

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 24.1.233.01 ПО ЗАЩИТЕ
ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 19 октября 2023 г. № 20
о присуждении Моисеенко Константину Валерьевичу, гражданство Российская
Федерация,
ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация «Лакказы и лигнинолитические пероксидазы дереворазрушающего гриба *Trametes hirsuta*: эволюция, транскрипция, секреция и участие в процессах биодеструкции» по специальности 1.5.4. Биохимия принята к защите 31.07.2023 г. (протокол № 17) диссертационным советом Д 24.1.233.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет утвержден Федеральной службой по надзору в сфере образования и науки (Рособрнадзор), приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г. с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13.02.2013 г. № 74/нк, от 10.02.2014 г. № 55/нк, от 30.09.2015 г. № 1166/нк, от 13.03.2019 г. № 222/нк, от 03.06.2021 г. № 561/нк и 22.03.2023 г. № 501/нк.

Соискатель:

Моисеенко Константин Валерьевич (1987 года рождения) в июне 2009 года окончил Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Архангельский государственный технический университет» с присуждением квалификации инженера по специальности «Биотехнология», после чего

с 2012 по 2016 обучался в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук (с июля 2015 переименован в ФИЦ Биотехнологии РАН). С 2012 и по настоящее время работает в лаборатории молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН в должности младшего научного сотрудника.

Диссертационную работу соискатель Моисеенко К.В. выполнял в лаборатории молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН.

Научный руководитель:

Куликова Наталья Александровна, доктор биологических наук (специальность 03.00.16 “Экология”), ведущий научный сотрудник лаборатории агроэкологии кафедры общего земледелия и агроэкологии факультета почвоведения ФГОУ ВО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова".

Официальные оппоненты:

Болотов Иван Николаевич, доктор биологических наук (специальность 03.00.16 “Экология”), член-корреспондент РАН, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лаврова Уральского отделения Российской академии наук» (ФГБУН ФИЦКИА УрО РАН);

Лавров Константин Валерьевич, кандидат биологических наук (специальность 03.02.07 “Генетика”), начальник лаборатории молекулярной биотехнологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

Выбор официальных оппонентов был обусловлен:

тем, что доктор биологических наук, член-корреспондент РАН **Болотов Иван Николаевич** является одним из ведущих отечественных специалистов в области экологии, молекулярной филогенетики и эволюции;

тем, что кандидат биологических наук, **Лавров Константин Валерьевич** является одним из ведущих отечественных специалистов в области генетики, биохимии и энзимологии;

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них большого числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах.

Оба официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Моисеенко Константина Валерьевича.

Ведущая организация:

Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской Академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН) в своем положительном отзыве, подписанном кандидатом биологических наук, в.н.с. Лаборатории микробной энзимологии Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук (ИБФМ РАН) – обособленного подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН Лисовым Александром Викторовичем и утвержденном директором ФИЦ ПНЦБИ РАН д.ф.-м.н. Грабарником Павлом Яковлевичем, указал, что диссертационная работа Моисеенко Константина Валерьевича является самостоятельной научно-квалификационной работой, которая соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. к кандидатским диссертациям, а ее автор, Моисеенко Константин Валерьевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен тем, что в ФИЦ ПНЦБИ РАН активно ведутся исследования в области микробиологии, микологии, биохимии грибов и энзимологии грибных ферментов. Таким образом, сотрудники ФИЦ ПНЦБИ РАН и, в частности, ИБФМ РАН, являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования, непосредственно связанные с тематикой диссертационной работы Моисеенко Константина Валерьевича.

В целом, высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность данной диссертационной работы.

