

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Кислицин Валерий Юрьевич

**Роль транскрипционных факторов в биосинтезе целлюлаз
мицелиального гриба *Penicillium verruculosum***

1.5.6 Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2023

Диссертация подготовлена в Лаборатории биотехнологии ферментов Института биохимии им. А.Н. Баха ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Научный руководитель: **Рожкова Александра Михайловна**
кандидат химических наук

Официальные оппоненты: **Швядас Витаутас-Юозапас Каятоно**
доктор химических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», факультет биоинженерии и биоинформатики, профессор

Донова Марина Викторовна
доктор биологических наук, ФГБУН «ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований» РАН», Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, отдел аналитической биохимии, заведующая лабораторией микробиологической трансформации органических соединений

Лавров Константин Валерьевич
кандидат биологических наук, ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Курчатовский комплекс нано-, био-, инфо-, когнитивных и социогуманитарных наук и природоподобных технологий, лаборатория молекулярной биотехнологии, начальник лаборатории

Защита состоится «12» декабря 2023 года в 17:00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: Москва ул. Ленинские горы, д. 1 стр. 12, ауд. М-1.

E-mail: nvkostina@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.2/2733>

Автореферат разослан «09» ноября 2023 года.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Н.В. Костина

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования. Мицелиальные грибы родов *Trichoderma* (*Hypocrea*), *Aspergillus*, *Penicillium* (*Talaromyces*), широко используются в качестве продуцентов технических ферментов, таких как амилазы, бета-глюканазы, инулиназы, ксиланазы, маннаназы, пектиназы, целлюлазы и другие гидролазы, а также оксидазы, протеазы, трансферазы и др. Ферментные препараты (ФП), полученные с помощью мицелиальных грибов, применяются в сельском хозяйстве (кормовые добавки, средства защиты растений), пищевой промышленности (производство мясных и колбасных изделий, сыроварение, хлебопечение, производство соков и др.), целлюлозно-бумажной и текстильной промышленности (получение целлюлозного волокна с улучшенными свойствами, бесхлорное отбеливание целлюлозы), производстве бытовых моющих средств (стиральные порошки), переработке сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов, а также для биоконверсии возобновляемой растительной биомассы [Синицын и др., 2020].

В Лаборатории биотехнологии ферментов ФИЦ Биотехнологии РАН проводятся систематические исследования, направленные на создание штаммов-продуцентов различных ферментов на основе целлюлолитического гриба *Penicillium verruculosum* (с 2011 года *Talaromyces verruculosus*) В1-151-221 (ВКМ F-3972). Продуктивность штамма-реципиента *P. verruculosum* В1-537, полученного на основе *P. verruculosum* В1-151-221 путем индуцированного мутагенеза, достигает 50-60 грамм белка с одного литра культуральной жидкости (КЖ) в промышленных условиях, что позволяет успешно использовать его в качестве платформы для получения ФП для биоиндустрии [Синицын и др., 2020].

За последнее десятилетие на основе штамма *P. verruculosum* В1-537 с использованием сильного индуцибельного промотора гена *cbh1*, кодирующего основную целлюлазу гидролитического комплекса – целлобиогидролазу 1, был получен широкий круг ФП для различных биотехнологических процессов [Синицын и др., 2015; Volkov et al., 2019]. Однако у рекомбинантных штаммов, характеризующихся высокой продукцией целевого фермента, наблюдается в ряде случаев снижение общей продуктивности по секретируемому белку в 2 и более раза, что приводит к снижению экономической эффективности процесса получения — ФП на основе рекомбинантных штаммов, и, как следствие, увеличивает стоимость использования ФП в биотехнологических процессах.

Известно, что биосинтез внеклеточных ферментов в мицелиальных грибах регулируется различными типами транскрипционных факторов (ТФ), осуществляющих активацию или репрессию транскрипции генов посредством ДНК-белкового взаимодействия с специфическими нуклеотидными последовательностями на промоторных областях генов [Kowalczyk et al., 2014]. Таким образом, возможной причиной падения продуктивности рекомбинантных штаммов-монопродуцентов *P. verruculosum* может являться нарушение регуляторного механизма в случае встраивания в геном гриба большого числа копий рекомбинантных генов под промотором гена *cbh1* [Чулкин и др., 2019]. Таким образом, изучение ТФ, регулирующих транскрипцию генов основных

целлюлаз *P. verruculosum*, в том числе гена *cbh1*, является актуальной научной задачей, имеющей фундаментальное значение в области молекулярной генетики, а также практический смысл для технологии получения промышленных ФП.

Цель и задачи исследования. Цель работы состояла в изучении механизма регуляции транскрипции генов ключевых целлюлаз в мицелиальном грибе *P. verruculosum* для улучшения его производственных характеристик, таких как продуктивность, продолжительность культивирования, состав и гидролитическая способность секретируемого комплекса.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Адаптировать систему CRISPR/Cas9 для геномного редактирования *P. verruculosum*;

2. Клонировать гены *clr1*, *xlnR*, *clr2*, *tacA*, кодирующие факторы транскрипции целлюлаз Clr1, Clr2, XlnR, TacA;

3. Получить рекомбинантные штаммы: *P. verruculosum* Δ *clr1*, *P. verruculosum* Δ *clr2*, *P. verruculosum* Δ *xlnR*, *P. verruculosum* Δ *tacA* с нокаутами генов транскрипционных факторов Clr1, Clr2, XlnR, TacA и определить влияние произведенных нокаутов на транскрипцию генов *cbh1*, *egl2*, *bgl1*, кодирующих основные целлюлазы *P. verruculosum* – целлобиогидролазу 1 (ЦБГ1), эндоглюканазу 2 (ЭГ2) и β -глюкозидазу (БГЛ);

4. Получить рекомбинантные штаммы серий: *P. verruculosum* Clr1, *P. verruculosum* Clr2, *P. verruculosum* XlnR с конститутивной экспрессией генов *clr1*, *xlnR*, *clr2* и определить влияние конститутивной экспрессии ТФ на продуктивность и гидролитическую активность целлюлазного комплекса *P. verruculosum*;

5. Создать новый рекомбинантный штамм *P. verruculosum*, обладающий улучшенной гидролитической способностью по отношению к целлюлозосодержащим субстратам.

Научная новизна исследования и теоретическая значимость работы.

Впервые для мицелиального гриба *P. verruculosum* адаптирована методика геномного редактирования CRISPR-Cas9, с помощью которой показано, что направленный нокаут гена *cbh1* активизирует экспрессию генов других целлюлаз.

Впервые были клонированы и определены нуклеотидные последовательности генов *clr1*, *clr2*, *xlnR* и *tacA* *P. verruculosum*, кодирующие транскрипционные факторы Clr1, Clr2, XlnR, TacA. Установлено, что конститутивная экспрессия гена *xlnR* в грибе *P. verruculosum* значительно повышает ксиланазную активность ферментного комплекса. Показано, что транскрипционный фактор TacA в грибе *P. verruculosum*, в отличие от своего гомолога в грибе *P. oxalicum*, является репрессором транскрипции целлюлаз.

Практическая значимость работы. Адаптированная в ходе работы методика редактирования генома на основе технологии CRISPR-Cas9 для мицелиального гриба *P. verruculosum* В1-221-151 позволяет получать штаммы с направленными нокаутами генов, что может быть использовано как для изучения роли этих генов, так и для получения новых реципиентных штаммов с улучшенными свойствами.

В результате нокаута гена *tacA* получен штамм *P. verruculosum* Δ*tacA*:Δ*niaD* с увеличенной активностью целлюлаз, а время его культивирования для наработки ФП составляет 96 ч, что на 48 ч меньше, чем у исходного штамма.

В результате трансформации штамма *P. verruculosum* Δ*tacA*:Δ*niaD* плазмидой pCBHI-BG, несущей ген *bgl1* *Aspergillus niger*, кодирующей целлюбиазу, были получены новые рекомбинантные штаммы серии *P. verruculosum* dT16, обладающие высокой авицелазной (целлюбиогидролазной) и β-глюкозидазной (целлюбиазной) активностью. Гидролитическая способность нового ФП dT16-13 на основе штамма *P. verruculosum* Δ*tacA*:*bgl1* была выше в 1.5 раза в сравнении с ФП исходного штамма В1-221-151 по отношению к микрокристаллической целлюлозе (МКЦ).

Методология и методы исследования. В ходе выполнения работы были использованы методы молекулярной биологии: молекулярное клонирование, амплификация ДНК, генетическая трансформация мицелиальных грибов, количественная ПЦР, нокаут генов методом CRISPR-Cas9, а также методы биохимии: электрофорез белков по Лэмли, определение концентрации белка по Лоури, определение целлюбиогидролазной, β-глюкозидазной, эндоглюканазной, ксиланазной, глюкозооксидазной ферментативных активностей, ионообменная хроматография и т.д.

Положения выносимые на защиту

1. Адаптирована методика направленного редактирования генома мицелиального гриба *P. verruculosum* В1-221-151 с использованием технологии CRISPR-Cas9, что позволило проводить нокаут маркерного гена *niaD*, кодирующего нитратредуктазу, с одновременным нокаутом целевого гена;

2. Транскрипционные факторы Clr1, Clr2 и XlnR активируют транскрипцию генов основных целлюлаз у мицелиального гриба *P. verruculosum*.

3. Транскрипционный фактор TacA в мицелиальном грибе *P. verruculosum* является репрессором транскрипции генов целлюлаз и его нокаут приводит к значительному повышению авицелазной активности уже на 4-ые сутки культивирования штамма *P. verruculosum* Δ*tacA*:Δ*niaD*;

4. Получен ФП dT16-13, обладающий в 1.5 раза большей гидролитической способностью по отношению к МКЦ, чем ФП В1-221-151.

Личное участие аспиранта в получении результатов. Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены автором лично или при непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и выполнение экспериментов, обработку данных, оформление и публикацию результатов.

Степень достоверности. Достоверность представленных в диссертационной работе данных определяется использованием современных генетических физико-химических методов исследования, выполнением экспериментов на сертифицированном оборудовании, использованием стандартных норм и протоколов, рекомендованных фирмами-производителями.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на XXXI Зимней молодёжной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва 11-14 февраля 2019 года, IX Международной школе молодых учёных по молекулярной генетике «Геномика 21 века – от исследования геномов к генетическим технологиям», Москва 15-19 марта 2021 года, на ежегодных конференциях аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН в 2019 - 2021 годах, VII Съезде биохимиков и молекулярных биологов России, Сочи, 3-7 сентября 2022 года

Публикации. По материалам работы опубликовано 7 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus, WoS и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М. В. Ломоносова. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Связь работы с государственными программами. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Соглашения № 075-15-2021-1071 от 28.09.2021, проекта РФФИ № 18-29-07070 (2019-2021 гг), а также с использованием оборудования ЦКП «Промышленные биотехнологии».

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 128 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы, содержащий ссылки на 193 источников, и приложения. Работа иллюстрирована 48 рисунками, содержит 25 таблиц.

Основное содержание работы

Обзор литературы представлен в Главе 3 диссертационной работы. В нем рассмотрены основные аспекты регуляции транскрипции генов целлюлаз в мицелиальных грибах. Описаны современные подходы по улучшению продуктивности мицелиальных грибов как продуцентов ферментов и других белков, а также рассмотрены примеры редактирования геномов мицелиальных грибов с помощью технологии CRISPR-Cas9.

Материалы и методы описаны в Главе 4 диссертационной работы. Перечислены использованные штаммы микроорганизмов и среды для их культивирования. Приведены методики выделения нуклеиновых кислот из мицелиальных грибов, и методы клонирования генов, количественной ПЦР, методы получения плазмид, использованных в работе, методика редактирования генома *P. verruculosum* с применением технологии CRISPR-Cas9. Описаны методы определения ферментативных активностей, хроматографического фракционирования ФП и ферментативного гидролиза целлюлозосодержащих материалов.

