

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»»
(ФИЦ BIOTEХНОЛОГИИ РАН)

На правах рукописи



Кислицин Валерий Юрьевич

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

1.5.6 – Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.х.н. Рожкова А. М.

Москва – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

1. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
2 ВВЕДЕНИЕ.....	7
2.1 Актуальность темы исследования	7
2.2 Цель и задачи исследования.....	8
2.3 Научная новизна исследования и теоретическая значимость работы.....	8
2.4 Практическая значимость работы.....	9
2.5 Методология и методы исследования.....	9
2.6 Положения выносимые на защиту.....	9
2.7 Личное участие аспиранта в получении результатов.....	10
2.8 Степень достоверности.....	10
2.9 Апробация работы.....	10
2.10 Публикации.....	10
2.11 Связь работы с государственными программами.....	10
2.12 Структура и объем работы.....	10
3 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
3.1 Механизмы регуляции транскрипции генов карбогидраз у мицелиальных грибов....	11
3.1.1 Мицелиальные грибы как деструкторы растительной биомассы.....	11
3.1.2 Механизм углеродной катаболитной репрессии.....	14
3.1.3 Механизмы активации транскрипции гликозил-гидролаз.....	17
3.2 Способы повышения продуктивности мицелиальных грибов.....	20
3.2.1 Повышение продуктивности штаммов мицелиальных грибов за счёт регуляции транскрипции.....	20
3.2.2 Увеличение продуктивности мицелиальных грибов за счёт оптимизации посттранскрипционных этапов экспрессии.....	23
3.3 Методы редактирования геномов мицелиальных грибов.....	25
3.3.1 Редактирование геномов с помощью гомологичной рекомбинации без использования программируемых нуклеаз.....	25
3.3.2 Устройство системы редактирования генома CRISPR-Cas.....	28
3.4 Применение системы CRISPR-Cas9 для редактирования геномов мицелиальных грибов.....	31
3.4.1 Общий принцип применения системы CRISPR-Cas9 для редактирования геномов мицелиальных грибов.....	31
3.4.2. Геномное редактирование <i>Trichoderma reesei</i>	34

3.4.3. Геномное редактирование грибов рода <i>Aspergillus</i>	34
3.4.4. Геномное редактирование мицелиальных грибов из прочих родов.....	37
3.5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ.....	38
4 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	40
4.1. Материалы.....	40
4.1.1 Штаммы микроорганизмов.....	40
4.1.2 Реагенты.....	40
4.1.3 Среды для культивирования микроорганизмов.....	41
4.2 Методы.....	41
4.2.1 ПЦР для амплификации генов для последующего клонирования.....	41
4.2.2 ПЦР для скрининга	42
4.2.3 Выделение ДНК	42
4.2.4 Клонирование референсных генов для количественной ПЦР	42
4.2.5 Количественная ПЦР.....	44
4.2.6 Выделение РНК.....	46
4.2.7 Трансформация грибных штаммов.....	47
4.2.8 Определение внутриклеточной локализации химерного белка Cas9-GFP.....	48
4.2.9 Конструирование плазмиды для экспрессии глюкозооксидазы <i>A. niger</i>	48
4.2.10 Определение индукторов транскрипции гена <i>cbh1 P. verruculosum</i>	48
4.2.11 Культивирование штаммов <i>P. verruculosum</i> в колбах.....	49
4.2.12 Культивирования штаммов <i>P. verruculosum</i> на ферментационной установке.....	49
4.2.13 Определение концентрации белка.....	50
4.2.14 ПААГ-электрофорез в денатурирующих условиях.....	50
4.2.15 Масс-спектрометрический анализ.....	50
4.2.16 Определение ферментативных активностей.....	50
4.2.17 Хроматографический анализ ферментных препаратов.....	51
4.2.18 Клонирование генов транскрипционных факторов <i>xlnR</i> , <i>clr1</i> , <i>clr2</i> и <i>tacA</i>	52
4.2.19 Клонирование фрагмента гена <i>niaD P.verruculosum</i>	55
4.2.20 Получение плазмид для редактирования генома <i>P. verruculosum</i> системой CRISPR-Cas9.....	55
4.2.21 Отбор трансформантов после применения системы CRISPR-Cas9.....	58
4.2.22 Создание конструкций для конститутивной экспрессии генов <i>clr1</i> , <i>clr2</i> , <i>xlnR P. verruculosum</i>	59

4.2.23 Ферментативный гидролиз МКЦ и измельчённой осиновой древесины.....	60
5 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	61
5.1 Адаптация системы редактирования генома CRISPR-Cas9 для мицелиального гриба <i>P. verruculosum</i>	61
5.1.1 Создание плазмиды для конститутивной экспрессии гена <i>cas9</i> и проверка внутриклеточной локализации белка Cas9.....	62
5.1.2 Нокаут маркерного гена <i>niaD</i> в грибе <i>P. verruculosum</i>	65
5.1.3 Проверка нового реципиентного штамма <i>P. verruculosum</i> B1-2743 на примере экспрессии гетерологичной глюкозооксидазы.....	67
5.1.4 Адаптация системы CRISPR-Cas9 для двойных нокаутов в штамме <i>P. verruculosum</i> B1-221-151.....	70
5.1.5 Получение штаммов <i>P. verruculosum</i> с нокаутами генов <i>cbh1</i> и <i>niaD</i>	71
5.2 Исследование механизма активации промотора <i>cbh1 P. verruculosum</i>	75
5.2.1 Определение числа копий целевых генов в штаммах <i>P. verruculosum</i> «моно»- и «гетеро»- продуцентах рекомбинантных белков.....	75
5.2.2 Влияние моно- и олигосахаридов на транскрипцию гена <i>cbh1 P. verruculosum</i>	76
5.3 Влияние транскрипционных факторов Clr1, Clr2, XlnR и TacA <i>P. verruculosum</i> на транскрипцию генов <i>cbh1</i> , <i>egl2</i> и <i>bgl1</i>	78
5.3.1 Клонирование генов транскрипционных факторов Clr1, Clr2, XlnR и TacA <i>P. verruculosum</i>	78
5.3.2 Влияние нокаута гена <i>clr1</i> на транскрипцию генов <i>cbh1</i> , <i>egl2</i> , <i>bgl1</i>	79
5.3.3 Влияние нокаута гена <i>clr2</i> на транскрипцию генов основных целлюлаз.....	81
5.3.4 Влияние нокаута гена <i>xlnR</i> на транскрипцию генов <i>cbh1</i> , <i>egl2</i> и <i>bgl1</i>	83
5.3.5 Анализ влияния конститутивной экспрессии генов <i>clr1</i> , <i>clr2</i> , <i>xlnR</i> на секрецию целлюлаз <i>P. verruculosum</i>	85
5.3.6 Влияние нокаута гена <i>tacA</i> на транскрипцию генов <i>cbh1</i> , <i>egl2</i> и <i>bgl1</i>	91
5.3.7 Влияние нокаута гена <i>tacA</i> на активность ферментного комплекса <i>P. verruculosum</i> в процессе биосинтеза ЦБГ1, ЭГ и БГЛ.....	93
5.4. Применение <i>P. verruculosum</i> Δ tacA как реципиентного штамма.....	96
5.4.1 Экспрессия в штамме <i>P. verruculosum</i> Δ tacA гена β -глюкозидазы <i>A. niger</i>	96
5.4.2 Определение гидролитической способности ферментных препаратов серии dT16	100
6 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	103
7 ВЫВОДЫ.....	105
8 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	106

Приложение 1.....	122
Приложение 2.....	123
Приложение 3.....	124
Приложение 4.....	126
Приложение 5	127
Приложение 6	128

1 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Ферменты:

ЦБГ	целлобиогидролаза
ЭГ	эндоглюканаза
БГЛ	β -глюкозидаза

Прочие сокращения

ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
КМЦ	карбоксиметилцеллюлоза
КЖ	культуральная жидкость
КОС	ксилоолигосахариды
ЛПМО	литические полисахаридные монооксигеназы
МКЦ	микрористаллическая целлюлоза
МС	минимальная среда
ПААГ	полиакриламидный гель
пНФГ	пара-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид
пНФЛ	пара-нитрофенил- β -лактозид
п.о.	пара оснований
ОРС	открытая рамка считывания
ПС	полная среда
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РНК	рибонуклеиновая кислота
СП	степень полимеризации
СФС	стандартная ферментационная среда
ТФ	транскрипционный фактор
УКР	углеродная катаболическая репрессия
ФП	ферментный препарат
ЦОС	целлоолигосахариды
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats — кластерные короткие регулярные палиндромные повторы
sgRNA	single guide RNA – направляющая-РНК
HR	homologous recombination – гомологичная рекомбинация
NHEJ	non-homologous end joining – негомологичное соединение концов

2 ВВЕДЕНИЕ

2.1 Актуальность темы исследования

Мицелиальные грибы родов *Trichoderma* (*Hypocrea*), *Aspergillus*, *Penicillium* (*Talaromyces*), широко используются в качестве продуцентов технических ферментов, которые включают амилазы, β -глюканазы, инулиназы, ксиланазы, маннаназы, пектиназы, целлюлазы и другие гидролазы, а также оксидазы, протеазы, трансферазы и др. Ферментные препараты (ФП), полученные на основе культуральной жидкости (КЖ) 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 [1].

В Лаборатории биотехнологии ферментов ФИЦ Биотехнологии РАН проводятся систематические исследования, направленные на создание штаммов-продуцентов различных ферментов на основе целлюлолитического гриба *Penicillium verruculosum* 9с 2011 года (*Talaromyces verruculosus*) В1-151-221 (ВКМ F-3972). Продуктивность штамма-реципиента *P. verruculosum* В1-537, полученного из *P. verruculosum* В1-151-221 путем индуцированного мутагенеза, достигает 50-60 грамм белка с 1 л КЖ в промышленных условиях, что позволяет успешно использовать его в качестве платформы для получения ферментных препаратов для биоиндустрии [2].

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 ферментных препаратов для различных биотехнологических процессов [3-5]. Однако у рекомбинантных штаммов, характеризующихся высокой продукцией целевого фермента, наблюдается снижение общей продуктивности по секретируемому белку в 2 и более раза, что приводит к снижению экономической эффективности процесса получения ферментных препаратов на основе рекомбинантных штаммов, и, как следствие, увеличивает стоимость использования ферментных препаратов 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 промоторами генов [6]. 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* [7]. 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, и практическое для улучшения технологии получения промышленных ферментных препаратов (ФП).

2.2 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, скорость роста, 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 – целлобиогидролазу 1 (ЦБГ1), 1,4- β -глюканазу 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 ферментативную активность гидролитического комплекса *P. verruculosum*;
5. Создать новый рекомбинантный штамм *P. verruculosum*, обладающий улучшенной гидролитической способностью по отношению к целлюлозосодержащим субстратам.

2.3 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* без удаления промотора *cbh1* активирует экспрессию генов других карбогидраз.

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 эндоглюканазную и ксиланазную активности ферментного комплекса. Показано, что

транскрипционный фактор TacA в грибе *P. verruculosum*, в отличие от своего гомолога в грибе *P. oxalicum*, является негативным регулятором транскрипции целлюлаз.

2.4 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* $\Delta tacA:\Delta niaD$ с увеличенной ферментативной 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* $\Delta tacA:\Delta niaD$ плазмидой pCBHI-BG, несущей ген *bgl1* *A. niger*, кодирующей целлобиазу, были получены новые рекомбинантные штаммы серии *P. verruculosum* dT16, обладающие высокими авицеллазной (целлобиогидролазной) и β -глюкозидазной (целлобиазной) активностями. Гидролитическая способность нового ФП dT16-13 на основе штамма *P. verruculosum* $\Delta tacA:bgl1$ была выше в 1,5 раза в сравнении с ФП исходного штамма В1-221-151 по отношению к микрокристаллической целлюлозе (МКЦ).

2.5 Методология и методы исследования

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

2.6 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 авицеллазной активности уже на 4-ые сутки культивирования штамма *P. verruculosum* $\Delta tacA:\Delta niaD$;

4. Получен ферментный препарат ФП dT16-13, обладающий в 1,5 раза большей гидролитической способностью по МКЦ, чем ФП В1-221-151.

2.7 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.

2.8 Степень достоверности

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

2.9 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

2.10 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.

2.11 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, и проекта РФФИ #18-29-07070, а также с использованием научного оборудования ЦКП «Промышленные биотехнологии».

2.12 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.

3 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

3.1 Механизмы регуляции транскрипции генов карбогидраз у мицелиальных грибов

3.1.1 Мицелиальные грибы как деструкторы растительной биомассы

Грибы являются основными деструкторами растительной биомассы на Земле и могут колонизировать как отмершие части растений, так и паразитировать на частях живых. Они имеют внешнее пищеварение и секретируют необходимые ферменты во внеклеточную среду, где происходит гидролиз полисахаридов растительной клеточной стенки, после чего полученные компоненты, мономеры и олигомеры, транспортируются внутрь мицелия [8]. Основными компонентами растительной клеточной стенки являются целлюлоза, различные гемицеллюлозы и лигнин. Также в растениях содержатся белки, жиры и запасные полисахариды [9].

Целлюлоза является наиболее распространенным растительным полисахаридом на Земле, и её синтез в природе оценивается в 100 миллиардов тонн в год [10]. Она представляет собой линейный неразветвленный полимер, состоящий из остатков D-глюкозы, которые соединены между собой β -1,4-гликозидными связями. Повторяющимся звеном целлюлозы является целлобиозы. Средняя степень полимеризации (СП) целлюлозы в первичной стенке составляет около 6000, во вторичной – до 14000. Молекулы целлюлозы обычно достигают длины в несколько микрон с диаметром 2-4 нм, которые параллельно упаковываются и образуют трехмерные микрофибриллы диаметром до 25 нм [11, 12]. В микрофибриллах молекулы целлюлозы находятся в кристаллической структуре и окружены матриксом из гемицеллюлозы и пектина [9].

Гемицеллюлозы менее распространены в природе, чем целлюлоза, и в среднем составляют 20% от массы клеточной стенки растений (Таблица 1). Они выполняют роль связующего слоя между основными компонентами клеточной стенки растений. В первичной клеточной стенке гемицеллюлозы связывают целлюлозу с пектином, а во вторичной – целлюлозу с лигнином (Рисунок 1) [9].

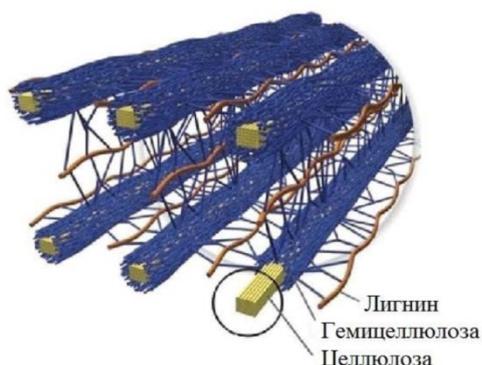


Рисунок 1 – Структура клеточной стенки растений [13]

Таблица 1 – Содержание полисахаридов и лигнина в различных растениях и их частях (по данным [14]).