Публикации:

Основные результаты диссертационной работы Моисеенко Константина Валерьевича изложены в **9 статьях** в рецензируемых научных журналах, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК РФ, что соответствует требованиям п. 11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842:

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

Результаты работы также были представлены на **6 международных конференциях** (и опубликованы в материалах этих конференций), в частности на **Международной научной конференции «Биотехнологии в химико-лесном комплексе»** (г. Архангельск, Россия, 2014); **38-й** (г. Санкт-Петербург, Россия, 2013), **43-й** (г. Прага, Чехия, 2018) и **45-й** (г. Любляна, Словения, 2021) **Международных конгрессов Федерации Европейских биохимических обществ – FEBS**; **8-й международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика»** (г. Ялта, Россия, 2020).

В перечисленных публикациях адекватно отражены результаты экспериментальной работы, проведенной в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, член-корреспондента РАН **Болотова Ивана Николаевича** (положительный). **Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:**

1. При столь подробном рассмотрении опубликованных на сегодняшний день работ по эволюции лакказ и лигнинолитических пероксидаз в обзоре литературы отсутствует ссылка на опубликованное в 2021 г. исследование «Геномный анализ проливает свет на эволюцию образа жизни Agaricales и увеличение разнообразия пероксидаз» (Genomic analysis enlightens Agaricales lifestyle evolution and increasing peroxidase diversity, doi: 10.1093/molbev/msaa301) и обзор 2022 г. «Реконструкция предковой последовательности как инструмент изучения эволюции дереворазрушающих грибов» (Ancestral sequence reconstruction as a tool to study the evolution of wood decaying fungi, <https://doi.org/10.3389/ffunb.2022.1003489>), хотя более ранние работы этих исследовательских групп достаточно подробно освещены.

2. Как в случае лакказ, так и в случае пероксидаз, на рисунках, демонстрирующих результат согласования дерева генов с деревом видов, в подписи отсутствует указание того, что на дереве генов обозначают треугольники. Хотя в случае диссертации данное указание не является обязательным, в автореферате его отсутствие затрудняет восприятие, поскольку в тексте автореферата не показывается полностью «развернутое» дерево генов по которому можно определить, как выглядели «сложенные» клады.

3. Насколько общеупотребимым является значение слов «изофермент» и «изоформа», используемые в диссертационной работе?

4. Учитывая важную роль эволюционной составляющей в работе, проводилась ли филогенетическая реконструкция с использованием байесовского подхода или использовался исключительно метод максимального правдоподобия?

5. Какими соображениями руководствовались при выборе использованного в работе лигнина (CAS 8068-05-1, Sigma-Aldrich, США)? В работе нет информации, из каких видов древесины он получен, лиственных или хвойных? Известно, что в Российской Федерации преобладающим методом делигнификации древесины в процессах получения целлюлозно-бумажных полуфабрикатов является сульфатный или крафт способ. Несмотря на то, что получение препаратов лигнина трудоемкая задача, представляет интерес использование промышленных образцов от отечественных предприятий, работающих по различающимся режимам и видам используемого сырья.

6. В работе встречаются не очень удачные выражения, например, «гемицеллюлоза» (стр. 10), в русском языке этот термин используется как правило во множественном числе; «углеводная и лигниновая компоненты» (стр. 13). Понятие «крафт-лигнин» в ряде случаев пишется через дефис (стр. 82, 53 и др.), в ряде – в 2 слова (стр. 2, 28). Целесообразно использовать выражение «сульфатный лигнин», что является общепринятым в отечественной научной и технической литературе.

Отзыв официального оппонента кандидата биологических наук **Лаврова Константина Валерьевича** (положительный). **Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:**

1. В диссертации не указано, насколько актуальна биотехнологическая валоризация лигнина через низкомолекулярные соединения, по сравнению с другими способами использования лигнина. Продукты деполимеризации лигнина наверняка токсичны и не могут быть эффективно усвоены в микробиологическом синтезе. В то же время из лигнина делается ряд широко востребованных продуктов – это полимерные материалы, фенолформальдегидные смолы, клеящие композиции в производстве ДСП, картона, фанеры и др. Гидролизный лигнин служит котельным топливом в лесохимических производствах, а также сырьём для получения гранулированного активированного угля, пористого кирпича, удобрений, уксусной и щавелевой кислот, наполнителей.