Результаты и обсуждение приведены в Главе 5 диссертационной работы.

Адаптация системы редактирования генома CRISPR-Cas9 для мицелиального гриба *P. verruculosum*. Изучение влияния транскрипционных

факторов на биосинтез целлюлаз в мицелиальном грибе *P. verruculosum* было основано на использовании подходов обратной генетики, для чего было решено использовать метод редактирования генома системой CRISPR/Cas9. Было проведено редактирование генома *P. verruculosum* В1-221-151 путём трансформации прототрофного штамма двумя плазмидами (Рисунок 1): первая содержала последовательность кодирующую направляющую-РНК (sgRNA) для нокаута маркерного гена нитратредуктазы (*niaD*) под контролем промотора 5S рРНК *A. niger*, вторая - ген нуклеазы *Cas9* под контролем конститутивного промотора гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*gpdA*) и последовательность кодирующую sgRNA для нокаута целевого гена. Ген *niaD* был использован в качестве маркерного, поскольку его нокаут кроме потери способности использовать нитраты как источник азота приводит к устойчивости к хлоратам, что позволяет вести первичный отбор трансформантов по росту на селективной среде с хлоратами.



Рисунок 1 – Схемы плазмид для редактирования генома *P. verruculosum*

Влияние моно- и олигосахаридов на транскрипцию гена *cbh1* *P. verruculosum*. Кроме композиций целлюлазных генов, регулируемых гомологами генов транскрипционных факторов *xlnR*, *clr1* и *clr2*, у различных видов мицелиальных грибов, также отличается чувствительность к моно- и олигосахаридам, индуцирующим транскрипцию генов целлюлаз. Например, для гриба *A. niger* индуктором транскрипции целлюлаз является ксилоза [Mach-Aigner et al., 2012], а для многих представителей рода *Penicillium* дисахариды – такие как гентиобиоза и софороза [Kurasawa et al., 1992], для *T. reesei* – софороза и лактоза [Sternberg et al., 1979].

Определение индукции транскрипции гена *cbh1* проводили путём инкубации предварительно выращенного мицелия *P. verruculosum* на минимальной среде (МС) на–в цитратном буфере без глюкозы с добавлением индукторов – ксилозы, ксилоолигосахаридов (КОС) со степенью полимеризации 3-5, целлобиозы, лактозы, софорозы, гентиобиозы, трегалозы и целлоолигосахаридов (ЦОС) со степенью полимеризации 2-3 – в ходе которой образцы мицелия отбирали через 75 мин, 3 и 5 часов. Из отобранных образцов выделяли общую РНК и с помощью количественной ПЦР определяли относительную транскрипцию гена *cbh1* нормализованную по референсным генам – актина (*actA*), β -тубулина (*tub2*) и глицероальдегид-3-фосфат дегидрогеназы (*gpdA*). Из результатов количественной ПЦР (Рисунок 2) следует, что целлобиоза, гентиобиоза и ксилоза индуцируют экспрессию гена *cbh1* уже

через 75 мин после начала культивирования *P. verruculosum*. Лактоза и трегалоза не индуцируют транскрипцию гена *cbh1* в течение всего эксперимента. Влияние целлотриозы в смеси целлоолигосахаридов (ЦОС) со степенью полимеризации 2–3 (целлобиоза и целлотриоза) в проведенном опыте оценить трудно, можно лишь предположить, что максимальная индукция в данном случае обеспечивается целлобиозой. Смесь КОС 3-5, по-видимому, также не индуцирует экспрессию гена *cbh1*, но продукты их гидролиза, такие как ксилоза и, возможно, ксилобиоза, работают как индукторы.

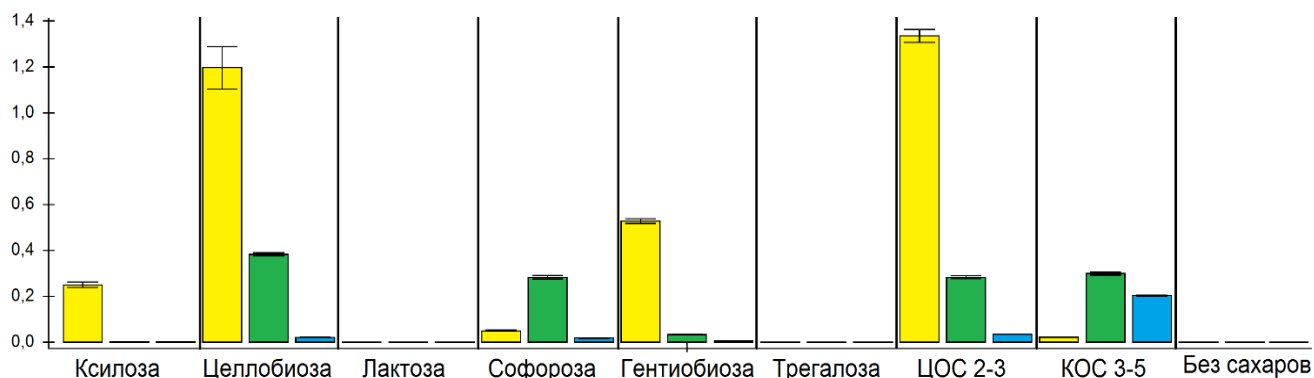


Рисунок 2 – Влияние моно- и олигосахаридов на экспрессию гена *cbh1* *P. verruculosum* через 75 мин (жёлтый столбик), 3 ч (зелёный), и 5 ч (синий) культивирования гриба. Данные представлены как относительные уровни мРНК гена *cbh1*, нормализованные на уровни экспрессии генов *actA*, *tub2* и *gpdA* *P. verruculosum*. Ось Y – относительные нормализованные значения транскрипции

Для дальнейших экспериментов в качестве индукторов были отобраны целлобиоза, целлотриоза (вместо ЦОС), гентиобиоза, ксилоза и ксилобиоза (вместо КОС).

Клонирование генов транскрипционных факторов Clr1, Clr2, XlnR и TacA *P. verruculosum*. Для определения влияния основных транскрипционных регуляторов целлюлаз Clr1, Clr2, XlnR и TacA у *P. verruculosum* были клонированы их гены. В результате секвенирования генов ТФ были получены их полные нуклеотидные последовательности. Размеры генов вместе с интронами составили: для *clr1* – 2391 п.о., для *clr2* – 2337 п.о., для *xlnR* – 2904 п.о. и 1390 п.о. для *tacA*. Анализ последовательностей клонированных генов показал, что они содержат домен типа «Цинковый палец», характерный для ТФ эукариот.

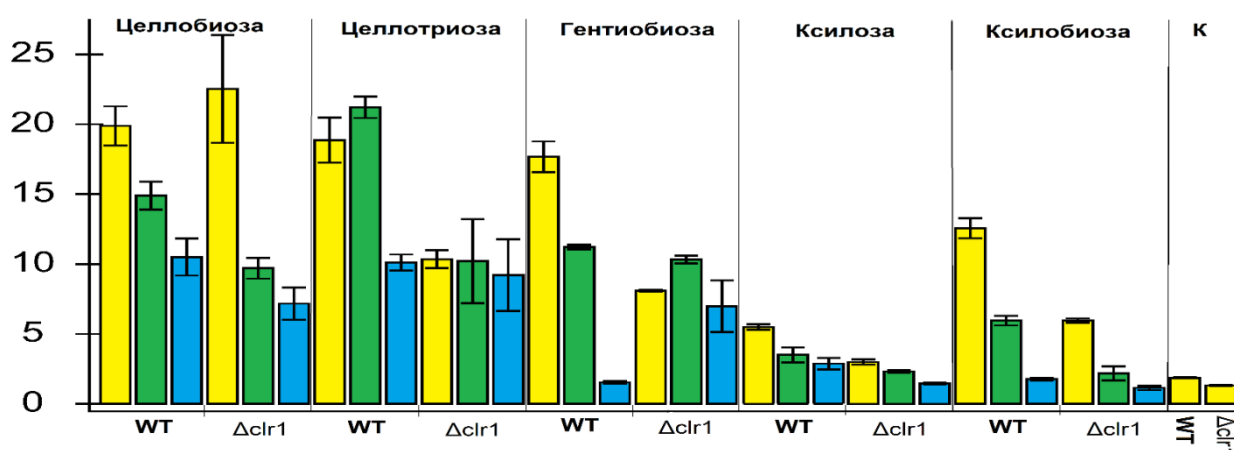
Было проведено сравнение полученных последовательностей с последовательностями транскрипционных факторов из базы данных NCBI «Non-redundant protein sequences» для грибов (Fungi taxid:4751) (Таблица 1).

Таблица 1 – Сравнение транслированных последовательностей генов ТФ *P. verruculosum* с последовательностями белков в базе данных NCBI [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/].

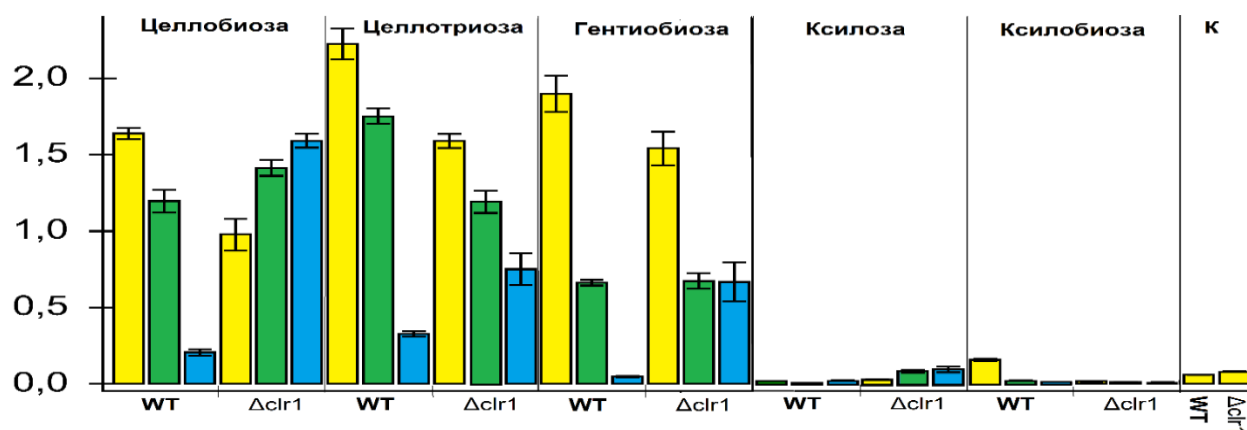
Ген	Ближайший гомолог	Совпадение, %
<i>clr1</i>	C6 finger domain protein, putative [<i>Talaromyces marneffe</i> ATCC 18224] XP_002147949.1	93
	Clr-1 [<i>Rasamsonia emersonii</i> CBS 393.64] XP_013328502.1	57
<i>clr2</i>	Clr2 like protein [<i>T. cellulolyticus</i>] BAQ59099.1	90
	C6 transcription factor, putative [<i>T. marneffe</i> ATCC 18224] XP_002151678.1	81
<i>xlnR</i>	Xylanolytic transcriptional activator xlnR [<i>T. marneffe</i> PM1] KFX43185	91
	Xylanolytic transcriptional activator xlnR [<i>T. pinophilus</i>] KAF3401166.1	93
<i>tacA</i>	aceA like protein [<i>T. pinophilus</i>] BAQ59092.1	94
	C2H2 transcription factor (Ace1), putative [<i>T. marneffe</i> ATCC 18224] Sequence ID: XP_002153476.1	92

Влияние нокаута гена *clr1* на транскрипцию генов *cbh1*, *egl2*, *bgl1*.