Вид сырья	Целлюлоза (%)	Геми-целлюлоза (%),	Основной тип гемицеллюлозы	Лигнин (%)
Лиственная древесина	40-55	24-40	О-ацетил-4-О-метилглюкуроноксилан	18-25
Лиственная кора	22-40	20-38		30-55
Листья	15-20	80-85		0
Хвойная древесина	45-50	25-35	Арабино-О-метилглюкуроноксилан	25-35
Хвойная кора	18-38	15-33		30-60
Ореховая скорлупа	25-30	25-30		30-40
Кукурузные початки	45	35	Арабиноксилан	15
Кукурузные стебли	39-47	26-31		3-5
Солома овса	31-37	27-38		16-19
Солома ржи	33-35	27-30		16-19
Солома риса	29	18		19
Солома проса	28	38		11
Солома ячменя	31-34	24-29		14-15
Травы	25-40	25-50		10-30
Стебли тростника	40	20		25
Стебли бамбука	26-43	15-26		21-31
Багассо	32-44	27-32		19-24
Стебли хлопчатника	38	21		26

Как видно из Таблицы 1 состав клеточных стенок растений значительно различается, как по соотношению целлюлозы и гемицеллюлозы, так и по составу гемицеллюлозы. Соответственно, для деградации полисахаридов конкретного субстрата необходимы комплексы ферментов различного состава. Основными ферментами участвующими в гидролизе целлюлозы являются ЦБГ, ЭГ и БГЛ (Рисунок 2). Целлюлазы имеют важное промышленное значение. С их помощью, содержащаяся в растительном сырье целлюлоза, может быть полностью преобразована в глюкозу, которую затем можно использовать для микробиологического синтеза широкого спектра молекул, от топлива до полимеров [15].

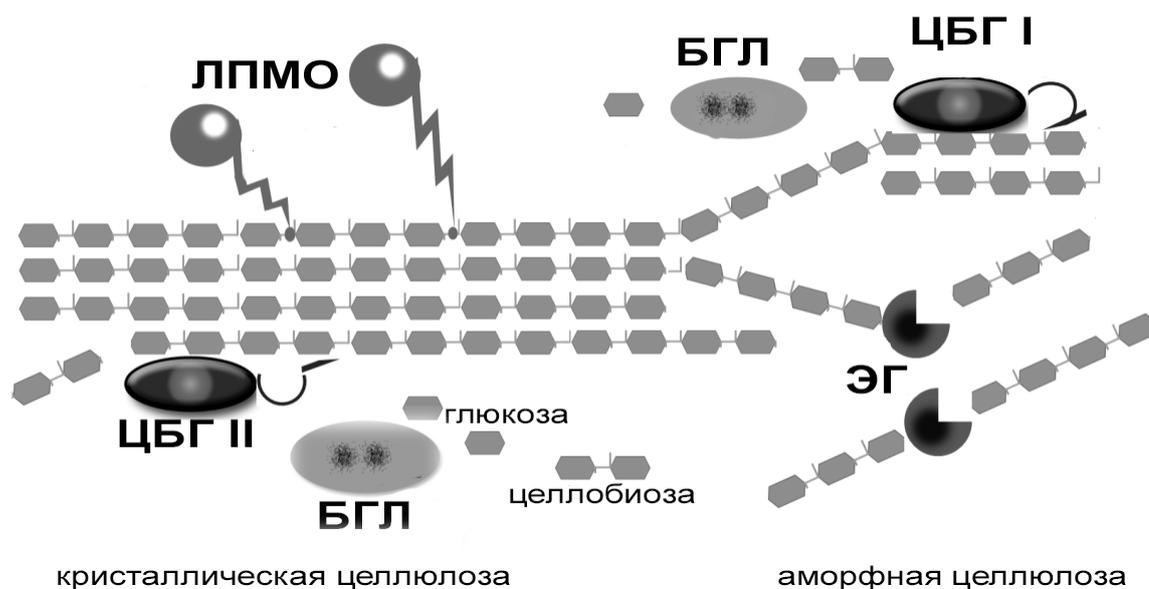


Рисунок 2 – Схема ферментативного гидролиза целлюлозы

ЦБГ I и ЦБГ II последовательно отщепляют остатки целлобиозы с восстанавливающего (В) и не восстанавливающего (НВ) концов молекулы кристаллической целлюлозы, ЭГ гидролизует аморфную часть целлюлозы, БГЛ гидролизует гликозидные связи у не редуцирующих остатков β -D-глюкозидов и олигосахаридов с высвобождением глюкозы, литические полисахаридные монооксигеназы (ЛПМО) расщепляют полисахариды по окислительному механизму [16]

Выделяемые грибами для деструкции растительной биомассы ферменты зачастую имеют широкую субстратную специфичность и проявляют разные активности, например, гликозил-гидролазную и трансгликозилазную. В связи с этим для описания карбогидраз обычно используют иерархическую классификацию, основанную на сравнении первичных аминокислотных последовательностей и организации их каталитических доменов. Наиболее близкородственные по аминокислотным последовательностям карбогидразы объединяют в семейства, эволюционно близкие семейства группируют в подсемейства, которые уже на более высоком иерархическом уровне формируют в кланы. Среди семейств карбогидраз выделяют гликозил-гидролазы (GH), гликозил-трансферазы (GT), полисахарид-лиазы (PL) и карбогидрат-эстеразы (CE) [<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>]. Примеры ферментов, выделяемых грибами для утилизации различных полисахаридов приведены в Таблице 2.

Таблица 2 – Семейства карбогидраз активируемых при росте на различных субстратах [6].

Тип полисахарида	Семейства карбогидраз	Примеры ферментов
Крахмал	GH31, GH13, GH15	1,4- α -глюкан-глюканогидролаза (К.Ф. 3.2.1.1); 1,4- α -d-глюкан-мальтогидролаза (К.Ф. 3.2.1.2)

Ксилоза	GH3, GH10, GH11, GH43, GH51, GH62, GH67, GH115, CE1, CE15	Р-ксилозидаза (К.Ф.3.2.1.37)
Ксилотриозан	GH1, GH3, GH12, GH31, GH51, GH54, GH74	ксилотриозаназа С (К.Ф. 3.2.2.151), авицелаза III (К.Ф. 3.2.1.4)
Целлюлоза	GH1, GH3, GH5, GH7, GH12, GH45	эндо-1,4-β-глюканазы (КФ 3.2.1.4), экзо-целлобиогидролазы (КФ 3.2.1.91), экзо-1,4-β-глюкозидазы (КФ 3.2.1.74)
Главная цепь пектина	GH28, GH88, GH105, PL1, PL3, PL4, PL9, PL11, CE8, CE12	поли-α-1,4-галактуронидгликангидролаза (КФ 3.2.1.15), пектинлиазы (КФ 4.2.2.10)

Среди ферментов, выделяемых грибами для утилизации растительных полисахаридов, преобладают представители семейств гликозил-гидролаз (GH). Для экономии энергетических ресурсов грибы имеют механизмы, обеспечивающие синтез только тех ферментов, которые подходят для переваривания имеющихся в данный момент субстратов. Основная регуляция синтеза ферментов происходит на стадии транскрипции их генов, для чего грибы имеют сложную систему транскрипционной регуляции [17]. Транскрипция карбогидраз в мицелиальных грибах находится под двойным контролем: с одной стороны, активируется специальными ТФ и, с другой стороны, при необходимости блокируется за счёт механизма углеродной катаболитной репрессии (УКР).

3.1.2 Механизм углеродной катаболитной репрессии

УКР происходит при накоплении в клетке определённой концентрации глюкозы или фруктозы. Поскольку данные углеводы непосредственно включаются в процесс гликолиза их потребление является наименее энергозатратным и наиболее предпочтительным для клетки. Соответственно, в этих условиях грибам не требуется синтезировать новые карбогидразы, и их транскрипция останавливается за счёт механизма УКР [18]. Этот механизм позволяет грибам в природных условиях экономить энергию и является универсальным регуляторным механизмом. В тоже время УКР является нежелательным процессом при промышленном культивировании мицелиальных грибов с целью получения ферментных препаратов. Это объясняется тем, что глюкоза, являясь наилучшим источником энергии для грибов, могла бы быстро покрывать высокие энергозатраты связанные с синтезом секретируемых белков, однако её высокая концентрация ингибирует их синтез. Для решения данной проблемы применяются различные подходы, основанные на химическом мутагенезе и методах генетической инженерии [19, 20].

По имеющимся в настоящее время данным в механизме УКР могут участвовать белки, кодируемые генами *creA*, *creB*, *creC*, *creD*, *hulA*, *apyA*, *rcoA*, *snfA* и *schA* [21 – 23].

Основным регуляторным фактором у мицелиальных грибов, участвующим в механизме УКР, является транскрипционный-репрессор CreA [18]. Его функции схожи с белком-репрессором Mig1p, обнаруженным у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [24]. Впервые ген *creA* был описан у мицелиального гриба *Aspergillus nidulans* [25]. Белок CreA *A. niger* имеет размер 416 ак. и два домена «цинковых пальцев» типа Cys2His2, необходимых для связывания белка с определёнными последовательностями ДНК [26]. Аналогичные репрессоры были описаны у *T. reesei* [27, 28], *A. niger* [29], *Sclerotinia sclerotiorum* [30], *Gibberella fujikuroi*, *Botrytis cinerea* [31], *Humicola grisea* [32], *Neurospora crassa* [33], *P. canescens* [34]. Анализ участков связывания CreA-подобных белков с ДНК выявил консенсусную последовательность 5'-SYGGRG-3' [35]. Однако наличие такой последовательности не всегда достаточно для запуска процесса репрессии. Было показано, что из семи предсказанных сайтов связывания в промоторе гена *alcA* *A. nidulans* функционально активными являются только два или четыре из девяти в случае промотора гена *alcR* [36, 37].

У некоторых мицелиальных грибов, например, *A. chrysogenum*, транскрипция гена *creA* (*cre1*) имеет прямую корреляцию с содержанием глюкозы в ростовой среде [38]. В тоже время, транскрипция гена *creA* (*cre1*) у других мицелиальных грибов, таких как, *T. reesei*, *A. nidulans* или *P. canescens* подвержена саморегуляции и снижается в условиях УКР по сравнению с условиями, когда она отсутствует [34, 39]. Данные факты говорят о существовании различных механизмов активации УКР.

Убиквитинирование и фосфорилирование вызывают пре- и пост-транскрипционную модификацию, которая может контролировать локализацию, а также функцию CreA. Так было показано, что CreB, CreC и CreD регулируют активность CreA посредством его убиквитинирования и деубиквитинирования [40]. Мутации генов *creB* и *creC* приводят к появлению фенотипов сходных при мутациях гена *creA* [35].

Ген *creB* *A. nidulans* является гомологом гена *ubh1* человека, который участвует в убиквитинировании при УКР [41]. Белок CreB содержит 6 спиральных областей DUB для распознавания субстрата и 4 последовательности PEST, которые действуют как сигнал для протеолиза [41, 42]. Ген *creC* кодирует белок из 630 ак. богатый пролином в области N-конца и имеет пять повторяющихся мотивов WD40 на C-конце [43, 44]. Его белок-белковое взаимодействие облегчается участками повторов WD40, которые образуют пропеллероподобный участок [45]. Белок CreC участвует в регуляторных механизмах только у многоклеточных эукариот, что подтверждается наличием гомологов CreB и CreC у мышей и людей, но не у *S. cerevisiae* [46]. Эксперименты по совместной иммунопреципитации показали, что белки CreB и

CreC функционируют вместе как комплекс во время репрессии или дерепрессии. Было доказано, что комплекс деубиквитинирования CreB-CreC играет свою роль в УКР, поскольку делеции *cre2* и *creB* у *T. reesei* и *A. oryzae* соответственно увеличивают уровни секреции гидролитических ферментов [46, 47]. Комплекс деубиквитинирования CreB-CreC удаляет части убиквитина с CreA и других субстратов, тем самым модифицируя белок [42]. Однако избыточная экспрессия гена *creB* частично компенсирует недостаток гена *creC*, но избыточная экспрессия гена *creC* не компенсирует отсутствие гена *creB*, что позволяет предположить, что белок CreB действует на уровне после белка CreC [43].

Белок CreD также участвует в убиквитинировании CreA [21]. Ген *hulA* является гомологом гена *rsp5* (убиквитинлигаза дрожжей) в *A. nidulans*, и поэтому CreA может быть убиквитинирован посредством убиквитин-лигазного комплекса CreD-HulA, который может направлять белок CreA на деструкцию в протеасомы [21, 23]. Боуз и Келли [21] обнаружили другой ген, *apyA*, который относительно похож на *creD*, но кодируемый им белок, демонстрирует более сильное взаимодействие с белком HulA, чем с CreD. Поэтому, предполагают, ген *apyA* является результатом дупликации генов во время эволюции и, возможно, играет свою роль в убиквитинировании. Белок CreD может действовать противоположно комплексу CreB-CreC, поскольку мутантная форма гена *creD*, *creD34*, подавляет некоторые мутантные фенотипы *creB* и *creC* [21].

Протеинкиназа Snf1 (от англ. “**S**ucrose **N**on **F**ermenting”), названная по мутанту, не способному ферментировать сахарозу, но способному утилизировать глюкозу [52]. Ген *snf1* был впервые изучен у *S. cerevisiae*, который является гомологом циклической аденозинмонофосфатной (цАМФ) - зависимой протеинкиназы АМРК у млекопитающих [53]. Он играет важную роль в определении энергетического статуса, и его гомологи присутствуют во всех эукариотах, таких как грибы, растения и животные [53, 54]. Протеинкиназа Snf1 участвует в деактивации УКР в *S. cerevisiae*, в то время как у некоторых фитопатогенных грибов он играет жизненно важную роль в регулировании и подавлении ферментов, разрушающих клеточную стенку [55-56]. Схема механизма УКР представлена ниже (Рисунок 3).

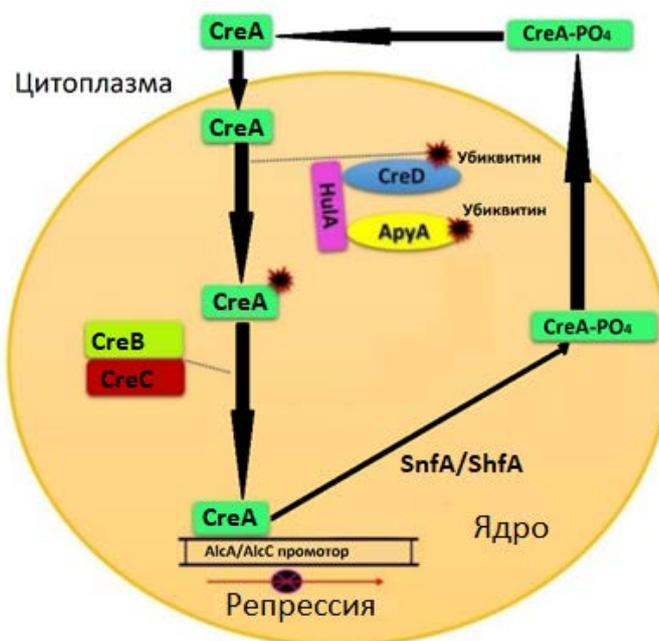


Рисунок 3 – Предполагаемый механизм регуляции УКР у *A. nidulans*

CreD вместе с HulA/ApyA требуется для конъюгирования убиквитина и CreA. ApyA формирует более сильное белок-белковое взаимодействие с HulA, чем CreB. Однако и CreD и ApyA присутствуют в *A. nidulans*. CreB-CreC комплекс необходим для удаления убиквитина из комплекса CreA-Ub, чтобы CreA мог репрессировать гены, подверженные УКР. CreB помогает в удалении убиквитина из CreA, чтобы предотвратить деградацию CreA протеасомами. SnfA и SchA могут играть синергетическую или перекрывающую роль в регуляции дерепрессии CreA [58]

3.1.3 Механизмы активации транскрипции карбогидраз

В условиях отсутствия УКР происходит активация транскрипции генов карбогидраз. Показано, что транскрипция этих генов контролируется несколькими регуляторами транскрипции, большинство из которых относится к семейству транскрипционных факторов Zn(II)2Cys6 [59].

В грибах рода *Aspergillus* было выявлено несколько регуляторов, связанных с деградацией полисахаридов растений. К ним относятся: XlnR, AmyR, InuR, RhaR, ManR, ClrB, ClrA, GalX, GaaR, AraR [6, 59-63]. Эти регуляторы реагируют на присутствие моно-, ди- и олигосахариды (СП 3-6), которые действуют как индукторы [64].

