezina V. 2011. Vol. 6, № 11. P. e27033.

155. Savinova O.S. et al. Properties of two laccases from the *Trametes hirsuta* 072 multigene family: Twins with different faces // *Biochimie*. 2017.
156. Savinova O.S. et al. Evolutionary relationships between the laccase genes of polyporales: orthology-based classification of laccase isozymes and functional insight from *Trametes hirsuta* // *Front. Microbiol.* 2019. Vol. 10.
157. Glazunova O.A. et al. Laccases with variable properties from different strains of *Steccherinum ochraceum*: Does glycosylation matter? // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, № 8. P. 2008.
158. Gellerstedt G. Softwood kraft lignin: Raw material for the future // *Ind. Crops Prod.* 2015. Vol. 77. P. 845–854.
159. Hussin M.H. et al. Physicochemical characterization of alkaline and ethanol organosolv lignins from oil palm (*Elaeis guineensis*) fronds as phenol substitutes for green material applications // *Ind. Crops Prod.* 2013. Vol. 49. P. 23–32.
160. Kim S., Kramer R.W., Hatcher P.G. Graphical method for analysis of ultrahigh-resolution broadband mass spectra of natural organic matter, the van Krevelen diagram // *Anal. Chem.* 2003. Vol. 75, № 20. P. 5336–5344.
161. Hertkorn N. et al. Natural organic matter and the event horizon of mass spectrometry // *Anal. Chem.* 2008. Vol. 80, № 23. P. 8908–8919.
162. Reemtsma T. Determination of molecular formulas of natural organic matter molecules by (ultra-) high-resolution mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2009. Vol. 1216, № 18. P. 3687–3701.
163. Waggoner D.C. et al. Formation of black carbon-like and alicyclic aliphatic compounds by hydroxyl radical initiated degradation of lignin // *Org. Geochem.* 2015. Vol. 82. P. 69–76.
164. Jeong H.J. et al. One-pot transformation of technical lignins into humic-like plant stimulants through fenton-based advanced oxidation: Accelerating natural fungus-driven humification // *ACS Omega*. 2018. Vol. 3, № 7. P. 7441–7453.
165. Qi Y., Hempelmann R., Volmer D.A. Shedding light on the structures of lignin compounds: photo-oxidation under artificial UV light and characterization by high resolution mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* 2016. Vol. 408, № 28. P. 8203–8210.
166. Khatami S. et al. Formation of water-soluble organic matter through fungal degradation of lignin // *Org. Geochem.* 2019. Vol. 135. P. 64–70.
167. Lex A. et al. UpSet: visualization of intersecting sets // *IEEE Trans. Vis. Comput. Graph.* 2014. Vol. 20, № 12. P. 1983–1992.
168. Jarrell T.M. et al. Characterization of organosolv switchgrass lignin by using high performance liquid chromatography/high resolution tandem mass spectrometry using

- hydroxide-doped negative-ion mode electrospray ionization // *Green Chem.* 2014. Vol. 16, № 5. P. 2713–2727.
169. Stenson A.C., Marshall A.G., Cooper W.T. Exact Masses and chemical formulas of individual suwannee river fulvic acids from ultrahigh resolution electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectra // *Anal. Chem.* 2003. Vol. 75, № 6. P. 1275–1284.
170. Schoemaker H.E., Leisola M.S.A. Degradation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium* // *J. Biotechnol.* 1990. Vol. 13, № 2–3. P. 101–109.
171. Amara S. et al. Enzyme activities of two recombinant heme-containing peroxidases, Tv DyP1 and Tv VP2, identified from the secretome of *Trametes versicolor* // *Appl. Environ. Microbiol.* / ed. Kelly R.M. 2018. Vol. 84, № 8.
172. Lueangjaroenkit P. et al. Two manganese peroxidases and a laccase of *Trametes polyzona* KU-RNW027 with novel properties for dye and pharmaceutical product degradation in redox mediator-free system // *Mycobiology.* 2019. Vol. 47, № 2. P. 217–229.