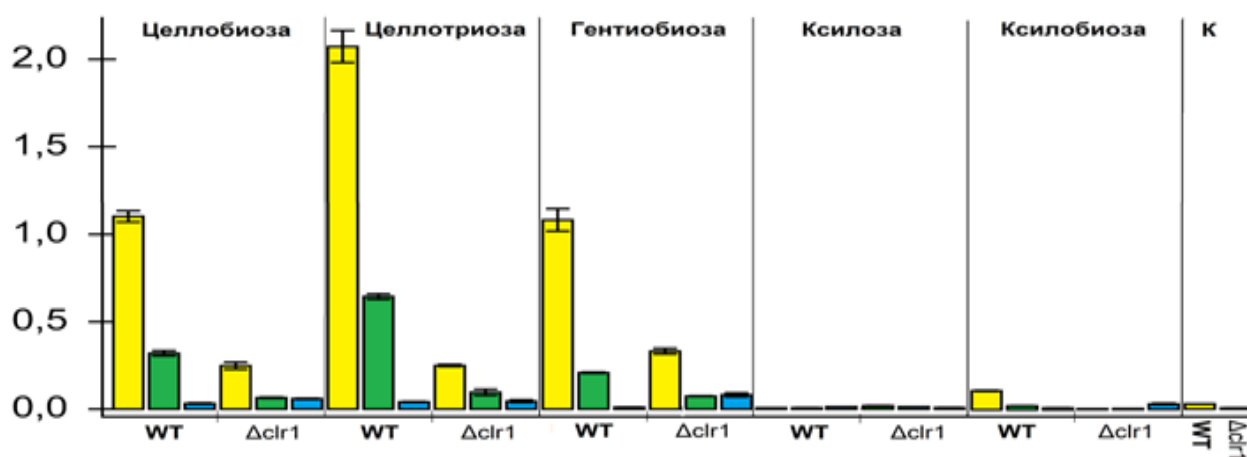
После нокаута гена *clr1* с использованием адаптированной методики геномного редактирования CRISPR-Cas9 была определена относительная нормализованная транскрипция генов *cbh1*, *egl2*, и *bgl1*, кодирующих ЦБГ1, ЭГ2 и БГЛ, соответственно (Рисунок 3). Результаты количественной ПЦР показали, что нокаут гена *clr1* слабо влияет на транскрипцию генов *cbh1* и *bgl1*. В то же время, для гена *egl2* наблюдается значительное падение уровня транскрипции от 3 до 8 раз под действием всех исследованных индукторов.



А



Б

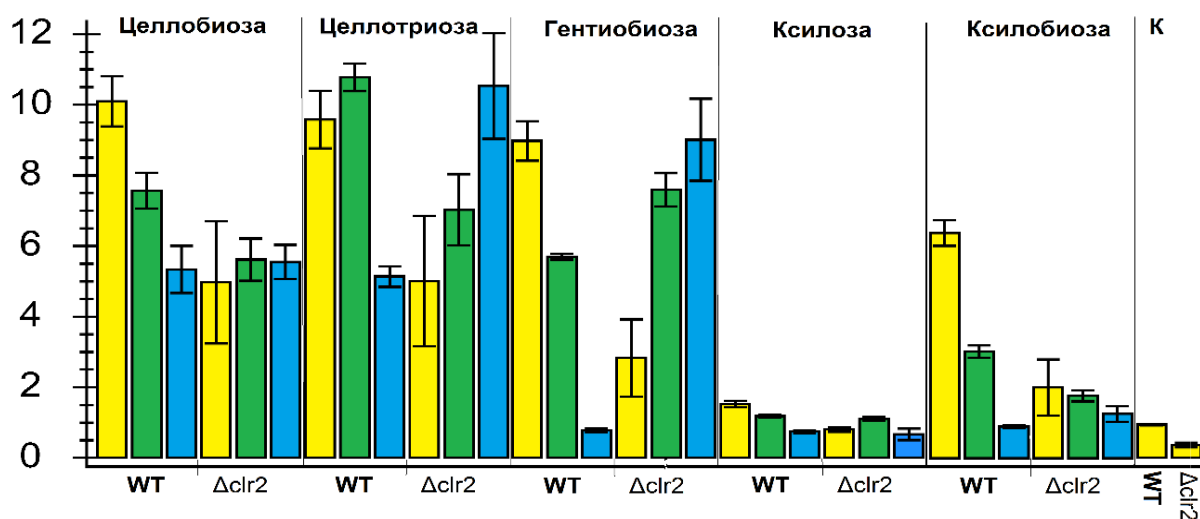


В

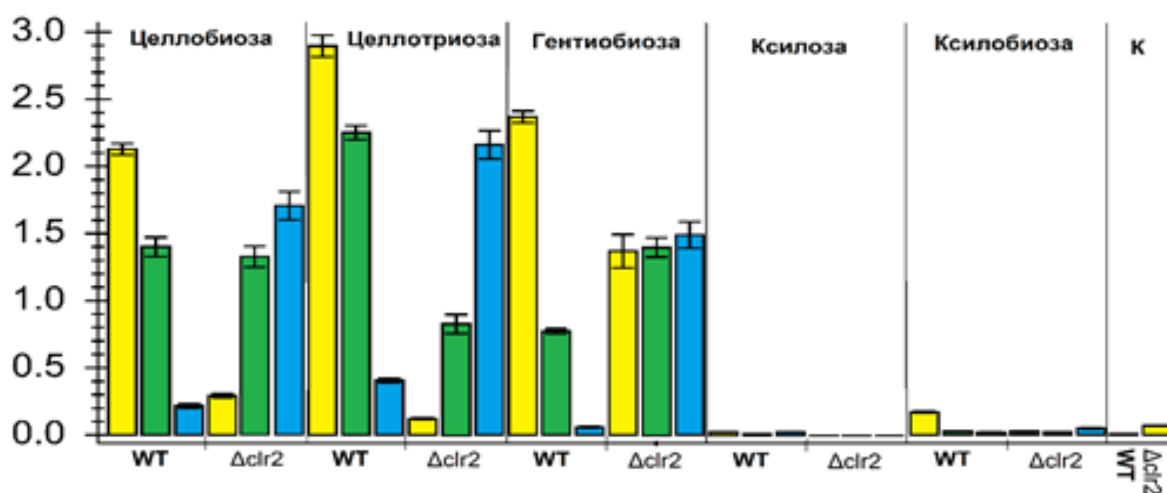
Рисунок 3 – Нормализованная относительная транскрипция генов *clr1* (А), *bgl1* (Б) и *egl2* (В) в штамме *P. verruculosum* $\Delta clr1$ и исходном штамме В1-221-151 (WT) через 1 ч (жёлтый столбик), 2 ч (зелёный), и 4 ч (синий) культивирования гриба. Ось Y – относительные нормализованные значения транскрипции, К – пробы без индукторов.

Следует отметить полное отсутствие индукции генов *egl2* и *bgl1* ксилобиозой и ксилозой в исходном штамме В1-221-151. Очевидно, что ТФ Clr1 у *P. verruculosum* в отличие от своего гомолога в *Neurospora crassa* не столь важен для транскрипции генов *cbh1* и *bgl1* и активирует, главным образом, транскрипцию гена *egl2*, подобно своему гомологу в *A. niger* [Raulo et al., 2016; Coradetti et al., 2013].

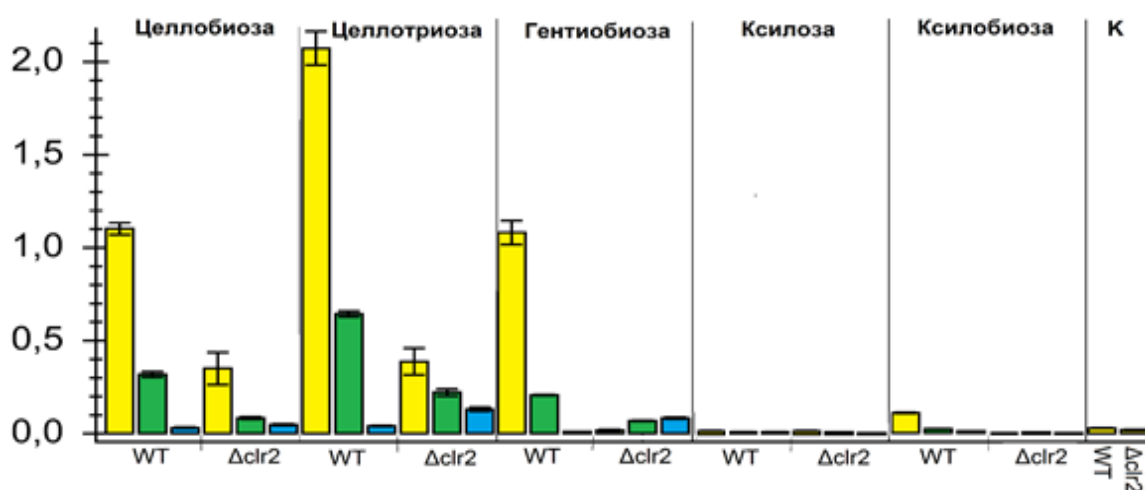
Влияние нокаута гена *clr2* на транскрипцию генов *cbh1*, *egl2*, *bgl1*. После нокаута гена *clr2* была определена относительная нормализованная транскрипция генов *cbh1*, *egl2*, и *bgl1* (Рисунок 4).



А



Б

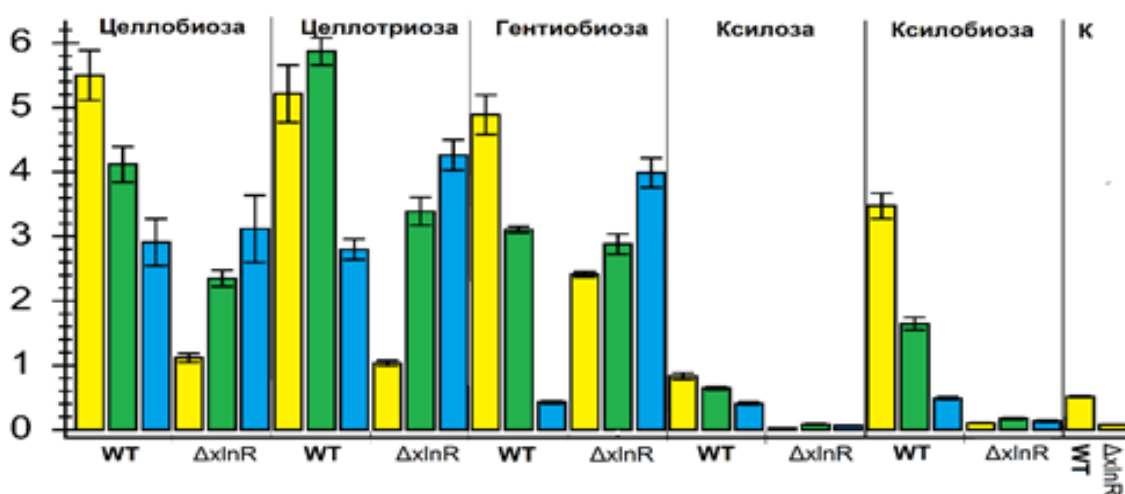


В

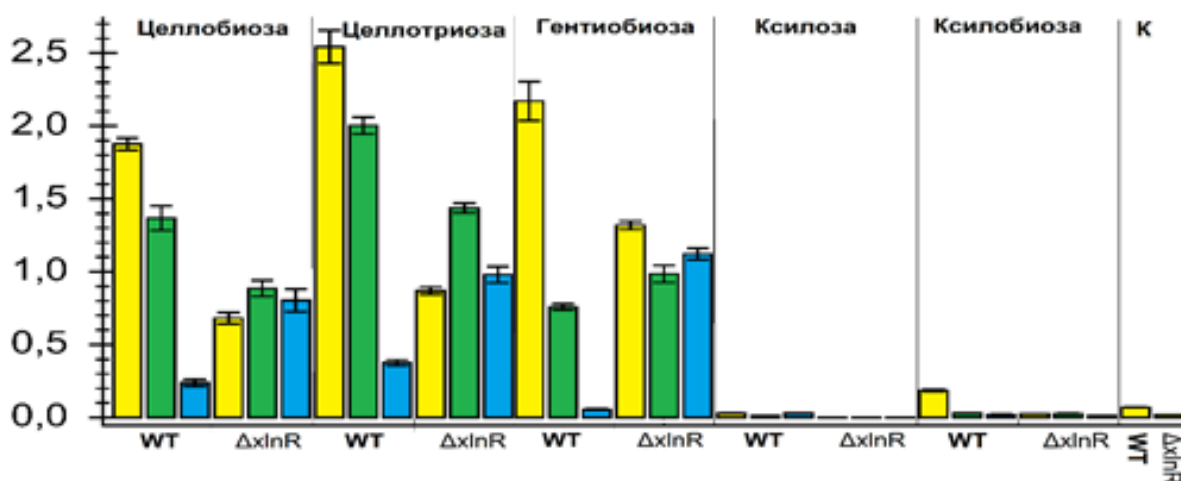
Рисунок 4 – Нормализованная относительная транскрипция генов *cbh1* (А), *bgl1* (Б) и *egl2* (В) в штамме *P. verruculosum* Δ clr2 и исходном штамме В1-221-151 (WT) через 1 ч (жёлтый столбик), 2 ч (зелёный), и 4 ч (синий) культивирования гриба. Ось Y – относительные нормализованные значения транскрипции, К – пробы без индукторов