Набор генов, регулируемых каждым транскрипционным фактором, в мицелиальных грибах может значительно различаться у разных видов. Например, ген *xlnR* присутствует почти у всех мицелиальных аскомицетов: у *T. reesei*, *A. niger* и *P. oxalicum* Xyr1 (XlnR) активирует транскрипцию генов целлюлаз и гемицеллюлаз, тогда как у *N. crassa* и *A. nidulans* его гомолог регулирует транскрипцию только генов гемицеллюлаз. Набор генов, регулируемых XlnR у

различных видов мицелиальных грибов, включает гены эндоксилазазы, β -ксилозидазы, α -глюкуронидазы, ацетилксилазазы, арабиноксилан-арабинофурангидазы, ферулоилэстеразы, α - и β -галактозидазы, ЭГ и ЦБГ [65, 66]. В исследовании S. Klaubauf и коллег были сравнены штаммы диких типов и мутантов с нокаутами гена *xlnR* (*xlr1*, *xyr1*) пяти видов мицелиальных грибов: *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe oryzae*, *T. reesei*, *A. niger* и *A. nidulans*. Профилирование роста на соответствующих субстратах и подробный анализ активности секреции, а также активности внеклеточных ферментов продемонстрировали общую роль этого регулятора в активации генов, кодирующих основные ксиланолитические ферменты. Однако были обнаружены большие различия в наборе генов, который контролируется транскрипционным фактором XlnR у разных видов, в результате чего эти грибы производят различные спектры внеклеточных ферментов [67].

Основными транскрипционными регуляторами целлюлолитических генов наряду с XlnR также являются по меньшей мере два транскрипционных фактора – ClrA, ClrB и их ортологи – Clr1 и Clr2 [68]. Ортологи Clr1 и Clr2 были идентифицированы во многих мицелиальных грибах, однако данные транскрипционные факторы могут различаться функционально. Например, транскрипция гена целлюлазы у *N. crassa*, *A. nidulans* и *A. niger* регулируется Clr1 (ClrA) и Clr2 (ClrB). У *N. crassa* Clr1 активирует транскрипцию генов, необходимых для деградации целлюлозы, а также активирует транскрипцию гена *clr-2*, основного транскрипционного активатора генов целлюлаз. Но при этом у *A. nidulans* и *A. niger* ClrB, ортолог Clr2, играет незначительную роль в регуляции транскрипции целлюлаз, и окончательная его функция в этих грибах так и остается невыясненной [69].

При экспрессии гена *clr2* *N. crassa* под контролем конститутивного промотора наблюдается уровень транскрипции целлюлаз как в условиях индукции при отсутствии репрессии, даже при росте на репрессирующих источниках углерода, что указывает на то, что Clr2 не требует посттрансляционной активации. Однако это не относится к другим гомологам гена *clr2*, поскольку конститутивная транскрипция *clrB* в *A. nidulans* и *P. oxalicum* не приводит к активации генов целлюлаз [70]. Вместе Clr1 и Clr2 активируют транскрипцию генов, которые регулируют полный целлюлолитический ответ, однако, в отличие от *clr2*, конститутивная экспрессия *clr1* не активирует транскрипцию генов-мишеней, хотя *clr1* связывает цис-регуляторные элементы даже в не индуцирующих условиях [68, 71]. Также Clr1 регулирует транскрипцию генов прочих ферментов необходимых для разрушения целлюлозы и транспорта в клетку олигосахаридов [71].

В условиях низкого содержания глюкозы или её полного отсутствия в среде УКР отключается и ферменты синтезируются на базовом уровне приводя к образованию целлобиозы. Она активирует транскрипционный фактор Clr1, который индуцирует экспрессию генов транспортеров целлодекстринов, БГЛ и транскрипционного фактора *clr2*. В свою очередь, Clr2

активирует экспрессию целлюлаз. В результате в среде снова повышается уровень глюкозы, после чего запускается механизм УКР (Рисунок 4) [71].

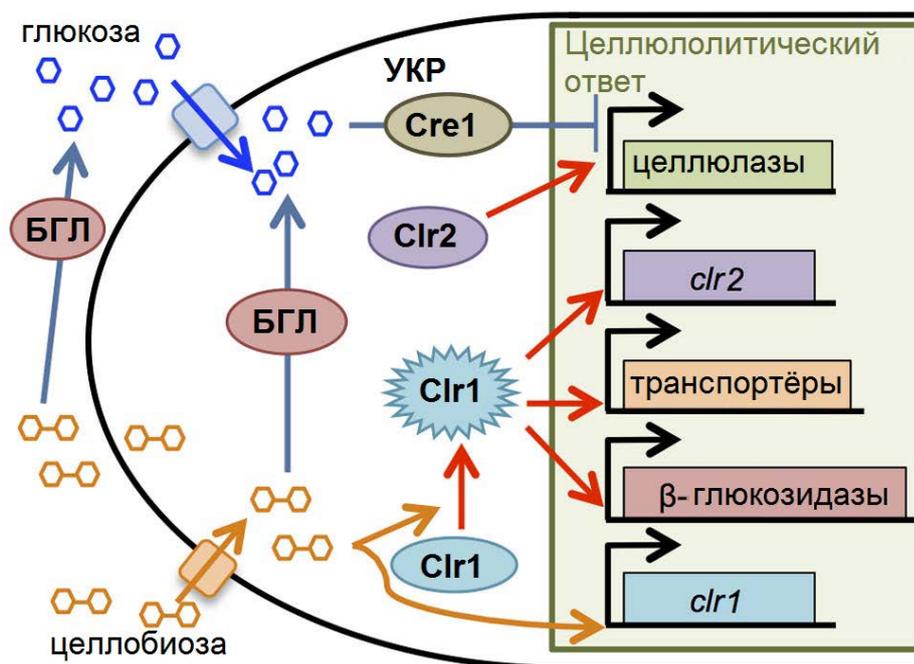


Рисунок 4 – Регуляция транскрипции генов целлюлаз на примере мицелиального гриба *N. crassa* [71]

Интересный эффект наблюдался при делеции гена *tacA* в грибе *T. cellulolyticus*. Данный ген имеет слабую гомологию с репрессором целлюлазных генов *ace1* у *H. Jecorina* (*T. reesei*) [72]. В работе Менга и коллег [73] с помощью гомологичной рекомбинации у *T. reesei* штамма Rut-C30 был замещён ген *ace1*, являющийся репрессором промотора *cbh1* на ген ЭГ (*egl1*) под контролем промотора *cbh1*. В результате культивирования на шестые сутки было обнаружено, что активности ферментов в КЖ полученного штамма составляли 3,42 и 27,04 МЕ/мл по фильтровальной бумаге, карбоксиметилцеллюлозе (КМЦ) соответственно, что на 90,0% и 108,8% выше по сравнению с исходным штаммом. Общая продуктивность полученного штамма *T. reesei* по внеклеточным белкам составила 8,52 мг/мл, что на 36,1% больше, по сравнению с штаммом Rut-C30, соответственно. [73]. Однако при делеции гена *tacA* у гриба *T. cellulolyticus* наоборот наблюдалось снижение целлюлазной активности в ферментативном комплексе. На основании этого исследователями был сделан вывод об активирующей функции белка TacA у данного вида гриба, хотя механизм этого процесса остается не известным [74].

Таким образом, механизмы регуляции транскрипции карбогидраз у мицелиальных грибов несмотря на принципиальную схожесть могут достаточно сильно отличаться у разных видов, особенно, в части механизмов активации транскрипции. Поэтому для улучшения

технологических свойств грибов, как продуцентов ФП, современными методами биотехнологии необходимо изучение этих механизмов у каждого конкретного вида мицелиального гриба.

3.2 Способы повышения продуктивности мицелиальных грибов

3.2.1 Повышение продуктивности штаммов мицелиальных грибов за счёт регуляции транскрипции

Одним из наиболее значимых критериев применимости штаммов мицелиальных грибов для производства ферментов является их продуктивность, т.е. количество внеклеточного белка, секретируемого штаммом за определенный период времени. В промышленности для производства ферментов используются такие мицелиальные грибы, как *T. reesei*, *P. decumbens*, *P. oxalicum*, *P. verruculosum*, что связано со способностью этих микроорганизмов производить большое количество внеклеточного белка. Например, для штамма *T. reesei*, эта цифра может достигать 100-120 г на 1 л КЖ [75]. Увеличение продуктивности штаммов приводит к улучшению экономических показателей всего технологического процесса, и, в конечном счете, к понижению стоимости конечной продукции – целевых ферментов или ферментных комплексов. Поэтому повышение продуктивности рекомбинантных штаммов является важной задачей современной биотехнологии.

Традиционным методом повышения продуктивности микроорганизмов является проведение неупорядоченного мутагенеза с последующим отбором клонов с улучшенными свойствами. Недостатками такой технологии с одной стороны является высокая частота реверсии мутантов после нескольких пассажей, а с другой стороны – высокая токсичность используемых при этом химических мутагенов, что приводит к нецелевым мутациям, изменяющим физиологию гриба.

В настоящее время для решения задачи повышения продуктивности штаммов широкое распространение получили методы, основанные на генетической инженерии и, в том числе, редактировании геномов, которые могут использоваться для улучшения свойств штаммов, уже подвергнутых не направленному мутагенезу. Кроме того, методы генетической инженерии более предсказуемы, безопасны для персонала и окружающей среды и менее трудозатратны, поскольку не подразумевают селективного отбора мутантных штаммов в течении многократного пассажирования [26].

Добиться увеличения выхода целевых белков можно путём влияния на различные стадии экспрессии их генов. Это можно осуществить как за счёт увеличения количества копий целевых генов в геноме, так и за счёт тонкой настройки регуляции экспрессии на стадиях транскрипции, трансляции и посттрансляционном этапе [76].

На транскрипционном этапе повлиять на продуктивность штамма можно путем модификации или замены промоторов, сверхэкспрессии активаторов транскрипции или делеции

генов, необходимых для активации УКР. Поскольку транскрипция генов ферментов, как правило, контролируется индуцируемыми промоторами, для их активации нужны специальные условия, кроме того, они подвержены УКР. Поэтому замена индуцируемого промотора на сильный конститутивный промотор иногда бывает эффективным способом увеличения экспрессии целевого гена [77]. Однако, при использовании таких промоторов могут возникать затруднения, в случае токсичности экспрессируемого гена, а также использование таких промоторов может приводить к снижению скорости роста биомассы [78].

Используя искусственные промоторы, можно добиться значительного увеличения продуктивности. Так у *T. reesei* при использовании искусственного четырехкопийного промотора гена *cbh1* с повторяющимися положительными транскрипционными элементами и делецией возможных сайтов связывания репрессоров для экспрессии гена БГЛ, соответствующая ферментативная активность увеличилась в 3,7 раза по сравнению с исходным штаммом [79]. В другом случае, так же у *T. reesei* в промоторе гена *cbh1* сайты связывания негативного регуляторного фактора Cre1 был заменен сайтом связывания комплекса Nap2/3/5, уровень транскрипции гена *cbh1* увеличивался в 5,5 и 7,4 раза в условиях репрессии и индукции соответственно [80].

В ряде работ делеция генов необходимых для УКР приводила к повышению продуктивности. После делеции гена внутриклеточной БГЛ2 (*bgl2*) у *P. decumbens* (сейчас *P. oxalicum*) внеклеточная ферментативная активность по фильтровальной бумаге, а также эндоглюканазная, целлюбиогидролазная и ксиланазная активности выросли на ферментационной среде с 1% МКЦ, и оказались примерно в 3,3, 7,6, 2,7 и 5,1 раз выше по сравнению со штаммом дикого типа, соответственно. Внеклеточная БГЛ, как конститутивный фермент, не стимулировалась синхронно с ферментами, индуцированными целлюлозой. Повышение внеклеточной целлюлолитической активности в *Δbgl2* штамме, очевидно, было связано с повышенной секрецией внеклеточных белков, которая была примерно в 3 раза выше, чем у дикого штамма [81].

Увеличения экспрессии карбогидраз можно достичь за счёт сверхэкспрессии генов активаторов транскрипции. Например, в работе [82], были получены два рекомбинантных клон *P. oxalicum* с сверхэкспрессией гена *clrB* под контролем его нативного промотора (штамм OE*clrB*) и промотора гена *gpdA* *A. nidulans* (штамм *gpdA* (p)::*clrB*). Штаммы OE*clrB* и *gpdA*(p)::*clrB* показали почти 2,5- и 4,1-кратное увеличение активности ферментов по фильтровальной бумаге, 2,5- и 4,0-кратное увеличение активности ЦБГ и увеличение активности ЭГ в 8,7 и 16,5 раз, соответственно, при культивировании на целлюлозе в течение 48 часов. Нозерн-блоттинг также показал, что уровни мРНК *cbh1* и *eg2* в мутанте *gpdA*(p)::*clrB* были намного выше, чем в штамме дикого типа на целлюлозе. Чтобы дополнительно проверить,

зависит ли продукция целлюлазы от уровня транскрипции *clrB*, была сконструирована экспрессионная кассета PDE_02864(p)::*clrB*, в которой открытые рамки считывания *clrB* и 3'-нетранслируемая область находились под контролем промотора, рибосомного белка S8. Был создан штамм *gpdA(p)::clrB-PDE_02864(p)::clrB* показавший даже более высокую экспрессию целлюлазы при росте на целлюлозе, чем штаммы *gpdA(p)::clrB* и PDE_02864(p)::*clrB*. Эти результаты продемонстрировали, что дозовый эффект уровня транскрипции *clrB* важен для высокой экспрессии целлюлаз, а регулируемая экспрессия целлюлаз может контролироваться концентрацией *ClrB* в условиях культивирования на целлюлозе [82].

Мутагенез транскрипционных активаторов может являться перспективным путём повышения продуктивности грибов. Было показано, что точечная мутация (A824V) в гене транскрипционного активатора *Xyr1 T. reesei*, гомолога гена *xlnR A. niger*, приводит к активации транскрипции генов *cbh1* и *cbh2* даже без добавления в среду индуктора, что может значительно снизить затраты на производство ферментов [83].

В работе [84] был получен штамм *T. reesei* конститутивно экспрессирующий метилтрансферазу *Lae1* под контролем промотора гена α -субъединицы фактора элонгации трансляции 1 (*tef1*). Полученные рекомбинантные штаммы были исследованы на способность продуцировать целлюлазы на лактозе. Рост всех трансформантов был сопоставим до 72 часов культивирования, но - в отличии от штамма дикого типа - некоторые из них не начали автолиз после 72 часов культивирования на лактозе. Штаммы, имеющие копии *tef1:lae1*, демонстрировали увеличение образования белка и целлюлаз до 10 раз у штаммов, которые не показали автолиза. Культивирование трансформантов на целлюлозе также показало увеличение продуктивности, но меньшее, чем при культивировании на лактозе. Авторы предполагают, что сравнительно меньший эффект сверхэкспрессии гена *lae1* при культивировании на целлюлозе может быть связан с тем фактом, что сверхэкспрессия гена *lae1* может приводить к образованию избытка целлобиозы и глюкозы, что, в свою очередь, индуцирует углеродную катаболическую репрессию [84].

Более эффективной стратегией повышения продуктивности на стадии транскрипции является комплексная реконструкция регуляторных путей за счёт увеличения экспрессии генов положительных регуляторов и делеции отрицательных [84].