2. В диссертации не указан источник последовательности генома *T. hirsuta* – неопубликованные данные автора, или последовательность, заложенная в публично доступную базу данных. В последнем случае, она должна быть аннотирована автоматически, и тогда не ясен вклад автора в идентификацию генов лакказ и пероксидаз.

3. Результаты, представленные в выводе 2, корректнее было бы представлять (как в этом выводе, так и в тексте Результатов) как предположительные, а не как доказанные. Они основаны не на исследовании геномов *T. hirsuta*, отобранных в Меловом и других древних периодах, а на биоинформатической обработке геномов современных организмов.

4. Автор не поясняет, как знание эволюционной истории генов исследованных ферментов может помочь научно обоснованному выбору ферментов для практических задач. В связи с этим часть работы, посвящённая эволюционному анализу, выглядит не совсем связанной с практической частью работы, посвящённой анализу секреции и транскрипции, а также характеру деградации лигнина.

Также, необходимо отметить мелкие недочёты текста, например, ошибки в некоторых заголовках («2.2.2 Исследование продуктов деградации крафт лигнина методом», «2.2.1 Исследование состава экзопротеома методом»).

Отзыв ведущей организации **ФИЦ ПНЦБИ РАН** (положительный). **Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:**

1. Можно ли говорить о конститутивной продукции лигнинолитических ферментов, в первую очередь, лакказы, если в состав среды для культивирования гриба входит пептон? В составе пептона содержатся ароматические соединения, способные служить индукторами.

2. В ходе экспериментов отмечалось, что отбор проб «... осуществляли на 3-и, 5-е и 8-е сутки культивирования, соответствовавшие началу логарифмической, середине логарифмической и началу стационарной фаз роста гриба». Однако кривые роста не приведены. Каким образом определяли фазу роста гриба?

3. Хорошо изучено, что продукция лигнинолитических пероксидаз начинается при переходе культуры гриба к голоданию по некоторым источникам питания, в первую очередь по азоту. Контролировалось ли содержание азота в ходе культивирования? Возможно ли, что практически отсутствующая продукция лигнинопероксидазы обусловлена отсутствием голодания культуры по азоту?

На автореферат поступили положительные отзывы от:

Шаховой Натальи Витальевны, кандидата биологических наук (специальность 03.01.05 “Физиология и биохимия растений”), научного сотрудника лаборатории биохимии грибов ФГБУН Ботанического института им В.Л. Комарова Российской академии наук (БИН РАН). **В отзыве имеются следующие вопросы и замечания:**

1. В качестве замечания можно отметить не совсем удачное, на мой взгляд, использование оборота «типичный представитель грибов белой гнили – *Trametes hirsuta*» в разделе «Объект исследования» и «Теоретическая и практическая значимость» (стр. 5). Не совсем понятно, что подразумевается под термином «типичный представитель грибов белой гнили» и на основании каких признаков *Trametes hirsuta* типичен.

Канарского Альберта Владимировича, доктора технических наук, профессора ФГБОУ «Казанский национальный исследовательский технологический университет».

В отзыве имеются следующие вопросы и замечания:

1. Автор для исследования биотрансформации лигнина ферментной системой *T. hirsuta*, вносил в среду GP субстрат крафт-лигнин (GP+KL) (стр. 19). Необходимо пояснить из какой древесины извлечен крафт-лигнин, какая технология делигнификации древесины (параметры процесса), способ выделения из щелока. Что может сказать автор о функциональных свойствах использованного крафт-лигнина и их влиянии на лигнинолитическую систему *T. hirsuta*.

Голденковой-Павловой Ирины Васильевны, доктора биологических наук, доцента, Руководителя лаборатории функциональной геномики, ведущего научного сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им К.А. Тимирязева Российской академии наук. **В отзыве имеются следующие вопросы и замечания:**

1. О секретиции лакказ и пероксидаз – известны ли лидерные последовательности в составе лакказ и пероксидаз, за счет которых и может происходить их секреция? И есть ли алгоритмы биоинформатического анализа, с помощью которых можно было бы сделать предсказание о наличии сигнальных пептидов у этих семейств белков?