Наблюдаемые эффекты при нокауте гена *clr2* у *P. verruculosum* оказались нетипичны, поскольку для таких мицелиальных грибов как *A. niger*, *P. oxalicum* и *N. crassa* было показано, что гомологи *clr2* строго необходимы для индукции целлюлолитического ответа и нокаут *clr2* приводит к практически полному подавлению экспрессии целлюлаз [Raulo et al., 2016; Li et al., 2015; Coradetti et al., 2013]. Однако данные количественной ПЦР показали, что нокаут гена *clr2* в *P. verruculosum* приводит лишь к задержке транскрипции генов *cbh1* и *bgl1* при индукции целлотриозой и гентиобиозой в случае *cbh1* и при индукции целлобиозой и целлотриозой гена *bgl1*. В то же время, уровень транскрипции гена *egl2* при нокауте гена *clr2* значительно снизился (от 5 раз на целлотриозе до практически полной потери индукции на гентиобиозе). Эти результаты свидетельствуют о необходимости ТФ Clr2 для экспрессии гена *egl2*.

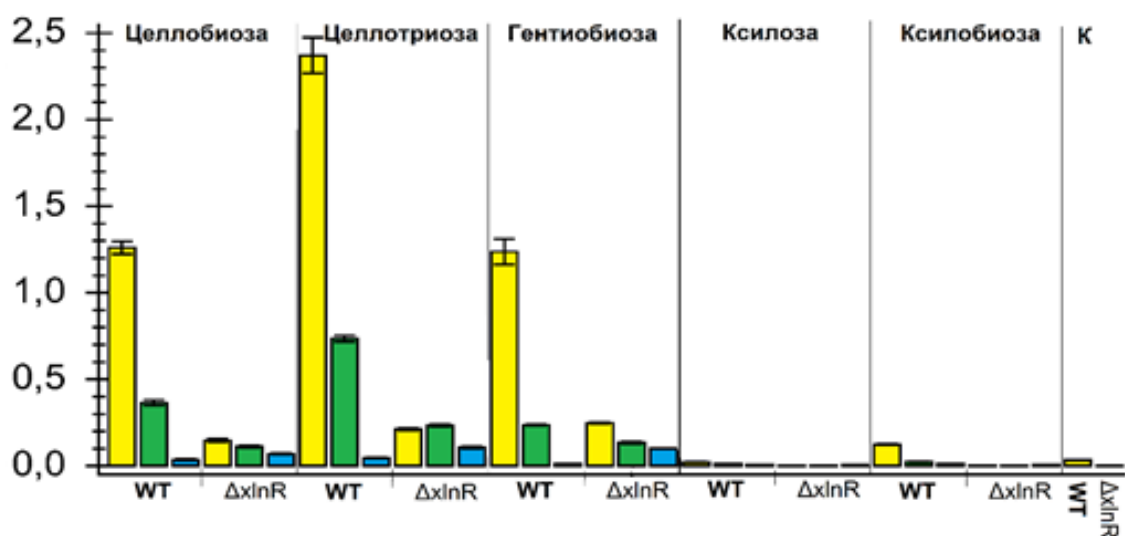
Влияние нокаута гена *xlnR* на транскрипцию генов *cbh1*, *egl2* и *bgl1*. После нокаута гена *xlnR* была определена относительная нормализованная транскрипция генов *cbh1*, *egl2*, и *bgl1* (Рисунок 5).



А



Б



В

Рисунок 5 – Нормализованная относительная транскрипция генов *cbh1* (А), *bgl1* (Б) и *egl2* (В) в штамме *P. verruculosum* $\Delta xlnR$ и исходном штамме В1-221-151 (WT) через 1 ч (жёлтый столбик), 2 ч (зелёный), и 4 ч (синий) культивирования гриба. Ось Y – относительные нормализованные значения транскрипции, К – пробы без индукторов

Данные, полученные с помощью количественной ПЦР свидетельствуют, что транскрипционный активатор XlnR участвует в активации транскрипции всех исследуемых генов. Однако снижение уровня транскрипции гена и *egl2* в штамме $\Delta xlnR$ было более значительно, чем в случае генов *cbh1* и *bgl1* при добавлении всех использованных индукторов.

Для гена *cbh1* также было характерно, что в штамме $\Delta xlnR$ полностью пропал эффект индукции ксилозой и ксилобиозой, а пик индукции целлобиозой, целлотриозой, и гентиобиозой сместился с 1 часа на 4 часа после их добавления в ферментационную среду, то есть процесс индукции замедлился. Небольшое повышение уровня транскрипции гена *cbh1* в штамме В1-221-151 на 2 ч индукции целлотриозой, скорее всего связана с добавочной индукцией целлобиозой, образовавшейся в результате гидролиза трисахарида под действием БГЛ в первый час индукции.

Таким образом, транскрипционный фактор XlnR участвует в активации транскрипции генов основных целлюлаз у *P. verruculosum* (также, как у *T. reesei* и *P. oxalicum* [Klaubauf et al., 2014; Li et al., 2015]), но лишь экспрессия гена *egl2* критически снижается при его отсутствии, тогда как транскрипции генов *cbh1* и *bgl1*, поддерживается за счёт действия других ТФ.

Анализ влияния конститутивной экспрессии генов *clr1*, *clr2*, *xlnR* на секрецию целлюлаз *P. verruculosum*. Поскольку результаты количественной ПЦР показали отрицательное изменение транскрипции генов *cbh1*, *bgl1*, *egl2* при нокаутах генов *clr1*, *clr2*, *xlnR* было целесообразно проверить влияние их конститутивной экспрессии на активность ферментного комплекса *P. verruculosum*. Для конститутивной экспрессии активаторов генов Clr1, Clr2 и XlnR, в мицелиальном грибе *P. verruculosum* были получены плазмиды (Рисунок

б), в которых соответствующие гены находятся под контролем промотора гена *gpdA* *P. verruculosum*.

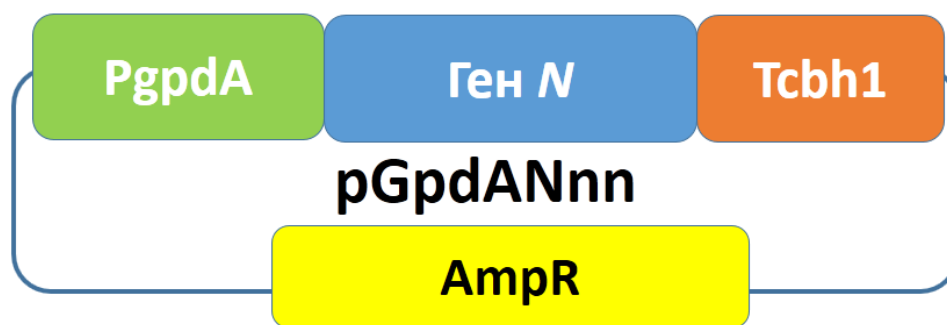


Рисунок 6 – Общая схема плазмид pGpdAClr1, pGpdAClr2 и pGpdAXlnR, где ген X соответственно *clr1*, *clr2*, *xlnR*

Плазмиды pGpdAClr1, pGpdAClr2 и pGpdAXlnR были использованы для котрансформации штамма *P. verruculosum* B1-537 с плазмидой pSTA-10. После подтверждения наличия вставок генов *clr1*, *clr2*, *xlnR* с промотором *gpdA* по одному клону культивировали в ферментационных установках. Динамика изменения концентрации белка и активности ферментов в КЖ представлены на Рисунках 7, 8.