Например, в работе [85] в начале в штамме *T. reesei* SP4 был удалён ген репрессора *Cre1*. В результате, было обнаружено, что замена гена *cre1* селективным маркером *purG* привела к увеличению общей целлюлазной активности ферментного препарата полученного штамма *T. reesei* SDC11 на 72,6%. Чтобы облегчить следующую генетическую модификацию, маркер *purG* был удален путем гомологичной рекомбинации. Далее, был сверхэкспрессирован ген *bglA*, кодирующий *BglA A. niger*, и созданный таким образом штамм *T. reesei* SCB18 показал

увеличение общей целлюлазной активности на 29,8% и повышение активности БГЛ в 51,3 раза (до 103,9 ед/мл). Также ферментный препарат штамма *T. reesei* SCB18 показал значительно более высокую эффективность конверсии предобработанных кукурузных початков, чем препараты от штаммов и *T. reesei* SP4 и SDC11. ФП штамма *T. reesei* SCB18 с высокой β -глюкозидазной активностью обладал сильной способностью к трансгликозилированию для синтеза β -дисахаридов из глюкозы. Таким образом, продукт трансгликозилирования являлся индуктором для экспрессии целлюлаз, что обеспечило увеличение общей целлюлазной активности на 63,0% по сравнению с часто используемым растворимым индуктором, лактозой [85]. Аналогичным подходом на основе мицелиального гриба *P. oxalicum* было получено несколько штаммов суперпродуцентов целлюлаз [86].

3.2.2 Увеличение продуктивности мицелиальных грибов за счёт оптимизации посттранскрипционных этапов экспрессии

Трансляция мРНК является важным этапом в экспрессии генов. Как правило на этапе трансляции для повышения продуктивности ограничиваются оптимизацией кодонов гетерологичных генов в соответствии с частотой их использования реципиентным штаммом, что кроме повышения скорости трансляции, так же может повышать стабильность мРНК [87].

Другая применяемая стратегия повышения выхода гетерологичных белков заключается в использовании химер с хорошо секретируемыми белками с последующим расщеплением полученных белков [88, 89]. Для облегчения этого процесса двух слитых белков между белком-носителем и целевым белком должен содержаться линкер с сайтами протеолитического расщепления, который должен быть спроектирован так, чтобы обеспечить независимую укладку каталитического домена и слитого белка [87]. Например, уровень секреции фрагмента человеческого антитела, слитого с усеченным эндогенным ферментом в штамме *N. crassa* с делециями четырёх протеаз, повысился более, чем в 3 раза и составил 3 мг/л [91].

Эукариоты имеют сложные механизмы регуляции трансляции, которые во многом до сих пор не изучены [92, 93]. Для улучшения синтеза рекомбинантных белков в растениях и животных зачастую применяются различные 5'- и 3'-трансляционные энхансеры [94, 95]. Между тем, регуляции трансляции мРНК в мицелиальных грибах обычно уделяется мало внимания. В исследовании 2004 года было показано, что при экспрессии в *A. oryzae* гена β -глюкуронидазы (GUS) с различными вариантами 5'-НТП под контролем одного и того же сильного промотора, GUS-активность отличалась до 8 раз между собой при одинаковом уровне мРНК. Более того, использование наиболее эффективной конструкции 5'UTR, позволило добиться заметной внутриклеточной гиперпродукции белка GUS, и его содержание достигло более 50% от общего количества растворимого белка [95].

Как известно, функциональная активность белков во многом зависит от их посттрансляционных модификаций, таких как гликозилирование, ацилирование и т.д. В отличие от бактерий, которые не способны выполнять многие посттрансляционные процессы, клетки грибов обладают аппаратом посттрансляционной модификации. На этом этапе секреция гетерологичного белка может быть увеличена за счет сверхэкспрессии фолдаз, сигнальных пептидов и шаперонов за счет облегчения фолдинга белка [97, 98]. Например, применение гетерологичных сигнальных пептидов вместе с оптимизацией кодонов привело к повышению уровню секреции белка EGFP в *A. unguis* [99]. Так же сигнальный пептид порина В из *Corynebacterium glutamicum* использовали для улучшения продукции эндоксиланазы с эффективностью 615 мг/л [100].

Среди посттрансляционных модификаций гликозилирование очень важно для биологической активности белков; например, целлобиогидролазы представляют собой типичные гликопротеины, которые подвергаются как N-связанному гликозилированию, так и O-связанному гликозилированию за счет присоединения олигосахаридов [98]. Однако чрезмерное гликозилирование белков может отрицательно влиять на активность ферментов. Выбор подходящих реципиентов для экспрессии рекомбинантных белков важен, поскольку уровень гликозилирования в значительной степени зависит от штамма хозяина. Хотя, гипергликозилирование у мицелиальных грибов менее интенсивно, чем у дрожжей, особенно у *S. cerevisiae*, в некоторых случаях необходимо использовать стратегии снижения степени гликозилирования для увеличения биологической активности белков за счет изменения сайтов гликозилирования, ферментативного дегликозилирования или даже с использованием штаммов, дефицитных по гликозилированию [101].

Одна из наиболее очевидных причин низких выходов гетерологичных белков – их протеолитическая деградация [102]. Которая происходит не только внутри и вне клетки за счет функции протеаз, продуцируемых во время роста грибов [101]. Существует несколько стратегий снижения протеолиза в клетках-хозяевах. Удаление идентифицированных генов протеаз, может обеспечить удовлетворительную продукцию целлюлазы по сравнению с родительским штаммом [103]. Применение протеадефицитных штаммов для улучшения продукции гетерологичных белков является эффективным и широко используемым приёмом [104]. Например, для получения эритропоэтина человека (*epo*) с помощью *A. niger* было проведено редактированием генома продуцента технологией CRISPR-Cas9. Интересно, что в работе использовались два варианта гена *epo*. Вначале ген был оптимизирован по кодонам и далее в него был добавлен интрон гена фруктозо-1,6-бисфосфатазы (*fbp*). Два рекомбинантных клона, uME12 (ген *epo* без интронов) и uME23 (ген *epo* с интронами), были отобраны по устойчивости к антибиотику и белковому профилю, отличному от профиля исходного штамма. Экспрессия эритропоэтина была

подтверждена с помощью RT-PCR у обоих клонов, но рекомбинантный белок EPO (rHuEPO) был обнаружен вестерн-блоттингом только в uME23. Выход rHuEPO из uME23 был оценен с помощью ELISA примерно на уровне 1,8 мг/л, демонстрируя, что присутствие интронов приводит к более высокому выходу, возможно, за счет придания большей стабильности мРНК. После этого, в штамме uME23 с помощью CRISPR-Cas9 были нокаутированы гены *vps*, *pvtT*, *algC* и *och1*, которые участвуют в секреции белка, регулируя экспрессию протеаз и гликозилирование белков у *A. niger*. В результате был получен штамм muPS20 не содержащий протеаз, и уровень продукции rHuEPO в нем был увеличен в 41,1 раза. Более того, его молекулярная масса составляла ≈ 27 кДа, демонстрируя, что мутации в вышеупомянутых генах улучшают секрецию, предотвращают протеолитическую деградацию и гипергликозилирование гетерологичного белка. [105].

Другим подходом для решения проблемы протеолиза рекомбинантных белков может быть использование ингибиторов протеаз для контроля их активности и уменьшения протеолиза, но как правило, их применяют только при культивировании в небольших объёмах среды [106]. Кроме того, деградацию рекомбинантного белка может уменьшить культуры грибов при значениях рН не оптимальных для активности протеаз [106].

3.3 Методы редактирования геномов мицелиальных грибов

3.3.1 Редактирование геномов с помощью гомологичной рекомбинации без использования программируемых нуклеаз

Изменение или редактирование геномов с помощью гомологичной рекомбинации (HR, от англ. Homologous Recombination) имеет историю продолжительностью более трёх десятилетий. Изначально этот метод развивался для работы со стволовыми клетками животных [107]. Гомологичная рекомбинация также широко применяется при генетических манипуляциях с дрожжами и другими организмами. Например, целевая интеграция генов в геномный локус, который, усиливает транскрипцию, улучшает экспрессию представляющего интерес белка. Делеция генов за счёт HR часто используется в метаболической инженерии, например, для элиминирования побочных метаболических процессов и увеличения выхода необходимых продуктов [108].

Однако, точная интеграция рекомбинантной ДНК в мицелиальных грибах часто затруднена из-за низкой частоты гомологичной рекомбинации, и, поэтому задача интегрировать интересующий ген в конкретный геномный локус или удалить эндогенный ген является нетривиальной. В то время как у дрожжей *S. cerevisiae* минимальная длина гомологичного фрагмента достаточная для высокой частоты гомологичной рекомбинации составляет всего 30 – 50 п.о. [109], для достижения эффективной гомологичной рекомбинации у мицелиальных грибов необходимо, чтобы длина фланкирующих участков составляла от нескольких сотен до

нескольких тысяч п.о. [110, 111]. Частота гомологичной рекомбинации у мицелиальных грибов очень низкая (обычно от 0 до 30%), и значительно зависит от вида мицелиального гриба и от транскрипционного статуса целевого геномного локуса [112, 113].

Одним из подходов к преодолению этого ограничения является использование штаммов, которые являются дефектными для негомологичного пути соединения концов (NHEJ, от англ. Non-Homologous end Joining). У эукариот интеграция фрагмента ДНК в геном требует задействования механизма репарации двухцепочечных разрывов ДНК. Два основных пути, HR и NHEJ, консервативны в процессе эволюции и, обеспечивают репарацию двухцепочечных разрывов [114]. HR включает взаимодействие между гомологичными последовательностями и, таким образом, ведет к целевой интеграции. Напротив, NHEJ опосредует лигирование цепей ДНК, не имеющих гомологии, и, следовательно, приводит к случайной интеграции. У эукариот HR путь зависит от белка Rad52, тогда как путь NHEJ зависит от гетеродимера Ku (Ku70/Ku80-белковый комплекс) и комплекса ДНК-лигазы IV-Xrcc4 [114]. Согласно модели «привратника», оба пути конкурируют друг с другом. Когда Rad52p связывается с концами введенной ДНК, концы ДНК будут обрабатываться HR, однако, когда связывается гетеродимер Ku, ДНК интегрируется через путь NHEJ [115]. У нитчатых грибов, как и у других многоклеточных организмов, в отличие от *S. cerevisiae*, путь NHEJ, по-видимому, доминирует над путем HR.

Исследования дрожжей и мицелиальных грибов, не относящихся к роду *Saccharomyces*, показали, что путем делеции компонентов пути NHEJ случайная интеграция фрагментов ДНК может быть сильно уменьшена. Например, делеция гомолога Ku70 в *A. niger* (KusA) резко повысила эффективность гомологичной интеграции и достигла более 80% по сравнению с 7% на фоне дикого типа, когда использовались только гомологичные фланки размером 500 п.о. Точно так же у других грибов с делециями гомологов Ku70, Ku80 или Lig4, наблюдалась высокая частота HR [116 – 119]. Следовательно, мутанты, дефектные по NHEJ, дают возможность сделать целевые генетические изменения в мицелиальных грибах более простыми и менее трудоемкими.

Важно отметить, что белки Ku70/Ku80 важны для поддержания длины теломер у дрожжей и растений и необходимы для обеспечения стабильности хромосом у млекопитающих [120, 121]. Фенотипический анализ штаммов грибов, дефектных по NHEJ, показал, что эти штаммы проявляли более высокую чувствительность к различным токсинам и облучению [122, 123]. Поэтому, чтобы избежать этих проблемы, разрабатываются подходы для временной блокировки NHEJ [124].

Возможной стратегией повышения частоты событий HR является использование низкомолекулярных химических веществ в качестве: ингибиторов NHEJ или активаторов гомологичной рекомбинации. Перспективным в отношении ингибирования NHEJ является ресвератрол — низкомолекулярное соединение растительного происхождения, с широким

спектром биологических активностей [125]. В экспериментах на первичных фибробластах свиньи было показано положительное влияние ресвератрола на экспрессию ключевых факторов HR и отрицательное — на экспрессию основных компонентов, участвующих в NHEJ [126].

Поскольку при делеции генов методом гомологичной рекомбинации обычно проводят трансформации линейным фрагментом ДНК с генетическим маркером, фланкированным областями целевого гена, то могут возникать ещё трудности из-за ограниченного набора генетических маркеров. В работе [127] был предложен метод удаления генов в мицелиальных грибах, который позволяет рециркулировать маркер отбора и эффективен даже в штаммах с преобладанием NHEJ. Предложенная методика заключается в том, что проводится трансформация редактируемого гриба плазмидой (по типу pC3-An_Δ*xlnR*), содержащей обширные области гомологии с нужным локусом с делецией части интересующего гена, фланкированного с одной стороны селективным маркером, например, геном *pyrG*. Трансформанты, в которые интегрирована плазмида, имеют генотип *pyrG*⁺ и могут расти на среде, не содержащей уридина. Рекомбинация между плазмидой и хромосомой с использованием гомологии фланкирующей области нужного локуса, присутствующей на хромосоме и плазмиде, приводит к интеграции плазмиды в хромосому. Снятие давления отбора путем роста клеток на среде, содержащей уридин, позволяет удалить плазмиду. Когда плазмида элиминируется, клетки остаются с генотипом *pyrG*⁺ и могут быть отобраны путем посева на среду, содержащую уридин и 5-фтороротовую кислоту. Последующее вырезание за счёт гомологии фланкирующей области может привести либо к реверсии и восстановлению дикого типа, либо к делеции. Было показано, на примере гена *xlnR* *A. niger*, что у 4 из 10 клонов, протестированных с помощью ПЦР, были удалены маркер и целевой ген (Рисунок 5) [127].

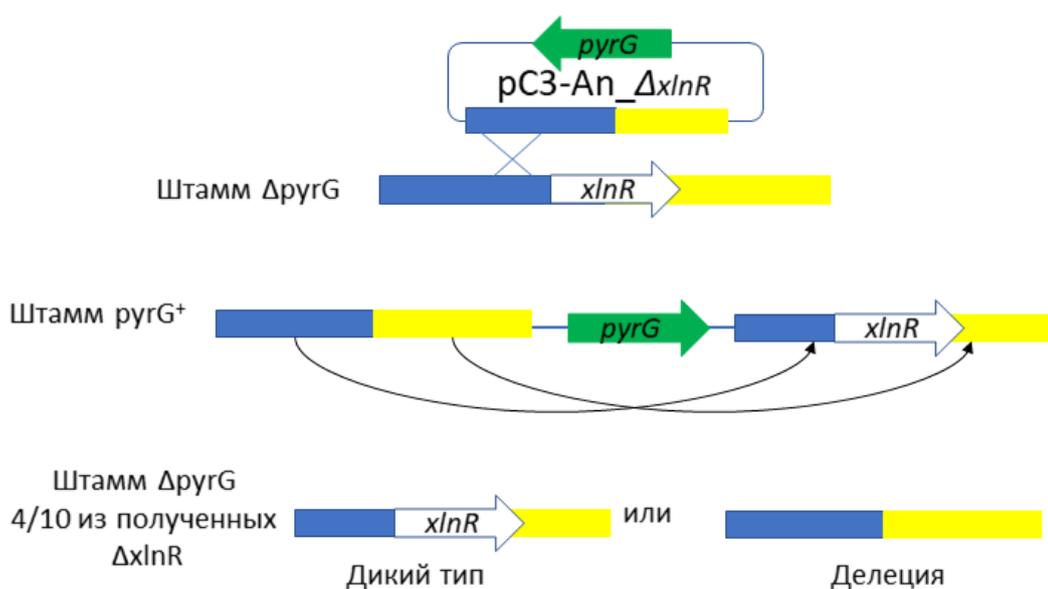


Рисунок 5 – Схема элиминации маркерного гена (*pyrG*) после делеции гена гомологической рекомбинацией на примере гена *xlnR* [127]

Однако, данный метод имеет те же ограничения, что и другие методы основанные на механизме HR.