2. Соискатель установил, что на контрольной GP среде основными секретируемыми белками являлись один изофермент лакказы – LacA, и два изофермента лигнинолитических пероксидаз – MnP5 и VP2. В качестве причин отсутствия в экзопротеоме других изоформ ферментов, гены которых транскрибировались, диссертантом высказано предположение о возможных дополнительных постреприпционных изменениях, а также о роли стабильности белка. Хотелось бы отметить, что кроме вышеперечисленного отсутствие лидерных сигналов или особенности 3D-структуры, которые не позволяют пройти белку через секреторный путь клетки, могут так же иметь значение. Хотелось бы знать мнение диссертанта по этому вопросу.

Волобуева Сергея Викторовича, кандидата биологических наук (специальность 03.02.12 “Микология”), старшего научного сотрудника лаборатории систематики и географии грибов ФГБУН Ботанического института им В.Л. Комарова Российской академии наук (БИН РАН). **В отзыве имеются следующие вопросы и замечания:**

1. Проводилось ли согласование деревьев генов лакказ и пероксидаз с современным деревом видов грибов порядка Polyporales, где учтены клады *Gelatorporiaceae*, *Grifolaceae*, *Incrustoporiaceae*, *Ischnodermataceae*, не входящие в проанализированные автором базовую полипоридную, антродиевую, флебиоидную и остаточную полипоридную клады?

Псурцевой Надежды Васильевны, кандидата биологических наук (специальность 1.5.18. “Микология” и 1.5.21. «физиология и биохимия растений»), ведущего научного сотрудника с возложением обязанности руководителя лаборатории биохимии грибов, ФГБУН Ботанического института им В.Л. Комарова Российской академии наук (БИН РАН). **В отзыве имеются следующие вопросы и замечания:**

1. В качестве замечания можно выразить сожаление о том, что в автореферате нигде не указан конкретный штамм *T. hirsuta*, который являлся объектом исследования, откуда он был получен и как хранился (в диссертации эта информация есть), а также его идентификационный номер в Генбанке NCBI.

2. Некоторую путаницу вносит словосочетание на рисунках 8 и 9 «...на контрольной GP+Vr среде...», поскольку, как было заявлено, контрольная это GP среда, а GP+Vr – опытная.

В обсуждении приняли участие:

Попов В.О., Варламов В.П., Крицкий М.С., Марданов А.В., Шишкин С.С., Терешина В.М., Федорова Т.В., Федоров А.Н.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие **основные результаты:**

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 полипоридной клады) произошли от одного предкового гена, наибольшее число дупликаций которого происходило в раннем Меловом периоде. В тоже время, все гены пероксидаз *T. hirsuta* (как и других грибов порядка Polyporales) произошли от восьми

предковых генов, часть которых была потеряна к концу раннего Мелового периода, а оставшаяся часть претерпела обширные параллельные дубликации 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 секретлируемых грибом изоферментов пероксидаз.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что:

было проведено всестороннее изучение мультигенных семейств лакказ и лигнинолитических пероксидаз *T. hirsuta* – базидиального дереворазрушающего гриба, вызывающего белую гниль древесины. Полученные результаты в дальнейшем позволят понять индивидуальную роль каждого изофермента как в процессе биodeградации ксенобиотиков грибами белой гнили, так и в процессе биотрансформации растительных и древесных субстратов этими грибами.

Практическая значимость работы заключается в том, что:

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.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений;
- выводы диссертационной работы четко сформулированы и отражают наиболее значимые результаты работы.

Личный вклад соискателя состоит:

- в получении основных результатов работы либо лично автором, либо при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов;
- в обработке, интерпретации и анализе экспериментальных данных;
- в подготовке публикаций по выполненной работе.