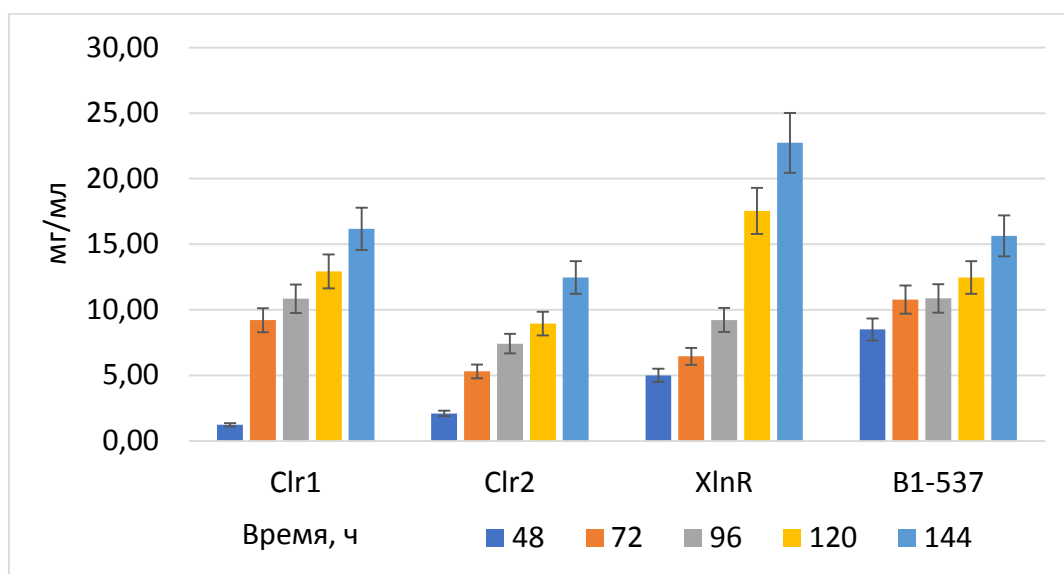
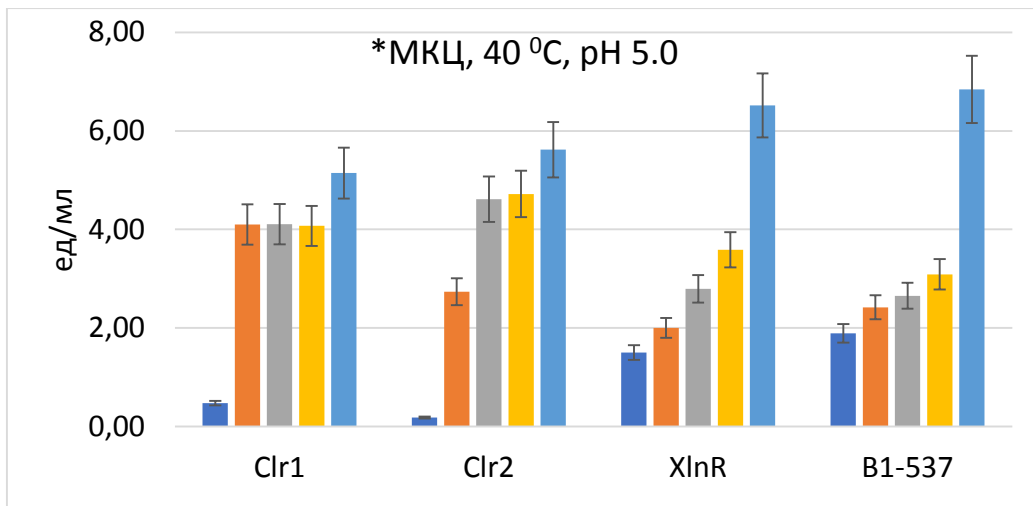
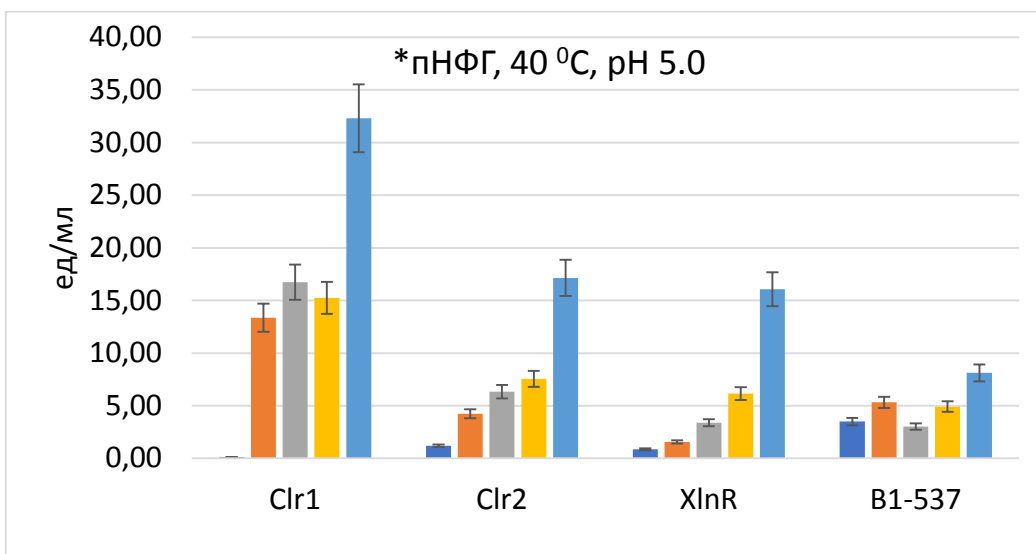


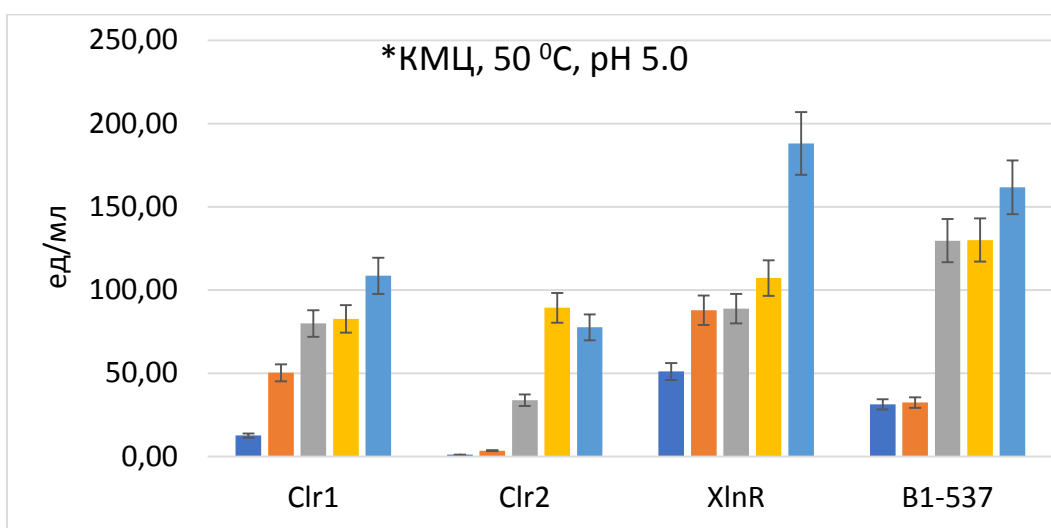
Рисунок 7 – Концентрация белка в КЖ штаммов *P. verruculosum* с конститутивной экспрессией генов *clr1*, *clr2*, *xlnR* и *P. verruculosum* B1-537 в динамике (48 - 144 часа)



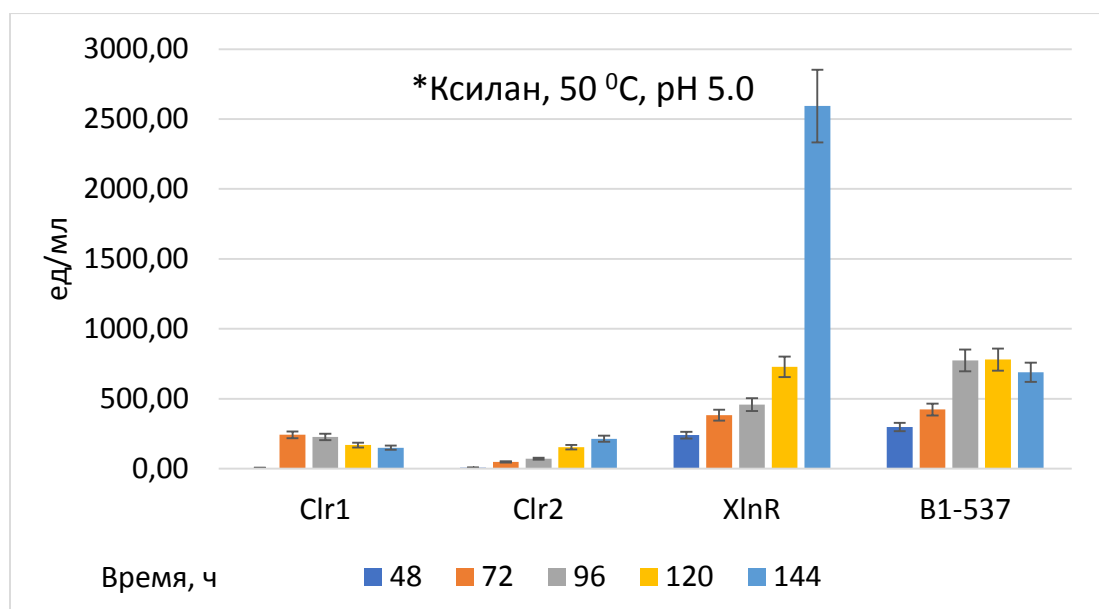
А



Б



Б



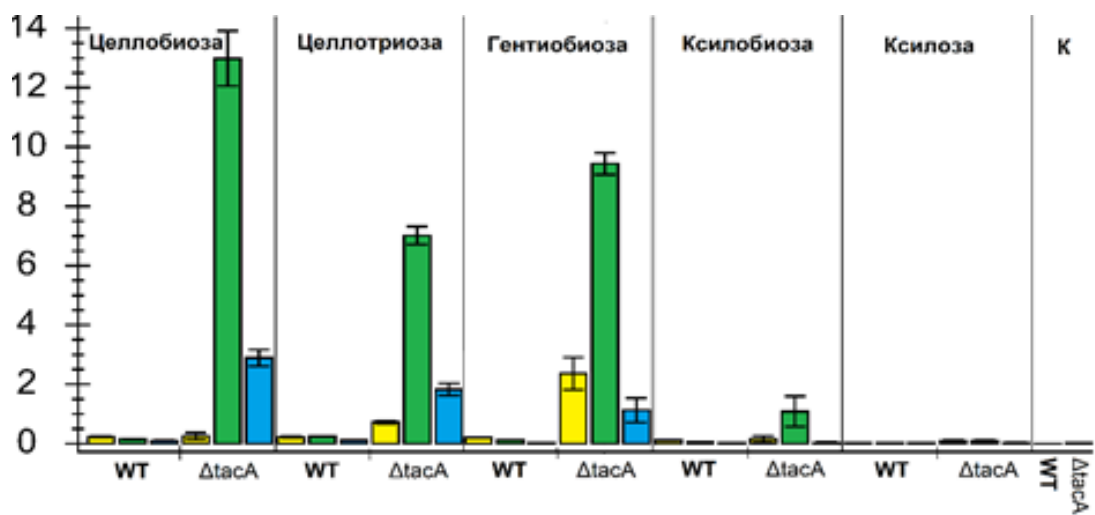
Г

Рисунок 8 – Целлобиогидролазная (А), β -глюкозидазная (Б), эндоглюканазная (В) и ксиланазная (Г) активности в КЖ штаммов *P. verruculosum* с конститутивной экспрессией генов *clr1*, *clr2*, *xlnR* и *P. verruculosum* B1-537 в динамике (48 -144 часа)

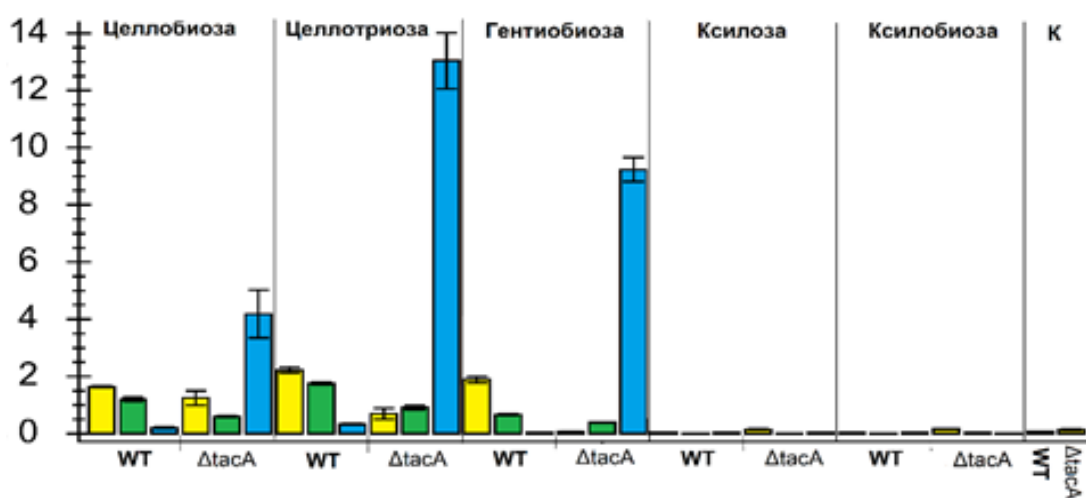
У штаммов *P. verruculosum* с конститутивной экспрессией генов *clr1* и *clr2* концентрация белка остаётся на таком же уровне, а у штамма с конститутивной экспрессией гена *xlnR* увеличивается в 1.4 раза по сравнению со штаммом B1-537. Конститутивная экспрессия ТФ Clr1, ТФ Clr2 и ТФ XlnR привела к увеличению β -глюкозидазной активности в 4, 2 и 2 раза, соответственно, однако целлобиогидролазная активность к 144 часу культивирования у всех штаммов отличается от контроля несущественно.

Конститутивная экспрессия гена *xlnR* привела к повышению ксиланазной активности в 3.8 раза. Таким образом, транскрипционный фактор XlnR у гриба *P. verruculosum* активировал, преимущественно экспрессию ксиланаз, не оказывая заметного влияния на экспрессию целлюлаз.