3.3.2 Устройство системы редактирования генома CRISPR-Cas

CRISPR-Cas (от англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats — кластерные короткие регулярные палиндромные повторы и CRISPR associated – связанный с CRISPR) – это система обеспечивающая адаптивный противофаговый иммунитет у многих бактерий. Открытие CRISPR произошло в 1987 году, с обнаружением Ёсидзуми Исино необычных повторов в геноме бактерии *Escherichia coli* [128]. В следующем десятилетии были обнаружены подобные мотивы в геномах ещё порядка 20 микроорганизмов, однако их функции оставались не известными [129]. В 2002 году были открыты гены белков с нуклеазной и хеликазной активностями, фланкирующими CRISPR-кассеты [130]. Наконец, в 2007 году было показано, на примере бактерии *Streptococcus thermophilus*, что система CRISPR-Cas обеспечивает адаптивный иммунитет бактерий к бактериофагам [131].

CRISPR-кассета представляет собой прямые повторы ДНК, между которыми находятся, короткие (в среднем 20 пар нуклеотидов), переменные последовательности, называемые спейсерами. Спейсеры – это участки ДНК, встроенные в ходе адаптивного иммунного ответа. Среди Cas-белков выделяют две функциональных группы: более консервативные белки, участвующие в адаптации и менее консервативную группу белков эффекторного комплекса. Белки адаптационной группы необходимы для встраивания в CRISPR-кассету новых спейсеров, а белки эффекторной группы непосредственно атакуют цепь ДНК или РНК имеющую участок комплементарный спейсеру [132].

Системы CRISPR-Cas в зависимости от состава белков эффекторного комплекса эволюционно разделяют на два класса. Многосубъединичные комплексы относят к первому, а моносубъединичные ко второму классам. Среди классов также выделяют несколько типов по наличию в эффекторном комплексе белка, отсутствующего в других типах [133]. В искусственных системах редактирования генома используются моносубъединичные эффекторные белки второго класса.

Не смотря на различия эффекторных комплексов у различных микроорганизмов принцип функционирования систем CRISPR-Cas у всех одинаков. Вначале белки адаптационной группы добавляют в CRISPR-кассету новые фрагменты ДНК, произошедшие из фаговых геномов или даже обрывков клеточной ДНК, образованных, например, при репарации. Механизм интерференции состоит из транскрипции CRISPR-касеты с образованием незрелой pre-CRISPR РНК (pre-crRNA), содержащей множество повторов и спейсеров. В ходе последующего процессинга первичного транскрипта происходит образование зрелых CRISPR РНК (crRNA), содержащих по одному спейсеру, фрагменту повтора. Далее crRNA и белки интерференционной

С помощью рентгеноструктурного анализа была получена третичная структура белка SpCas9 в комплексе с ДНК и sgRNA [135].

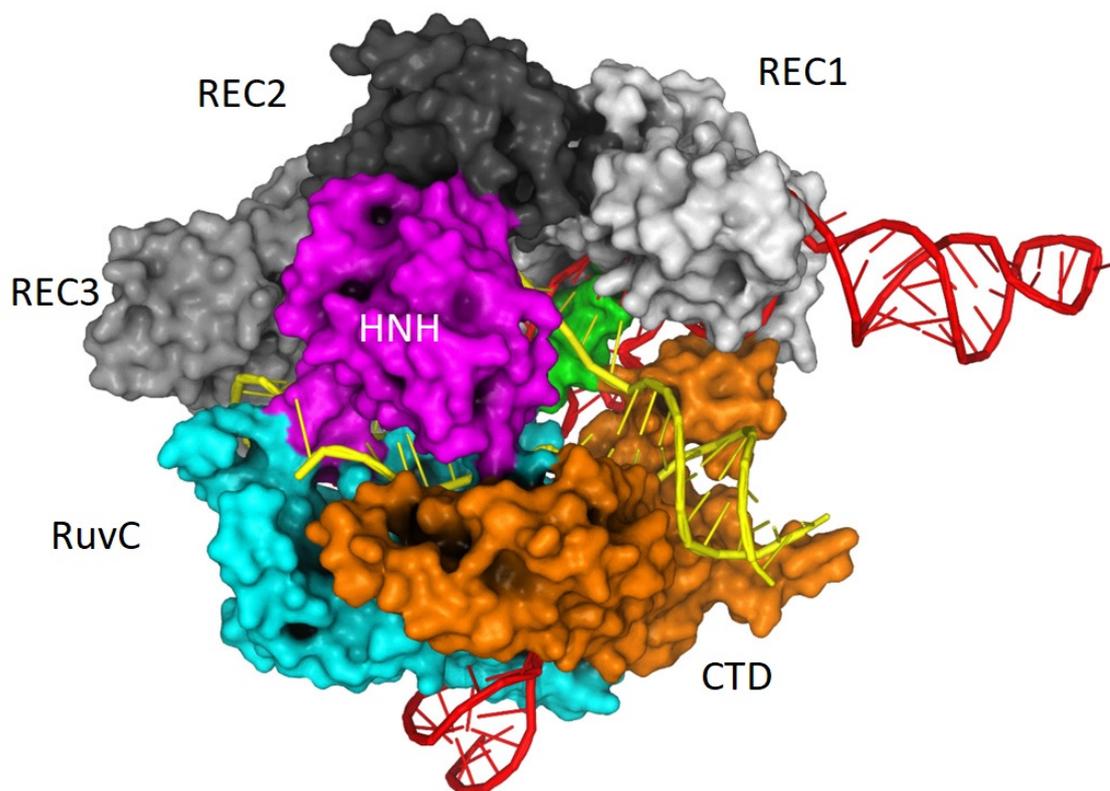


Рисунок 7 – Пространственная структура белка SpCas9 в комплексе с двуцепочечной ДНК и sgRNA (Номер структуры 5F9R в PDB) [132]

SpCas9 состоит из нуклеазного (NUC) и распознающего (REC) сегментов. В NUC-сегмент входят HNH-подобный и RuvC-подобный нуклеазный домены, а также С-концевой домен (CTD), который взаимодействует с PAM. REC-сегмент состоит из трёх α -спиральных домена (REC1 – REC3).

HNH-домен расщепляет цепь ДНК, комплементарную спейсеру, а RuvC-подобный домен – вторую цепь. При этом процессе глобула Cas9 полностью обхватывает ДНК, которая, заходя в отверстие между CTD и REC1 доменами, расплетается на две цепи. Одна из цепей связывается в узком канале между HNH, RuvC и CTD доменами, а вторая цепь образует гетеродуплекс с направляющей-РНК, который зажат между NUC- и REC-сегментами. Двойная цепь ДНК восстанавливается за противоположным от PAM концом протоспейсера [132].

Интересно, что комплекс Cas9:sgRNA – не способен к процессивному поиску мишени, за счёт передвижения по цепи ДНК. После образования комплекса между апоферментом Cas9 и sgRNA он случайным образом, путём трёхмерной диффузии, соединяется с ДНК. При отсутствии PAM в месте его посадки на ДНК, он диссоциирует с цепи ДНК и поиск продолжается. Таким образом, время нахождения мишени в больших геномах эукариот из-за неспособности нуклеазы

Cas9 к процессивному поиску, в отличие от других белков со сродством к определённым последовательностям ДНК, увеличивается на несколько порядков [136].

Несмотря на то, что белок SpCas9 уже широко применяется в геномном редактировании, продолжается поиск новых эффекторных белков. Распространённое использование белка SpCas9 связано прежде всего с тем, что это была одна из первых обнаруженных нуклеаз второго класса. Тем не менее, многие ортологи Cas9 превосходят его по некоторым свойствам [132]. Так белок Cas9 из *Staphylococcus aureus* имеет меньший размер, а белки StCas9 из *Streptococcus thermophiles* или NmeCas9 *Neisseria meningitides* имеют большую точность узнавания. Так же, ортологи Cas9 имеют разные последовательности PAM, что делает доступным для редактирования другие сайты [137].

3.4 Применение системы CRISPR-Cas9 для редактирования геномов мицелиальных грибов¹

3.4.1 Общий принцип применения системы CRISPR-Cas9 для редактирования геномов мицелиальных грибов

Технология геномного редактирования с помощью бактериальной системы CRISPR-Cas основана на её естественной функции: использовании РНК для направления нуклеазы к целевой последовательности ДНК, ведущего к расщеплению ДНК в этом месте. Однако, при редактировании генома требуется не полная деградация расщепленной молекулы ДНК, а активация механизмов репарации вызванного разрыва либо за счёт механизма NHEJ, либо за счёт рекомбинации поврежденной молекулы ДНК с искусственно синтезированной матрицей путём гомологичной рекомбинации. Второй способ репарации принято обозначать как HDR— Homology Directed Repair. [138].

В случае репарации двухцепочечных разрывов по механизму механизма NHEJ часто происходят небольшие вставки или делеции нуклеотидов, которые могут приводить к сдвигу открытых рамок считывания и соответственно потере функции генов. Более крупные делеции и даже инверсии могут быть достигнуты путем одновременной индукции множественных разрывов с использованием нескольких направляющих-РНК [139, 140]. При одновременном внесении ДНК имеющей гомологию с областью разрыва ДНК может произойти замена целевой последовательности другой за счёт механизма HDR. Показано, что частота случаев HDR при

¹В данном разделе обсуждаются результаты диссертационной работы, опубликованные в обзорной статье по теме диссертации:

Рожкова А.М., Кислицин В.Ю. Редактирование геномов мицелиальных грибов: применение системы CRISPR/Cas // Успехи биологической химии. – 2021. – Т. LXI, - С. 253-294.

получении двухцепочечных разрывов ДНК за счёт искусственных нуклеаз повышается на несколько порядков [141].

Необходимо отметить, что использовать индуцированные двуцепочечные разрывы для геномного редактирования появилась задолго до начала использования системы CRISPR-Cas. Изначально, для этих целей использовали мегануклеазы, затем искусственные нуклеазы с цинковыми пальцами, позднее системы TALEN [142 - 144]. Однако, использование системы CRISPR-Cas для получения индуцированных двухцепочечных разрывов значительно менее трудоёмко по сравнению с другими существующими системами [140].

В общем случае процедура редактирования генома системой CRISPR-Cas состоит из следующих этапов:

1. Подбор последовательности спейсера под редактируемый ген;
2. Клонирование sgRNA с подобранным спейсером;
3. Доставка системы в редактируемый организм (клетку);
4. Отбор отредактированных клонов [145].

Теперь рассмотрим более подробно каждый этап.

Правильный выбор последовательности спейсера, очень важен. От этого зависит не только эффективность редактирования целевого сайта, но и не специфическая активность системы. Обычно спейсер должен соответствовать следующим условиям: не образовывать вторичных структур, содержание гуаниновых и цитозиновых оснований должно быть в районе от 35% до 75%, не должно быть поли-Т трактов (стоп сигнал для РНК-полимеразы III), нецелевые сайты должны содержать не менее трёх неспаренных оснований и желательно ближе к 3'-концу [145]. Для подбора последовательностей спейсеров, в настоящее время, существуют специальные программы в открытом доступе. В них используются различные алгоритмы оценки эффективности спейсера и проводят поиск возможных не целевых сайтов в редактируемом геноме [146].

Клонирование направляющей-РНК с выбранным спейсером является тривиальной задачей. Например, для этого используют лигирование двухцепочечных фрагментов ДНК с «липкими» концами в плазмиду, гидролизованную между промотором и последовательностью направляющей-РНК рестриктазой IIS класса, например, *BbsI*, с образованием не комплементарных, «липких» концов [145].

Доставить редактирующий комплекс в клетку можно различными способами, как в виде ДНК с последующей сборкой комплекса *in vivo* или в виде готового рибонуклеопротеина после сборки *in vitro*. Так же есть возможность доставить синтезированную *in vitro* РНК нуклеазы для трансляции *in vivo* вместе с готовой sgRNA, или предварительно интегрировать в геном ген *Cas9*, а потом вводить в клетку нужную sgRNA (Рисунок 8) [145].

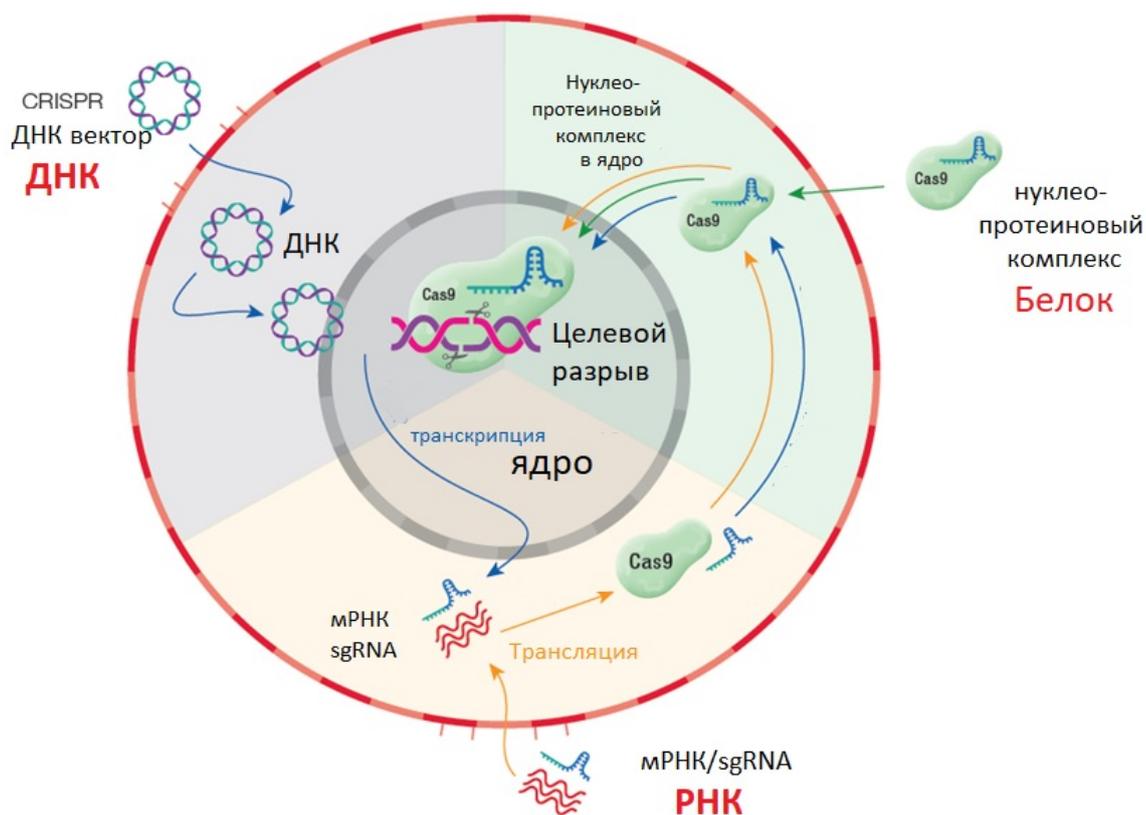


Рисунок 8 – Способы доставки системы CRISPR-Cas в клетку

Использование собранного *in vitro* комплекса Cas9:sgRNA позволяет избежать встраивания в геном генов *Cas9* и *sgRNA*. Однако доставка рибонуклеопротеина в грибные клетки довольно сложна [145].

Во многих работах с мицелиальными грибами применяли доставку генов *Cas9* и *sgRNA* в виде ДНК интегрируя в геном или в составе плазмиды с участком *AMA1*, что позволяет поддерживать её автономную репликацию в селективных условиях. Однако при транскрипции гена направляющей-РНК, часто возникают трудности, так как для этого обычно используется РНК-полимеразы III для, которая не добавляет кэп-фрагмент и поли(А)-хвост на 5'-конец и 3'-концы транскрипта соответственно. В случае мицелиальных грибов промоторы РНК-полимеразы III не известны у многих видов. Для решения этой проблемы используют либо промоторы РНК-полимеразы II с добавлением рибозимов с флангов направляющей-РНК или консервативный промотор 5S рРНК, транскрибируемой также РНК-полимеразой III [147].

Для первичного отбора клонов после редактирования обычно используют изменения фенотипа или способность расти на селективной среде. Для этого проводят нокаут на маркерного гена, например, *ura5 (pyrG)* выключение которого позволяет расти на среде с 5'-фтороротовой кислотой или *albA* (отключение приводит к образованию светлых конидий у аспергиллов) [148, 149] Другой возможностью является встраивание по месту разреза донорной молекулы ДНК с

маркерным геном за счёт гомологичной рекомбинации. После первичного отбора желательно секвенировать отредактированный участок генома.

3.4.2. Геномное редактирование *Trichoderma reesei*

T. reesei один из наиболее используемых в биотехнологии видов мицелиальных грибов, который отличается высоким уровнем секреции целлюлитических ферментов. Поэтому не случайно, что первое успешное редактирование генома мицелиального гриба была проведено на *T. reesei* [150]. В работе 2015 года исследователи вначале получили штамм со вставкой кодоноптоимизированного гена *Cas9* и затем проводили его трансформацию синтезированной *in vitro* sgRNA. Использование такого подхода объясняется отсутствием известных у *T. reesei* промоторов для РНК-полимеразы III, что является проблемой и для многих других мицелиальных грибов. В качестве генов мишеней были выбраны ген *ura5*, *lae1*, *vib1* и *clr2*. Ген *ura5* является маркерным, его отключение приводит к выживаемости трансформантов на среде с 5'-фтороротовой кислотой. Гены *lae1*, *vib1* и *clr2* регулируют экспрессию целлюлазных генов. Авторами было показано, что эффективность нокаутов значительно повышается при использовании фрагментов ДНК с плечами гомологии и при длине в 600 и более пар нуклеотидов достигает 100% [150].

В статье 2019 года для делетирования генов ЦБГ 2 (*cbh2*), ЭГ 1 (*egl1*) и ЭГ 2 (*egl2*) был использован другой подход. Исследователи трансформировали протопласты *T. reesei* собранным *in vitro* комплексом Cas9:crRNA. Для трансформации использовался штамм *T. reesei* с делецией гена лигазы *mus53* для улучшения гомологичной рекомбинации и мутацией в гене *pyr4*. Удаление выбранных генов проводилось одновременно с использованием эквимольного количества crRNA с разными спейсерами на начало и конец каждого гена. Удалённые фрагменты генома замещались донорными ДНК-фрагментами с геном *pyr4* фланкированными с 5'- и 3'-концов килобазными участками гомологичными геномной ДНК. Как результат, было получено 12% колоний с тройной делецией из 139 полученных. Далее по такой же схеме эксперимент был повторён с использованием в качестве донорной-ДНК экспрессионных кассет с геном липазы *calB* из *Candida antarctica*. В результате был получен штамм-продуцент липазы *calB* с низким содержанием не целевых белков и удельной активностью в 1,5 раз выше по сравнению со стандартной экспрессией с промотора *cbh1* [151].

3.4.3. Геномное редактирование грибов рода *Aspergillus*

Многие виды нитчатых грибов рода *Aspergillus* широко используются в биотехнологии. Они применяются для производства ферментов, органических кислот, алкогольных напитков, антибиотиков и других биотехнологических продуктов. В то же время некоторые аспергиллы продуцируют микотоксины и являются возбудителями болезней человека и животных.

В работе [152] опубликованной в 2015 году, была оптимизирована система CRISPR-Cas для геномного редактирования мицелиальных грибов и опробована сразу на 6 видах грибов рода *Aspergillus*. При этом компоненты системы CRISPR-Cas доставлялись в составе единой плазмиды. Для применения этой системы на различных видах были получены 4 варианта плазмиды с разными маркерными генами, обычно используемыми для мицелиальных грибов: *AFUM_pyrG*, *AN_argB*, *ble^R* или *hyg^R*. Плазмида содержала участок AMA1, для поддержания её автономной репликации в клетке гриба. Для транскрипции кодоноптоимизированного гена *SpCas9* для *A. niger* с сигналом внутриядерной локализации вируса SV40 использовался сильный конститутивный промотор фактора элонгации трансляции 1 *A. niger* (*tef1*) и такой же терминатор. Для транскрипции sgRNA был выбран промотор РНК-полимеразы II, по причине недостаточной изученности промоторов РНК-полимеразы III у мицелиальных грибов. Поэтому был использован конститутивный промотор глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы *A. niger* (*gpdA*), а для терминирования транскрипции – терминатор гена *trpC*. Для того чтобы направляющая-РНК не содержала кэп на 5'-конце и поли(А)-хвост на 3'-конце, её последовательность была фланкирована с последовательностями НН рибозима (hammerhead) и рибозимом вируса гепатита D (HDV) соответственно (Рисунок 9).

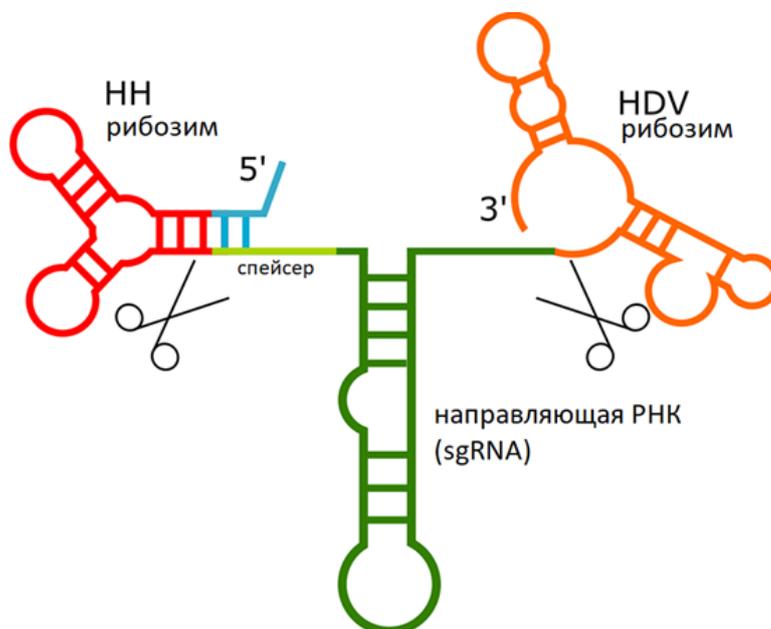


Рисунок 9 – Высвобождение направляющей РНК из транскрипта РНК-полимеразы II. Направляющая-РНК окрашена зеленым цветом, спейсер – светлозелёным, рибозимы НН и вируса гепатита D (HDV) – красным, синим и оранжевым, соответственно. Точки расщепления обозначены ножницами. Синяя часть НН гибридизуется со спейсером для эффективного расщепления [152]

Данная система была испытана со спейсером под ген *albA* на 5 видах рода *Aspergillus*: *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. luchuensis* и *A. brasiliensis*. Отключение данного гена в мицелиальных грибах должно приводить к образованию неокрашенных колоний. Наибольшая эффективность редактирования была у *A. brasiliensis* и *A. niger* (около 100%) и наименьшая у *A. luchuensis* – всего одна колония из четырёх, возможно из-за низкой выживаемости после трансформации. Данная система также успешно прошла испытание на *A. nidulans* со спейсером на ген *uA* и на *A. aculeatus* со спейсером на ген *pyrG* [152].

Хорошим примером практического применения геномного редактирования мицелиального гриба рода *Aspergillus* является работа [153] по редактирование генома *A. niger* для создания продуцента галактаровой кислоты. Предварительно было проведено секвенирование транскриптома *A. niger* до, через пять и восемнадцать часов культивирования на среде галактаровой кислотой для выявления генов участвующих в её катаболизме. В итоге было обнаружено семь генов с увеличившимся уровнем экспрессии. После этого шесть генов из этой группы были нокаутированы с использованием системы CRISPR-Cas. Для этого исследуемый штамм был котрансформирован плазмидой с геном *Cas9*, также содержащей последовательность *AMA1* и селективный маркер *hyg*, и двумя синтезированными *in vitro* sgRNA на начало и конец каждого гена. Эффективность нокаутов при этом составила от 27 до 100%. Также эти же гены были нокаутированы с помощью делеционных кассет с плечами гомологии по 1,5 т.п.н. и геном *pyrG*, как селективным маркером. При этом результаты делетирования были значительно хуже (от 0 до 43%). Это служит ещё одним примером высокой эффективности данной системы.

Довольно интересна работа [154] опубликованная в 2018. Так как зачастую промоторы РНК-полимеразы III у многих видов мицелиальных грибов не известны, то возникает проблема экспрессии направляющей-РНК. Поэтому в данной работе для транскрипции направляющей-РНК были испытаны различные промоторы: гена *RNU6 A. niger* (*PanU6*), промотор человеческого гена *RNU6-1* (*PhU6*), промотор 5S рРНК *A. niger* с различными вариантами длины 5'-НТП (-338, -160, -106, -65, -35) и без неё. Поскольку промотор 5S рРНК находится в самой последовательности гена, то его последовательность остаётся на 5'-конце транскрипта. Для отделения sgRNA от 5S рРНК между ними был добавлен рибозим вируса гепатита D. Чтобы определить активность использованных промоторов штамм G1 *A. niger* (*amdS-*, *ΔglaA*, *ΔrepA*) был котрансформирован плазмидой с кодоноптоимизированным под *A. niger* геном *SpCas9* и плазмидами с sgRNA контролируемой выбранными промоторами. В качестве мишени был выбран ген *albA*, нокаут которого приводит к образованию не окрашенных колоний за счёт нарушения синтеза пигмента мелонина. В итоге, все варианты с промотором 5S рРНК показали высокую эффективность редактирования (около 100%), в то время как, у промоторов *PhU6* и *PanU6* она оказалась низкой (20% и менее). Интересно также, что наличие 5S рРНК на 5'-конце

sgRNA даже немного повысило эффективность редактирования. По их предположению данный феномен можно объяснить защитой sgRNA от действия РНКаз с 5'-конца. Далее для повышения эффективности гомологичной рекомбинации с использованием технологии CRISPR-Cas был получен штамм *A. niger* G1.6 с нокаутом гена *kusA*. В таком штамме эффективность гомологичной рекомбинации донорных молекул ДНК с плечами гомологии всего по 40 пар нуклеотидов достигала в местах гидролиза геномной ДНК ферментом Cas9 достигала 100%. В итоге, при использовании двух направляющих-РНК был успешно делегирован участок хромосомы длиной 48 т.п.н. содержащий кластер генов для синтеза фуמוзина В1. Данный кластер был выбран в качестве мишени, поскольку он обладает гепато- и нефротоксическим действием для животных и соответственно, ограничивает использование *A. niger* в пищевой промышленности.

3.4.4. Геномное редактирование мицелиальных грибов из прочих родов

В настоящее время накопился спектр работ по редактированию представителей родов *Neurospora*, *Talaromyces*, *Phytophthora*, *Mucor*, *Fusarium*, *Penicillium* и других, которые также используются в биологических процессах или являются патогенами животных и растений [147].

P. chrysogenum используется для производства β-лактамных антибиотиков, а также других вторичных метаболитов. В статье [155] в 2016 году успешно использована CRISPR-Cas система для редактирования генома *P. chrysogenum*. Вначале, исследователи решили проверить эффективность метода на гене поликетидсинтазы (*pks17*). Его нокаут позволяет проводить отбор по изменению фенотипа за счёт нарушения синтеза пигмента. Для работы был использован штамм с нокаутом гена *hdfA* для повышения частоты гомологичной рекомбинации. Котрансформация протопластов была проведена собранным *in vitro* рибонуклеопротеином Cas9-sgRNA и кассетой ДНК с плечами гомологии по 1 т.п.н. и маркером устойчивости к ацетамиду (*amdS*). После селекции на ацетамиде методом ПЦР было проанализировано 8 колоний на корректное встраивание гена *amdS*, и все из них показали положительный результат. Таким же образом был получен двойной нокаут генов *pks17* и гена дикетид синтазы необходимой для синтеза ловастатина (*lovF*). Эффективность при этом была 50%. Так же в данной работе была испытана котрансформация протопластов линейными фрагментами ДНК. По плану исследователей, за счёт гомологичных концов эти фрагменты должны рекомбинировать *in vivo* с образованием автономно реплицирующейся плазмиды, которую можно элиминировать после снятия селекционного давления. Для этого был использован один фрагмент, содержащий последовательность *AMA1*, ген *Cas9* и последовательность направляющей-ДНК, а второй - маркером *amdS*. Транскрипции гена *Cas9* контролировалась индуцируемым промотором гена ксиланазы *xlnA*, а транскрипции sgRNA - тремя вариантами промотора РНК-полимеразы III (*PUB*, *PtRNA-Leu* и *PtRAN-Met*), которые как оказалось, все обеспечивают достаточный уровень

экспрессии. Тем не менее, оказалось, что произошло встраивание маркерного гена в геном, поскольку даже после нескольких пересевов на среду без ацетамида, некоторые клоны оставались устойчивыми к нему. В итоге, исследователи заключили, что редактирование генома собранным *in vitro* комплексом минимизирует нецелевые эффекты, тогда как синтез комплекса *in vivo* с автономной плазмиды повышает число отредактированных трансформантов.

Интересным примером использования технологии CRISPR-Cas является редактирование генома мицелиального гриба *T. atrovirens* для определения механизмов синтеза вторичных метаболитов [156]. Данный гриб является продуцентом талароконволутина А и соединения ZG-1494 α – аналога талароконволутина В, ингибитора фактора активации тромбоцитарной ацетилтрансферазы. Поскольку геном *T. atrovirens* известен, данная группа исследователей решила использовать для выявления ферментов синтеза этих веществ систему CRISPR-Cas ранее адаптированную ими для рода *Aspergillus* [152]. Для начала исследователи проверили пригодность этой системы для *T. atrovirens*. Для этого была проведена котрансформация протопластов донорной плазмидой с геном *hug* с одной из трёх автономно реплицирующихся плазмид содержащими ген *Cas9* и последовательность направляющей-ПНК, отличающиеся последовательностями спейсеров. В качестве мишени был выбран ген с последовательностью в генбанке под номером UA08_00425, возможно кодирующий поликетидсинтазу, необходимую для серой окраски конидий. В результате система оказалась работоспособной, но эффективность редактирования при использовании последовательностей разных спейсеров различалась в 10 раз. После этого аналогичным образом был нокаутирован ген UA08_04451, который по предположению являлся гомологом ген *ccsA*, участвующего в синтезе близких к талароконволутину А и ZG-1494 α веществ у других мицелиальных грибов. Выросшие после трансформации клоны были проанализированы на наличие делеций и продукции талароконволутина А и ZG-1494 α . В итоге, в клонах, с делецией гена UA08_04451 и синтез талароконволутина А и ZG-1494 α оказался нарушен. Таким образом, было показано, что системой CRISPR-Cas оптимизированной для рода *Aspergillus* можно решить практическую задачу обратной генетики даже для филогенетически далёкого вида из рода *Thalaromyces*.

3.5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ

По современным представлениям молекулярной генетики, экспрессия генов карбогидраз находится под двойным контролем: при наличии в среде легкоусвояемых источников углерода, например, глюкозы, экспрессия карбогидраз блокируется за счёт механизмов УКР, а при их отсутствии, но наличии в среде веществ-индукторов экспрессия генов соответствующих ферментов - активируется. Имеющаяся модель регуляции успешно применяется для повышения продуктивности промышленных штаммов-продуцентов ферментов. Тем не менее, изучение

данных механизмов продолжается, поскольку, функциональное значение элементов регуляторного механизма может значительно отличаться у различных видов мицелиальных грибов.