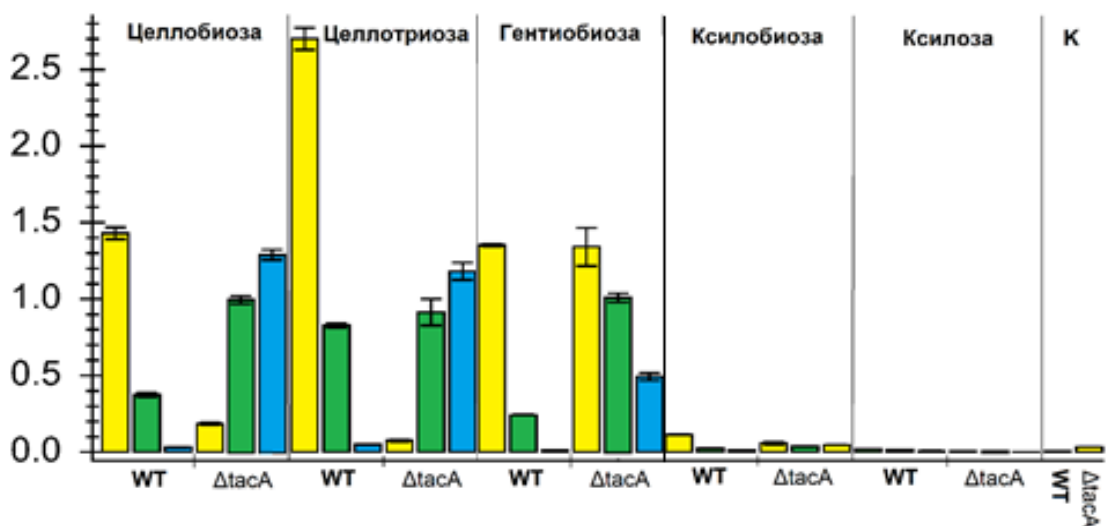
Влияние нокаута гена *tacA* на транскрипцию генов *cbh1*, *egl2* и *bgl1*. После нокаута гена *tacA* была определена относительная нормализованная транскрипция генов *cbh1*, *egl2*, и *bgl1* (Рисунок 9).



А



Б



В

Рисунок 9 – Нормализованная относительная транскрипция генов *cbh1* (А), *bgl1* (Б) и *egl2* (В) в штамме *P. verruculosum* $\Delta tacA$ и исходном штамме В1-221-151 (WT) через 1 ч (жёлтый столбик), 2 ч (зелёный), и 4 ч (синий) культивирования гриба. Ось Y – относительные нормализованные значения транскрипции, К – пробы без индукторов

В штамме с нокаутом гена *tacA* наблюдается рост транскрипции гена *cbh1* уже через 2 ч после индукции целлобиозой, целлотриозой и гентиобиозой в сравнении с транскрипцией гена *cbh1* в исходном штамме. Эти данные свидетельствуют о негативном влиянии ТФ ТасА на транскрипцию гена *cbh1* подобно своему гомологу Ace1 в *T. reesei* [Aro et al., 2003], несмотря на то, что их гомолог ТасА в грибе *T. cellulolyticus* оказывал активирующий эффект [Fujii et al., 2015].

В случае гена *bgl1* в штамме $\Delta tacA$ также наблюдается увеличение его транскрипции, особенно при добавлении целлотриозы и гентиобиозы. Значительных изменений транскрипции гена *egl2* не наблюдалось.

Влияние нокаута гена *tacA* на активность ЦБГ1, ЭГ и БГЛ. Нокаут гена *tacA* привел к значительному усилению транскрипции генов *cbh1* и *bgl1* из чего следует, что ТФ ТасА выполняет функции негативного регулятора транскрипции. Поэтому для оценки изменения основных активностей ферментативного комплекса в динамике было проведено культивирование штамма *P. verruculosum* $\Delta tacA$ на ферментационной установке. Значения концентрации белка в КЖ и активностей ферментов на 2 – 6 сутки культивирования штамма *P. verruculosum* $\Delta tacA$ представлены на Рисунках 10 и 11.

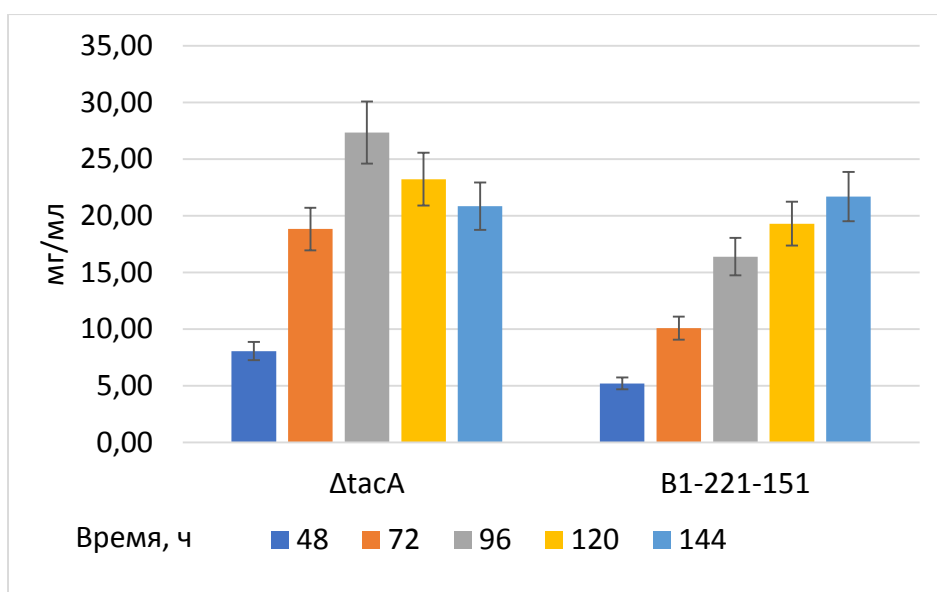


Рисунок 10 – Концентрации белка в образцах КЖ при культивировании на ферментационной установке штаммов *P. verruculosum* $\Delta tacA$ и *P. verruculosum* B1-221-151 (48 - 144 часа).

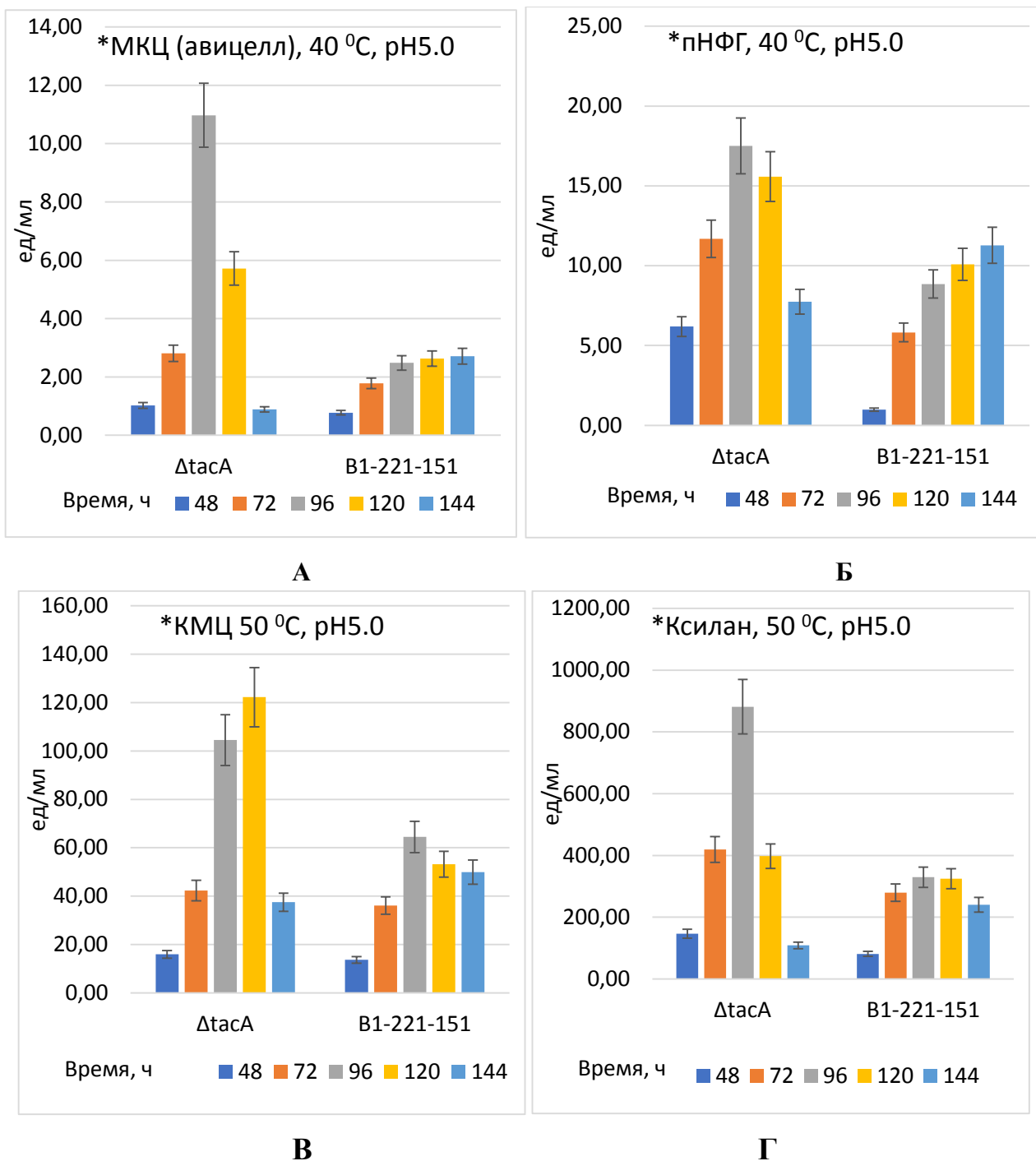


Рисунок 11 – Динамика биосинтеза целлобиогидролазы (А), β-глюкозидазы (Б), эндоглюканазы (В) и ксиланазы (Г) в образцах КЖ при культивировании в ферментёре штаммов *P. verruculosum* ΔtacA и B1-221-151 (48 –144 часа)

Штамм *P. verruculosum* ΔtacA, быстрее синтезировал ферментативный комплекс и уже к 96 часам, концентрация белка в КЖ достигла максимума, тогда как исходный штамм B1-221-151 достигал близкого значения только к 144 часам. Целлобиогидролазная (авицелазная) активность у штамма *P. verruculosum* ΔtacA также достигла максимума к 96 часам культивирования и превысила максимальный уровень для исходного штамма более чем в 2 раза. Отметим, что наблюдаемый эффект при культивировании штамма *P. verruculosum* ΔtacA

оказался аналогичен результатам для штамма *T. reesei* Δac1 на целлюлозосодержащей среде [Aro et al., 2003].

Таким образом, новый штамм *P. verruculosum* ΔacA позволил уже за 96 часов получить ферментный комплекс в 2,5 раза более активный по целлюлозгидролазной активности, чем у исходного штамма при 144 часах культивирования, что позволяет сократить время культивирования на ферментационной установке на 48 часов.

Экспрессия β-глюкозидазы *A. niger* в штамме *P. verruculosum* ΔacA. Ранее в нашей лаборатории был получен штамм *P. verruculosum* F10, в котором была осуществлена экспрессия гена *bgl1*, кодирующего БГЛ *A. niger*, позволившего получить ФП с содержанием БГЛ до 80%. Однако общий уровень секретируемого белка в случае штамма F10 составляет всего около 15 г/л, кроме того, целлюлозгидролазная активность ферментного комплекса F10 крайне низка – поэтому ФП F10 при осахаривании растительной биомассы применяется только как β-глюкозидазная добавка к ФП В1-221-151.

Штамм *P. verruculosum* ΔacA обладает ауксотрофным признаком ΔniaD, поэтому его можно использовать как реципиентный штамм. *P. verruculosum* ΔacA был трансформирован плазмидой pPrCBHI-βGluAsp, использовавшейся для получения штамма *P. verruculosum* F10. После первичного скрининга в колбах были отобраны три клона с экспрессией БГЛ *A. niger*, обозначенные как dT16-2, dT16-3, dT16-13 были отобраны для наработки ФП на ферментационных установках. Электрофореграммы КЖ полученных при культивировании новых штаммов приведены на Рисунке 12.

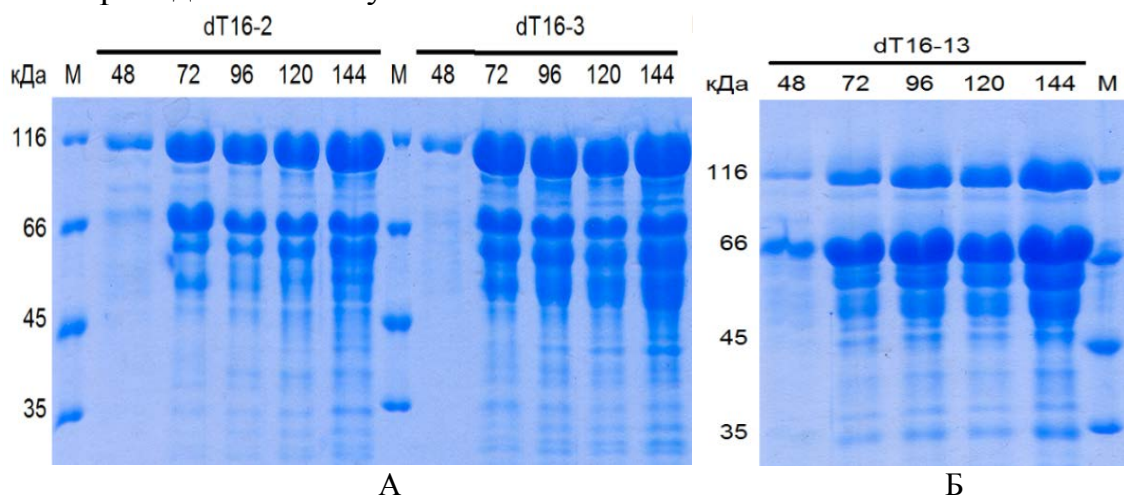


Рисунок 12 – Электрофореграммы КЖ штаммов *P. verruculosum* dT16-2, dT16-3 (А) и *P. verruculosum* dT16-3 (Б), отобранных при культивировании (48 – 144 часа)

КЖ всех штаммов содержат белки с массой характерной для БГЛ *A. niger* (116 кДа) и ЦБГ1 (66 кДа). При этом у штаммов *P. verruculosum* dT16-2 и *P. verruculosum* dT16-3 полоса, характерная для БГЛ, несколько интенсивнее, чем у ЦБГ1, а у *P. verruculosum* dT16-13 – наоборот. Концентрация белка, β-глюкозидазная и целлюлозгидролазная (авицелазная) активности, определенные в динамике роста рекомбинантных штаммов, представлены на Рисунках 13, 14.

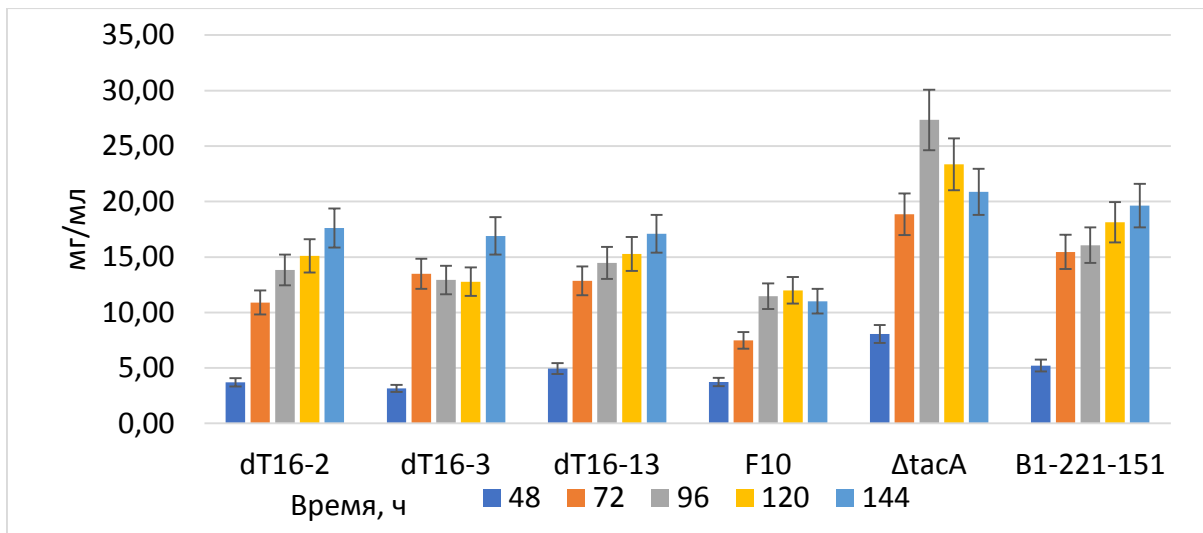
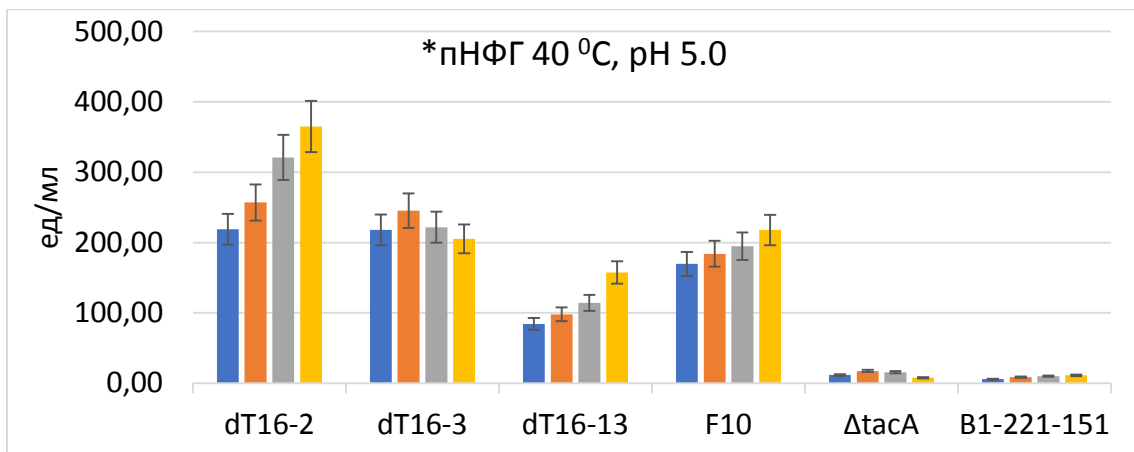
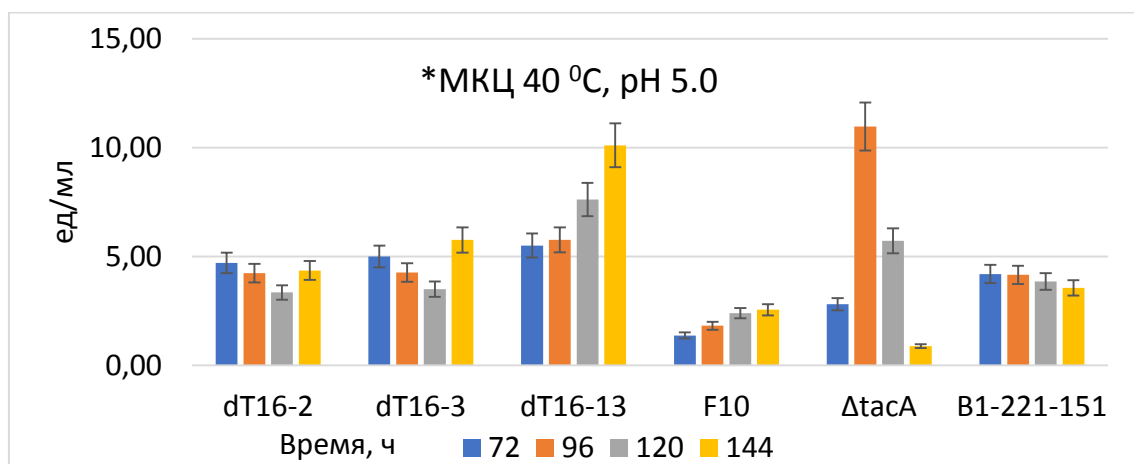


Рисунок 13 – Концентрация белка в КЖ при культивировании в ферментёре штаммов *P. verruculosum* серии dT16, *P. verruculosum* ΔtacA и B1-221-151 (48 – 144 часа)



А



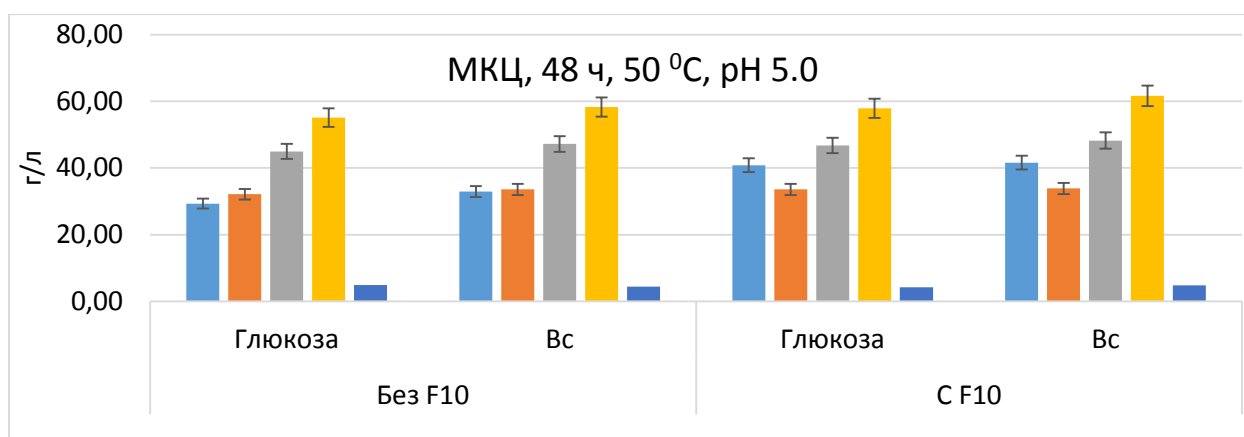
Б

Рисунок 14 – β-глюкозидазная (А) и амицелазная (Б) активности в КЖ при культивировании штаммов *P. verruculosum* серии dT16, *P. verruculosum* ΔtacA и B1-221-151 на 72 – 144 часа