Для изучения регуляторных механизмов и применения полученных данных для улучшения качеств промышленных штаммов, используются методы генетической инженерии, основанные на механизмах гомологичной и негомологичной рекомбинации. Одним из новейших методов генетической инженерии является редактирование генома с помощью программируемых нуклеаз на основе бактериальной системы CRISPR-Cas9. Данный метод позволяет относительно легко получать нокауты генов и значительно повышает частоту событий интеграции экзогенных фрагментов ДНК в геном за счёт механизмов HR. Тем не менее, система CRISPR-Cas9 зачастую требует оптимизации для каждого вида мицелиального гриба, а эффективность её использования может значительно отличаться у различных организмов.

Таким образом, для дальнейшего повышения продуктивности мицелиального гриба *P. verruculosum* необходимо подробно изучить его механизм регуляции экспрессии генов карбогидраз, главным образом, определив функциональное значение его транскрипционных регуляторов Clr1, Clr2, XlnR и TacA.

4 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ¹

4.1. Материалы

4.1.1 Штаммы микроорганизмов

Молекулярное клонирование проводили с использованием бактерий *Escherichia coli* XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tet^r)] [157].

В работе были использованы штаммы *P. verruculosum*:

P. verruculosum B1-537 - штамм-реципиент *P. verruculosum* (Δ niaD);

P. verruculosum B1-221-151 лабораторный штамм (niaD⁺);

P. verruculosum B1-2743 (Δ niaD) получен с помощью системы CRISPR-Cas9 в данной работе.

P. verruculosum F12 – «гетеро»-продуцент β -глюкозидазы *A. niger*;

P. verruculosum F10 – «моно»-продуцент β -глюкозидазы *A. niger*.

4.1.2 Реагенты

Все используемые в работе реактивы имели чистоту «хч», «осч» и «Analytical grade».

Для создания сред для культивирования микроорганизмов были использованы следующие соли и компоненты: глюкоза, дрожжевой экстракт, агар, соли: KН₂РO₄, ZnSO₄×7H₂O, K₂НРO₄, FeSO₄×7H₂O, MnSO₄, MgSO₄×7H₂O, CuSO₄, CaCl₂ и NaClO₃ (Химмед, Россия), ампициллин, Зеоцин (Thermo Fisher Scientific, США).

Для работы с РНК и ДНК применяли следующие реактивы, наборы и ферменты:

Экстракцию плазмидной ДНК, продуктов ПЦР и элюции генетического материала из агарозных гелей здесь и далее производили наборами QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Gel Extraction Kit и QIAGEN Plasmid mini Kit (QIAGEN, Германия).

T4 ДНК-полимераза (5 ед/мкл), T4 ДНК лигаза, T4 полинуклеотид-киназа (10 ед/мкл) (Thermo Fisher Scientific, США), Taq-полимераза (5,0 ед/мкл) (Thermo Fisher Scientific, США), эквимоллярная смесь четырех dNTP (10мМ) (Thermo Scientific, США), рестрикционные ферменты: *Bam*HI, *Hind*III, *Nde*I, *Sall* (Thermo Scientific, США), все ферменты использовались вместе с комплектными буферами.

Синтез первой цепи кДНК на РНК-матрице проводили с использованием набора MMLV RT KIT (Евроген, Россия).

Для количественной ПЦР в реальном времени использовали готовую смесь для ПЦР qPCRmix-HS SYBR+ROX (Синтол, Россия).

Реактивы для белкового электрофореза: акриламид 4К (AppliChem, США), бис-акриламид тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), уксусная кислота, спирт этиловый, кумасси бриллиантовый голубой R (Sigma, США), белковые маркеры для электрофореза (Thermo Fischer Scientific, США).

Олигонуклеотиды для ПЦР были синтезированы в ООО «Синтол» (Россия).

В качестве субстратов для ферментативного гидролиза использовались МКЦ по ТУ 20.16.59-001-40693384-209, партия №002 от 20.07.2020, марка – полупродукт, гранулированный порошок, гранулы более 2 мм, влажность 4,9%, насыпной объём около 3 г/см³ (ООО Кристацелл, Россия) и Осина (сибирская) с корой, измельченная на планетарной мельнице-активаторе типа АГО-2С во ВНИИСинтезбелок (Россия).

4.1.3 Среды для культивирования микроорганизмов

Бактерии *E. coli* культивировались на среде Lysogeny broth (LB) с добавлением 50 мкг/мл ампициллина, а также при необходимости культивирования на чашках Петри 2% бактоагара.

Всё штаммы *P. verruculosum* выращивали на минимальной среде (МС), содержащей (г/л): (NH₄)₂SO₄, - 5.0, KH₂PO₄ -15, MgSO₄·7H₂O - 0.6, CaCl₂, - 0.6, FeSO₄·7H₂O - 0.005, MnSO₄·xH₂O - 0.0016, ZnSO₄·7H₂O, - 0.0014, CoCl₂ - 0.002, глюкоза – 10, с добавлением определенного источника азота (10 мМ NaNO₃ для штаммов с генотипом *niaD*⁺ и NH₄Cl для Δ *niaD* штаммов) и с добавлением 2% бактоагара при необходимости культивирования на чашках Петри.

Состав ПС-агара (г/л): глюкоза – 10, дрожжевой экстракт – 5, KH₂PO₄ – 20, агар бактериологический – 20.

Среда для наращивания инокулята для засева ферментёров (г/л): патока – 21, дрожжевой экстракт – 10, пшеничные отруби – 10, KH₂PO₄–15; CaCl₂·2H₂O–0,3; (NH₄)₂SO₄–5.

Состав среды СФС для культивирования в ферментёрах (г/л): МКЦ – 40; кукурузный экстракт – 30, пшеничные отруби – 10; KH₂PO₄–14; CaCl₂–0,6; (NH₄)₂SO₄–10; мочевины – 2,5; MgSO₄·7H₂O - 0,6.

Состав подпитки при культивировании в ферментёре (г/л): глюкоза - 37,5; МКЦ – 10.

4.2 Методы

4.2.1 ПЦР для амплификации генов для последующего клонирования

Все гены, клонированные в ходе работы, были амплифицированы с помощью ДНК полимеразы Phusion™ High-Fidelity (Thermo Fischer Scientific, США). Реакционные смеси имели следующий состав: Phusion HF 5x буфер - 4 мкл, 10 мМ dNTP - 0,4 мкл, ДНК-полимераза - 0,2 мкл, соответствующие прямой и обратный праймеры по 1 мкл (10 пкМ), ДНК – (50 нг), вода – до 20 мкл. Программы амплификации были в соответствии с указаниями производителя: 1. 98 °С – 30 сек. 2. 98 °С – 7 сек, 60 °С – 10 сек, 72 °С – 30 сек на 1 т.п.о.- 35 циклов. 3. 72 °С – 1 мин.

Полученные ПЦР-продукты анализировали в 1.2% агарозном геле и при необходимости элюировали из геля набором QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия) по методике производителя.

Концентрацию ДНК измеряли на приборе NanoDrop Lite (Thermo Scientific, США).

4.2.2 ПЦР для скрининга

Для подтверждения наличие вставок в плазидах и в ДНК рекомбинантных штаммов, проводилась ПЦР с использованием полимеразы Phire II (Thermo Scientific™). Реакционные смеси имели следующий состав: Phire II 5x буфер - 4 мкл, 10 mM dNTP - 0,4 мкл, ДНК-полимераза - 0,4 мкл, соответствующие прямой и обратный праймеры по 1 мкл (10 пкМ), ДНК – (50 нг), вода – до 20 мкл. Программы амплификации были в соответствии с указаниями производителя: 1. 98 °С – 30 сек. 2. 98 °С – 7 сек, 60 °С – 10 сек, 72 °С – 20 сек на 1 т.п.н. - 35 циклов. 3. 72 °С – 1 мин. Полученные ПЦР-продукты анализировались в 1,2% агарозном геле.

4.2.3 Выделение ДНК

Экстракцию плазмидной ДНК, продуктов ПЦР и элюции генетического материала из агарозных гелей здесь и далее производили наборами QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Gel Extraction Kit и QIAGEN Plasmid mini Kit (QIAGEN, Германия). Анализ ПЦР продуктов проводился проверялось в 1,2% агарозном геле. В качестве маркера длин ДНК использовался DNA Ladder 100 bp (Invitrogen, США).

Геномная ДНК из грибных колоний, растущих на твёрдой среде, выделялась с использованием набора DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Качество выделенной ДНК проверялось в 1% агарозном геле.

4.2.4 Клонирование референсных генов для количественной ПЦР

Клонирование референсных генов *actA*, *tub2* и *gpdA* *P. verruculosum* было осуществлено нами ранее [7]. Поскольку геном штамма *P. verruculosum* В1 на момент клонирования референсных генов был не известен, был проведён анализ последовательностей, клонированных нами ранее генов *P. verruculosum*, в том числе гена *cbh1* путём их выравнивания с базами данных нуклеотидных последовательностей который показал, что ближайшими организмами являются: *Talaromyces marneffei*, *T. pinophilus*, *T. celluliticus*, *T. adpressus* [7].

Далее в геномах грибов родов *Talaromyces* и *Penicillium* производился поиск полноразмерных генов актина (*actA*), β-тубулина (*tub2*) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*gpdA*). Для поиска гомологичных последовательностей в геноме *T. adpressus* штамма CBS 142503 были выбраны последовательности Полноразмерных кодирующих участков под номерами: FJ393547.1 (*actA*, *P. marneffei*), D78154.1 (*tub2*, *P. digitatum*) и EU000324.1 (*gpdA*, *P. marneffei*). Найденные гомологичные последовательности использовались для поиска генов *actA*, *tub2* и *gpdA* в других мицелиальных грибах в коллекции нуклеотидных последовательностей базы данных NCBI для грибов (Nucleotide collection for fungi) [7].

Далее по 8–10 гомологичных последовательностей для каждого гена из различных грибов были сравнивались в программе AlignX (VNTI v. 10.0) с целью определения консервативных

участков генов. На консервативные участки генов *actA*, *tub2* и *gpdA* были выбраны вырожденные праймеры (по два прямых и два обратных для каждого гена), с температурой отжига около 60 °С (Таблица 3) [7].

Таблица 3 – Нуклеотидные последовательности использованных праймеров для получения внутренних фрагментов генов *actA*, *tub2* и *gpdA* *P. verruculosum* [7].

Название	Структура олигонуклеотида 5'→3'
PVTUBD1	tggtaaccaaat(t/c)ggtgctgctt
PVTUBR1	cagtgtagtgacccttgccca(g/t)tt
PVTUBD2	caggcaaatcatctctgc(t/c)gagca
PVTUBR2	gtagtgacccttgccca(g/t)ttgta
PVACTD1	tatcatgattggtatgggc(t/c)agaa(g/a)g
PVACTR1	catgacaatggtgccgta(c/g)ag(a/g)tcct
PVACTD2	ttgagcacggtgt(t/c)gtcac(c/g)aac
PVACTR2	agttgaaggtggt(g/c)(a/t)cgtggatacc
PVGPDD1	gctcaagta(t/c)gac(t/a)(c/g)caccacgg
PVGPDR1	tggaggaggggat(a/g)atgttctggg
PVGPDD2	gtctc(a/g)t(c/t)gtcaacggcaagaaggt
PVGPDR2	tggccatacc(g/t)gt(c/g)agcttgc

Различные сочетания прямых и обратных праймеров для каждого гена использовались для ПЦР в градиенте температуры отжига праймеров. В качестве матрицы применялась геномная ДНК штамма-реципиента *P. verruculosum* В1-537. ПЦР проводилась по вышеописанной методике [7].

Элюированные из агарозного геля ПЦР-фрагменты, были секвенированы в прямом и обратном направлении по методу Сэнгера с использованием соответствующих праймеров (Таблица 3). В результате ПЦР с использованием пар праймеров PVACTD1–PVACTR1, PVTUBD1–PVTUBR2 и PVGPDD1–PVGPDR1 в градиенте температур отжига были получены фрагменты ДНК длиной около 570 п.о. для гена *actA*, 400 п.о. для *tub2* и 450 п.о. для *gpdA* (Рисунок 10).

```

1 CCTACGTCGG TGATGAAGCA CAGTCCAAGC GTGGTATCCT CACCTTGAGA TACCCCATCG
61 AGCACGGTGT TGTACCAAC TGGGATGACA TGGAGAAGAT TTGGCACCAC ACCTTCTACA
121 ACGAACTTCG TGTTGCTCCT GAGGAGCACC CCGTTCCTTT GACCGAGGCT CCTATCAACC
181 CCAAGTCCAA CCGAGAGAAG ATGACCCAGA TTGTCTTCGA GACCTTCAAT GCTCCTGCCT
241 TCTATGTCTC CATCCAGGCC GTTTTGTCTC TGTACGCTTC CGGTCGTACC ACTGGTATCG
301 TCCTCGACTC CGGTGACGGT GTCACTCACG TCGTCCCAT STATGAGGGT TTCGCTCTTC
361 CTCACGCTAT CTCTCGTGT GACATGGCTG GCCGTGACTT GACCGACTAC CTCATGAAGA
421 TCCTTGCTGA GCGTGATTAC TCTTCTCCA CCACCGCCGA ACGTCAAATC GTCCGTGATA
481 TCAAGGAGAA GCTCTGCTAC GTTGCTCTTG ACTTTGAACA AGAAATCCAG ACCGCTTCCC
541 AGAGCTCCAG CTTGGAGAAG TCCTACGAAT TGCCGACGG ACAGGTCATC ACCATTGGCA
601 ACGAGCGATT CCGTGCTCCT GAGGCTCTCT TCCAGCCTTC CGTCATCGGT CTCGAAAGCG
661 GTGGTATCCA CGTCACCACC TACAATCCA TCATCAAGTG TGATGTCGAT GTC

```

А

```

1 TCTGGTGAGC TTAGACTCTCG ACCCCAATT TCGATCAATT GTTGGCAGAG CACACTGACT
61 GTTTCAGGCA AATCATCTCT GCTGAGCACG GTCTCGACGG CTCGGTGTG TAAGTATAAC
121 ACGATTCGAA TCCAGCTACA ATCCGACAAT ATCTGATGAT CAACAGCTAC AATGGCTCCT
181 CCGACCTCCA GTTGGAGCGT ATGAACGTTT ACTTCAACGA GGTGCGTCAG ACCAACCAC
241 CAGATAAATC GAACAAAAT CATCCCTCGA TAGGCTTCCG GCAACAAATA TGTCCCTCGT
301 GCTGTCTCTG TCGACTTGGA GCCCGGTACC ATGGACCCG TCCGCGCTGG TCCCTTCGGT
361 CAGCTCTTCC GTCCCGACAA CTTTGTTTTT GGTCAAGTCCG GTGCTGG

```

Б

```

1 TCAGTTCAAG GGCACCATCG AGGTCGACGG CTCGACCTC GTCGTCAACG GCAAGCGCGT
61 CAAGTTCTAC CAGGAGCGTG ACCCCGCCAA CATCAAGTGG TCCGAGACTG GTGCTGAGTA
121 CATTTGTCGAG TCCACCGGTG TCTTACCAC CACCGAGAAG GCCTCTGCTC ACTTGAAGGG
181 TGGCGCCAAG AAGGTCGTCA TCTCTGCTCC TTCCGCCGAT GCTCCTGTCA GTCCGCTCTC
241 CCCGGTCTTT TTTTGGTCTC TTGGACTAAC GTATCTAGAT GTTCGTCAAT GGTGTCAACC
301 ACGAGACCTA CAAGAGCGAA AACACCATCA TCTCCAACGC TTCTTGACAC ACCAACTGCT
361 TGGCTCCTCT CGCCAAGATC GTCACGACA ACTGGGGTCT CGTTGAGGGT CTCATGACCA
421 CCATCCACTC CTACACTGCC ACCAGAAGA CCGTCGATGG TCCCTCCGCC AAGGACTGGC
481 GTGGTGGTCTG TACCGCTG

```

В

Рисунок 10 – Нуклеотидные последовательности фрагментов генов *actA* (А), *tub2* (Б) и *gpdA* (В) *P. verruculosum*. Последовательности интронов выделены синим цветом

Сравнение нуклеотидных последовательностей ПЦР-фрагментов референсных генов с базой данных NCBI Nucleotide collection (nr/nt) показало, что полученные ПЦР-фрагменты имеют гомологию более 90% с генами актина, β -тубулина и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы различных видов грибов родов *Penicillium* и *Talaromyces*, и, следовательно, могут быть использованы для нормирования данных, полученных при проведении количественной ПЦР в реальном времени [7].