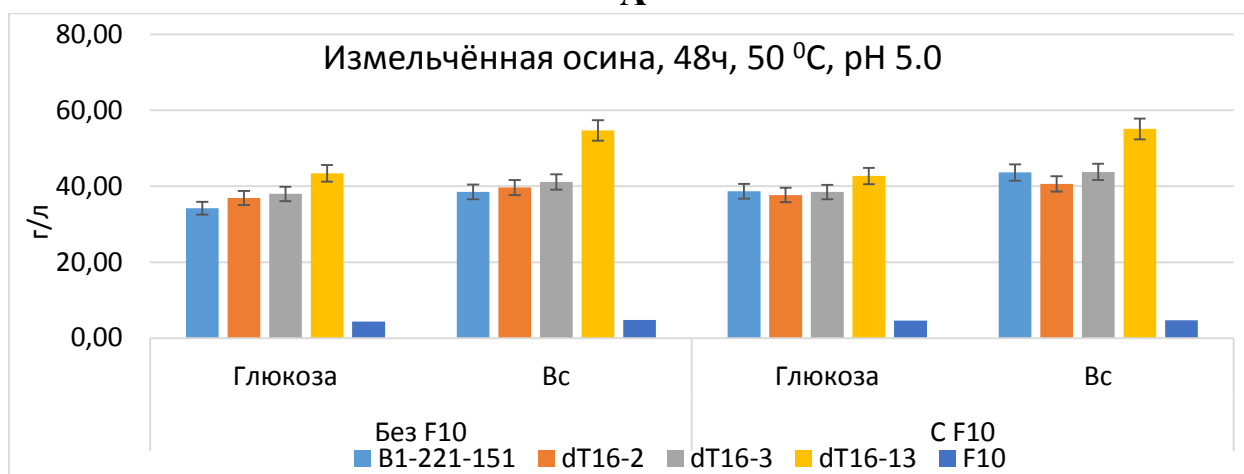
Все три новые штамма показали продуктивность по белку в 1.5 раза выше, чем штамм *P. verruculosum* F10. Целлюбиогидролазная активность у них была на уровне штамма В1-221-151 и выше в 1.7, 2.2, 3.9 раза, чем у штамма F10. Наибольшую целлюбиогидролазную активность проявил штамм dT16-13, который в 2.8 раза превзошел штамм В1-221-151. Однако, этот же штамм обладает и наименьшей β -глюкозидазной активностью. Штамм dT16-2 имеет наибольшую β -глюкозидазную активность, которая в 1.7 раза превышает таковую у штамма F10. Штамм dT16-3 показал средние значения β -глюкозидазной и целлюбиогидролазной активностей. Различия в уровнях экспрессии БГЛ и ЦБГ у новых штаммов, вероятно, связаны с разным количеством встроившихся копий гена *bglI*.

Определение гидролитической способности ФП серии dT16.

Субстратами для определения гидролитической способности ФП dT16-2, dT16-3 и dT16-13 являлись МКЦ и измельчённая осина; в качестве контроля применяли ФП F10 и В1-221-151. Выход глюкозы и восстанавливающих сахаров (ВС) через 48 часов приведены на Рисунке 15. Гидролиз субстратов проводили как без, так и с добавлением ФП β -глюкозидазы F10 (чтобы определить имеют ли ФП dT16-2, dT16-3 и dT16-13 достаточную собственную β -глюкозидазную активность).



А



Б

Рисунок 15 – Выход глюкозы и ВС через 48 часов при ферментативном гидролизе МКЦ (А) и измельчённой осины (Б) ФП серии dT16, В1-221-151 и F10

При гидролизе МКЦ ФП dT16-13 проявил наибольшую гидролитическую способность – выход ВС при его использовании был в 1.8 раза выше, чем у ФП В1-221-151. У ФП dT16-2 была самая низкая гидролитическая способность, однако, большая, чем ФП F10. ФП dT16-3 обладал средней гидролитической способностью: выход ВС был в 1.4 раза больше, чем у ФП В1-221-151, но в 1.2 раза меньше, чем у ФП dT16-13. При использовании новых ФП выход глюкозы и ВС были близки. Добавка препарата F10 в расчёте 40 ед. БГЛ на 1 грамм субстрата не оказала влияния на выход ВС и глюкозы у ФП серии dT16, что свидетельствует о насыщающем содержании у них собственной БГЛ. Результаты, гидролиза измельчённой осины, были аналогичны результатам, полученным на МКЦ.

Испытание ФП серии dT16 показало, что штамм dT16-13 позволяет получить ФП превосходящий по гидролитической способности ФП В1-221-151, и который может использоваться без дополнительного добавления в реакционную смесь БГЛ. Таким образом, штамм *P. verruculosum* ΔtacA является эффективным реципиентом для экспрессии гетерологичных белков.

Заключение

В диссертационной работе определено влияние транскрипционных факторов Clr1, Clr2, XlnR и TacA на экспрессию генов целлюлолитических ферментов мицелиального гриба *P. verruculosum*. Создан новый реципиентный штамм *P. verruculosum* Δ tacA с сокращённым периодом культивирования; экспрессия β -глюкозидазы *A. niger* в нём позволила получить штамм *P. verruculosum* dT16-13 и ферментный препарат на его основе, который характеризовался сбалансированным содержанием целлобиогидролаз и β -глюкозидазы и увеличенной гидролитической способностью по отношению к целлюлозосодержащим материалам.

Выводы:

1. Адаптирована система геномного редактирования CRISPR-Cas9 для мицелиального гриба *P. verruculosum* B1-221-151, позволяющая получать штаммы с нокаутами целевого гена и маркерного гена *niaD*.

2. Клонированы гены *clr1*, *clr2*, *xlnR*, *tacA*, кодирующие, соответственно, факторы транскрипции целлюлаз Clr1, Clr2, XlnR, TacA. Все транскрипционные регуляторы имели высокую степень гомологии с ортологами из других микроорганизмов и имели характерный для эукариот домен «цинковый палец».

3. Получены рекомбинантные штаммы серий *P. verruculosum* Δ clr1, *P. verruculosum* Δ clr2, *P. verruculosum* Δ xlnR с нокаутами генов транскрипционных факторов Clr1, Clr2, XlnR. Показано, что нокаут гена *clr1* снижает транскрипцию гена *egl2* в 8 раз при индукции целлотриозой; нокаут *clr2* приводит к задержке транскрипции генов *cbh1*, *egl2* и *bgl1* при индукции ди- и трисахарами; нокаут гена *xlnR* приводит к отмене транскрипции гена *cbh1* при индукции ксилосахаридами и снижению уровня транскрипции гена *egl2* в 10 раз при индукции целлотриозой. Конститутивная экспрессия гена *xlnR* приводит к увеличению ксиланазной активности в 3.8 раза.

4. Показано, что транскрипционный фактор TacA в грибе *P. verruculosum* является репрессором целлюлаз и его нокаут приводит к резкому росту уровня транскрипции гена *cbh1* через 2 ч после начала индукции целлобиозой, целлотриозой и гентиобиозой. При культивировании штамма *P. verruculosum* Δ tacA в стандартных ферментационных условиях активность ферментного комплекса достигает максимума к 96 ч культивирования, что позволяет сократить время ферментации производственного штамма *P. verruculosum* на 48 ч.

5. Получен новый штамм *P. verruculosum* dT16-13 с активностью гетерологичной β -глюкозидазы *A. niger*, продуктивность которого на треть выше, чем у штамма-аналога *P. verruculosum* F10. Ферментный препарат dT16-13 имеет высокую гидролитическую способность: выход ВС через 48 ч гидролиза МКЦ составлял 58.3 г/л, что более чем в 1.8 раза выше, чем у контрольного ферментного препарата B1-221-151.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ
в рецензируемых научных изданиях, индексируемых WoS, Scopus и RSCI,
рекомендованных для защиты в диссертационном совете
МГУ имени М.В.Ломоносова:

1. Чулкин А.М., **Кислицин В.Ю.**, Зоров И.Н., Синицын А.П., Рожкова А.М. Определение копийности целевых генов карбогидраз в рекомбинантных штаммах гриба *Penicillium verruculosum* // Биотехнология. – 2019. – Т. 35. – № 5. – С.51-57. <http://dx.doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-5-51-57> (SJR IF 0.65, Q 2; РИНЦ 0.426) Вклад автора в печатных листах: (0.875/0.2625) (здесь и далее в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах).
2. **Кислицин В.Ю.**, Чулкин А.М., Синельников И.Г., Синицын А.П., Рожкова А.М. Экспрессия нуклеазы Cas9 комплекса CRISPR/Cas системы редактирования генома в мицелиальном грибе *Penicillium verruculosum* // Вестн. Моск. ун-та. сер. 2. Химия. - 2020. – Т. 61. – № 4. – С. 47 – 54. (РИНЦ 0.632) [**Kislitsin, V.Y.**, Chulkin, A.M., Sinelnikov, I.G., Sinitsyn, A.P., Rozhkova, A.M. Expression of Cas9 Nuclease of the CRISPR/Cas Genome Editing System in the Filamentous Fungus *Penicillium verruculosum*. Moscow University Chemistry Bulletin. – 2020. – Т. 75. - № 4. – С. 243–249. <https://doi.org/10.3103/S0027131420040033> (SJR IF 0.17, Q 4)] (0.875/0.65625)
3. Рожкова А.М., **Кислицин В.Ю.** Редактирование геномов мицелиальных грибов: применение системы CRISPR/Cas // Успехи биологической химии. – 2021. – Т. 61, - С. 253-294. [**Rozhkova, A.M., Kislitsin, V.Y.** CRISPR/Cas Genome Editing in Filamentous Fungi // *Biochemistry (Moscow)* – 2021. – Vol. 86. – P. S120–S139. <https://doi.org/10.1134/S0006297921140091> (Scopus IF 2. 849; SJR IF 0.65, Q 2)]. (2.5/1.25)
4. **Кислицин В.Ю.**, Чулкин А.М., Зоров И.Н., Шашков И.А., Сатрутдинов А.Д., Синицын А.П., Рожкова А.М. Влияние моно- и олигосахаридов на транскрипцию гена *cbh1* в мицелиальном грибе *Penicillium verruculosum* // Биотехнология. – 2021. – Т. 37. – № 1. – С. 45-53. DOI: 10.21519/0234-2758-2021-37-1-45-53 (IF SJR 0.65, Q 2; РИНЦ 0.426) [**Kislitsin V.Y.**, Chulkin, A.M., Zorov I.N., Sinitsyn A.P., Rozhkova A.M. Influence of mono- and oligosaccharides on *cbh1* gene transcription in the filamentous fungus *Penicillium verruculosum* // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2021. – Т. 57. № 9. – С. 925–932. <https://doi.org/10.1134/S0003683821090040> (Scopus IF 1.082 SJR IF 0.247, Q 3)] (1/0.5)
5. **Kislitsin V.Yu.**, Chulkin A.M., Zorov I.N., Denisenko Y.A., Sinitsyn A.P., Rozhkova A.M. The effect of cellobiohydrolase 1 gene knockout for composition and hydrolytic activity of the enzyme complex secreted by filamentous fungus *Penicillium verruculosum* // Biores. Technol. Rep. – 2022. – Vol. 18. – P. 101023. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101023> (Scopus IF 4.817; SJR IF 0.85, Q 2) (1/0.8)
6. **Кислицин В.Ю.**, Чулкин А.М., Зоров И.Н., Синельников И.Г., Синицын А.П., Рожкова А.М. Функция транскрипционного фактора XlnR у мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* // Биотехнология. – 2022. – Т. 38. – №6. – С. 29–39. DOI: 10.56304/S0234275822060084 (SJR IF 0.65, Q 2; РИНЦ 0,426) (1.375/1.03125)

7. Чулкин А.М., Кислицин В.Ю., Зоров И.Н., Шашков И.А., Рожкова А.М. Влияние нокаута транскрипционного фактора TacA на транскрипцию и экспрессию гена *cbhI* в штамме мицелиального гриба *Penicillium verruculosum*// Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. – 2023. – Т. 64. – №. 2. – С.121-129. DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-2-121-129 (РИНЦ 0.632) [Chulkin, A.M., Kislitsin, V.Y., Zorov, I.N., Shashkov, I.A., Rozhkova, A.M. The effect of the TacA knockout transcription factor on the *cbhI* gene transcription and expression in the filamentous fungus strain *Penicillium verruculosum* // Moscow University Chemistry Bulletin. – 2023. – Vol. 78. – № 1. – P. 35–41. <https://doi.org/10.3103/S0027131423010029> (SJR IF 0.17, Q 4)] (1.125/0.675)