4.2.5 Количественная ПЦР

Для измерения уровня транскрипции изучаемых генов методом количественной ПЦР по 1 мкг РНК из выделенных образцов обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fischer Scientific, США). Затем, по 3 мкл РНК, обработанной таким образом, использовалось для синтеза первой цепи кДНК с помощью набора RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fischer

Scientific, США). В качестве праймеров для обратной транскрипции использовалась равная смесь Random hexamer primer и Oligo (dT)₁₈ primer (Thermo Fischer Scientific, США). По завершении реакции обратной транскрипции пробы разбавляли добавлением 350 мкл дистиллированной воды [7].

Все пробы наносили в трех повторениях. Для сравнения C_q (количество циклов, необходимое для того, чтобы флуоресценция достигла порогового уровня над шумом) в различных плашках, одинаковые образцы в трех повторениях наносились в каждую плашку для каждого гена [7].

ПЦР в реальном времени проводилась по следующей программе: 1 стадия – 5 мин при 95 °С, 2 стадия – (15 сек при 95 °С, 45 сек при 60 °С) 39 циклов, с измерением флуоресценции после каждого цикла, 3 стадия - увеличение температуры от при 75 до 95 °С с шагом 0.2 °С за 10 сек с измерением флуоресценции. На этапе 3 определялась кривая температуры плавления продуктов ПЦР [7].

Реакционная смесь для ПЦР в реальном времени содержала по 10 пмоль прямого и обратного праймеров на анализируемый ген или на один из референсных генов. актина (*actA*), глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (*gpdA*) или β-тубулина (*tub2*) *P. verruculosum* (Таблица 4), 8 мкл 2.5× реакционной смеси для ПЦР в реальном времени с красителем EVA Green (Синтол, Россия), 10 мкл кДНК исследуемого образца и дистиллированной воды до 20 мкл [7].

Таблица 4 – Праймеры использованные для количественной ПЦР [7].

Ген	Название праймера	Структура олигонуклеотида 5' → 3'
<i>actA</i>	PVACTQD1	acaagaaatccagaccgctccc
	PVACTQR1	tttcgagaccgatgacggaagg
<i>tub2</i>	PVBENQD1	gcttccggcaacaatatgtccc
	PVBENQR1	ccggactgaccgaaaacaagtgtg
<i>gpdA</i>	PVGPDQD2	aacggcaagcgcgtcaagtct
	PVGPDQR2	acccttcaagtgagcagaggcctt
<i>cbh1</i>	PVCBHQD2	caacatgggcgctgctctcaaa
	PVCBHR2	gaagttgtagggcaggaaccacga
<i>bgl1 (A. niger)</i>	ANBGLQD1	ccaatgtaccgctattctctgggg
	ANBGLQR1	aatcttgtaggcctcacgagtcttg
<i>xyIA (P. canescens)</i>	PCXYLQD2	ctgcgcaacagcgtcttctacaa
	PCXYLQR2	tgaggggattgcagagcttcaac

Амплификация проводилась на приборе CFX96 (Bio-Rad, США) в белых 96-луночных низкопрофильных плашках. Для анализа результатов было использовано ПО «Bio-Rad CFX Manager v. 3.1».

Для получения калибровочных кривых эффективности амплификации генов *actA*, *tub2*, *gpdA*, *cbh1* в качестве матрицы использовали плазмиды, содержащие фрагменты референсных генов *P. verruculosum* (структуры плазмид не представлены), и полученные ранее плазмиды с генами *cbh1 P. verruculosum* [7]. Значения эффективности амплификации генов и их достоверности, полученные с использованием ПО Bio-Rad CFX Manager v.3.1 приводятся (Таблица 5). Праймеры подобранные для количественной ПЦР в реальном времени, в подобранных условиях ПЦР, обеспечивают эффективную (96,7–97,4%,) амплификацию всех генов (как референсных, так и целевых) с высокой (0,995–0,999) достоверностью [7].

Таблица 5 – Эффективность амплификации генов при количественной ПЦР [7].

Ген	Эффективность амплификации, (%)	Достоверность (R^2)
<i>actA (P. verruculosum)</i>	97,4	0,994
<i>cbh1 (P. verruculosum)</i>	96,7	0,998
<i>gpdA (P. verruculosum)</i>	97,1	0,995
<i>tub2 (P. verruculosum)</i>	96,7	0,998
<i>bgl1 (A. niger)</i>	96,7	0,999
<i>xylA (P. canescens)</i>	96,7	0,997

4.2.6 Выделение РНК

Для выделения РНК мицелий осаждали из 1,2 мл суспензии в 2 мл пробирках с 200 мкл стеклянных шариков диаметром 0.425-0.600 мм. Центрифугирование пробирок проводили в течении 10 мин при 5000g, после чего сливали супернатант. К мицелию с шариками добавляли 250 мкл 2х буфера SES (1 М NaCl, 0,02 М ЭДТА, 0,2% додецилсульфата натрия) и 500 мкл водонасыщенного фенола, после чего мицелий разрушали на гомогенизаторе FastPrep-24 (MP Biomedicals, США) (3 раза по 25 сек при максимальной мощности с промежуточным охлаждением образцов во льду), и центрифугировали в течении 10 мин при 13000 об/мин.

Далее отбирали супернатант, добавляли 250 мкл фенола и 250 мкл хлороформа с добавлением изоамилового спирта, после чего перемешивали на вортексе, и далее смесь разделяли центрифугированием в течение 10 мин при 13000 об/мин. Полученный супернатант переносили в 1,5 мл пробирки и добавляли 1/10 объема 3М NaOAc pH 5.2 и 1 объем изопропанола, перемешивали и инкубировали 12 часов при - 20°C. Затем РНК осаждали

центрифугированием в течение 15 мин при 13000 об/мин., после чего удаляли супернатант. Осадок промывали 70% этанолом, растворяли в 200 мкл дистиллированной воды и добавляли 1 объем 4М LiCl. Раствор перемешивали, инкубировали 60 мин при -20°C , после чего центрифугировали в течение 15 мин при 13000 об/мин.. Удаляли супернатант, осадок промывали 70% этанолом и подсушивали, после чего растворяли в 50 мкл дистиллированной воды.

Концентрацию РНК определяли на приборе NanoDrop Lite (Thermo Scientific, США), после чего по 0,5 мкг образца РНК анализировали с помощью гель-электрофореза в 1% агарозном геле в буфере трис-ацетатном буфере для подтверждения качества РНК.

4.2.7 Трансформация грибных штаммов

Трансформация штамма *P. verruculosum* B1-221-151 ($niaD^+$) плазмидами p5SniaD и pGPDCas9 или p5SniaD и pGCnnn для геномного редактирования проводилась по модифицированной методике [158]. Для этого на среде МС в течение двух суток выращивали мицелий, после чего биомассу отделяли от КЖ фильтрованием на воронке Бюхнера, промывали водой и буфером РВТ. Отфильтрованный мицелий ресуспендировали в 3 мл буфера РВТ и добавляли лизирующий фермент *T. harzianum* (Sigma, США) (10/мг/мл) и бычий сывороточный альбумин (Sigma) (2 мг/мл). Полученную смесь инкубировали на орбитальной качалке при 32°C 2 часа при 200 об/мин. После инкубации смесь пропускали через стеклянный фильтр с размером пор ПС-1. К полученному фильтрату добавляли 2 объема буфера ST, и центрифугировали суспензию при 4000 об/мин и 8°C 20 мин. Полученный осадок ресуспендировали в буфере SCT и подсчитывали число трансформантов в камере Горяева. На одну трансформацию использовали $3 \cdot 10^7$ протопластов в объеме 200 мкл буфера SCT. К суспензии протопластов добавляли 1 мкг плазмиды p5SniaD и 2 мкг плазмиды pGCnnn. После внесения плазмид в суспензию добавляли 50 мкл буфера PCT, оставляли смесь на 20 мин при 4°C после чего добавляли ещё 500 мкл буфера PCT и далее центрифугировали смесь 15 мин при 5000 об/мин при комнатной температуре. Осевшие трансформанты ресуспендировали в 200 мкл 1,2 М раствора сорбитола и переносили в пробирки с 2 мл верхнего агара со средой МС с 1% агарозы, перемешивали и разливали на чашки Петри на среду МС, содержащую 0,6 М хлората натрия, в качестве селективного агента и хлорид аммония как источник азота для трансформантов с нокаутом гена нитратредуктазы.

Трансформация штаммов *P. verruculosum* B1-537 ($\Delta niaD$) и *P. verruculosum* B1-2743 ($\Delta niaD$), *P. verruculosum* $\Delta tacA \Delta niaD$ всеми использованными для этого плазмидами проводилась совместно с плазмидой pSTA-10 (10 и 1 мкг, соответственно) по модифицированной методике [158]. Плазмида pSTA-10, несущая ген нитратредуктазы была необходима для обеспечения прототрофности получаемых трансформантов, что даёт возможность проводить их отбор на среде МС, содержащей нитрат натрия в качестве источника азота.

Состав ST-буфера: сорбитол - 0,6 М, трис-НСl (рН 7,0) - 0,01 М;

Состав SCT-буфера: сорбитол - 0,6 М, трис-НСl (рН 7,0) - 0,01М; CaCl₂ - 0,02 М;

Состав PCT-буфера: ПЭГ 6000 – 50%, трис-НСl (рН 7,5) - 0,01М; CaCl₂ - 0,02 М;

4.2.8 Определение внутриклеточной локализации химерного белка Cas9-GFP

Штамм *P. verruculosum* В1-537 трансформировался плазмидой pGpdCas9GFP. Трансформанты были проверены на присутствие плазмиды методом ПЦР с использованием праймеров NlsCasD и GFPTCbhR. Отобранные трансформанты культивировались на среде МС до образования спор. Далее полученными спорами засеивались 2 мл пробирки с 1 мл минимальной среды МС. Споры проращивались 20 часов при 32 °С. Перед нанесением на предметные стёкла проросший мицелий концентрировался на дне пробирки центрифугированием 5 мин при 4000 об/мин, 900 мкл среды отбиралось из верхней части пробирки, а из оставшихся 100 мкл, отбирали 10 мкл и помещали на предметные стёкла для приготовления препарата типа «раздавленная капля». Микроскопирование проводили при 100х увеличении на флуорисцентном микроскопе Axiscope 40 (Carl Zeiss, Германия) с использованием ртутной лампы [159].

4.2.9 Конструирование плазмиды для экспрессии глюкозооксидазы *A. niger*

Ген *goxA* (GenBank X16061.1), кодирующий глюкозооксидазу (GOX), был клонирован в вектор pUC-SBHI LIC методом, как было описано ранее [160, 161]. Для этого ген *gox* амплифицировали с геномной ДНК *A. niger* с использованием праймеров GOX_CBHISS-LIC5 и GOX_CBHISS-LIC3 (Таблица 8). Очищенный ПЦР-продукт обрабатывался ДНК-полимеразой Т4 в присутствии подходящего dNTP для создания специфических вектор-совместимых липких концов. Затем подготовленный таким образом ПЦР-продукт лигировали в обработанный вектор pUC-SBHI. Для этого 50 нг вектора смешивали со 150 нг вставки и инкубировали смесь 30 мин при комнатной температуре, после чего трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамм XL1-Blue методом теплового шока [162]. Полученная таким образом плазида была названа

Таблица 6 – Праймеры использованные для амплификации гена *gox A. niger*.

Название	Структура олигонуклеотида 5' → 3'
GOX_CBHISS-LIC5	ggcaacagcaggagctctgccacactacatcaggagcaatg
GOX_CBHISS-LIC3	agaggagggcgacacagtcactgcatggaagcataatctcca

4.2.10 Определение индукторов транскрипции гена *cbh1 P. verruculosum*

Для наращивания биомассы споровая суспензия штамма *P. verruculosum* В1-221-151 высевалась в количестве 3*10⁶ спор в 750-мл колбу Эрленмейера со 100 мл жидкой среды MM, содержащей 0,8% глюкозы и цитрат-фосфатного буфера (для предотвращения осмотического

шока на последующей стадии), также 10 мМ NaNO₃ в качестве источника азота, и инкубировали на орбитальной качалке (220 об/мин) при 32 °С в течении 48 ч [163].

Далее для удаления глюкозы мицелий отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при ускорении 4000 g в течении 12 мин, потом дважды промывали центрифугированием при тех же условиях со средой МС с цитрат-фосфатным буфером и 10 мМ NaNO₃; полученный осадок ресуспендировали в той же среде в трехкратном объеме от объема осадка, после чего по 4-миллилитра суспензии переносили в 9 стеклянных пробирок диаметром 20 мм. Затем пробирки с суспензией мицелия инкубировались на орбитальной качалке при тех же условиях для утилизации остатков глюкозы и выключения механизма УКР [163].

После 45 мин инкубации в пробирки добавлялось по 1 мл 10 мМ раствора сахаров: ксилозы, целлобиозы, лактозы, софорозы, гентиобиозы, трегалозы, целлоолигосахаридов (степень полимеризации (СП) 2–3) (ЦОС 2-3) или 1 мл 5 мМ ксилоолигосахаридов (СП 3–5) (КОС 3–5), — растворенных в среде МС с цитрат-фосфатным буфером вместо воды и 10 мМ NaNO₃, в контрольную пробирку добавлялся 1 мл этой среды без сахаров. После этого пробирки инкубировались на орбитальной качалке в тех же условиях с отбором по 1, 2 мл культуральной жидкости через 1ч 15 мин, 3 и 5 ч, из каждой пробирки. Из отобранных проб выделялась РНК, в которой определялось количество копий мРНК гена *cbh1* методом количественной ПЦР [163].

Использованные в эксперименте ЦОС и КОС со степенью полимеризации 2–3 и 3–5, соответственно, получались ограниченным ферментативным гидролизом микрокристаллической МКЦ и ксилана березы. Для гидролиза МКЦ использовался ферментный препарат ЕЕ-105 с концентрацией 0,5 мг/мл (*P. verruculosum* ЕЕ-105, ВКМ F-4812D), содержащего ЭГ2 *P. verruculosum*, ЭГ1 *T. reesei*, а также ЦБГ1 и ЦБГ2 *P. verruculosum*. Для обработки ксилана березы использовался раствор ферментного препарата *P. canescens* RN 3-11, содержащего эндоксилазу А. После отделения нерастворимых компонентов реакционной смеси продукты частичного гидролиза МКЦ и ксилана разделялись с использованием хроматографической колонки с носителем Bio-Gel P2 (Bio-Rad, США) [163].

4.2.11 Культивирование штаммов *P. verruculosum* в колбах

Штаммы *P. verruculosum* культивировались в колбах Эрленмейера объемом 750 мл в течение шести суток при 32°С, с перемешиванием при скорости 220 об/мин в 100 мл среды СФС для колб. Образцы КЖ осаждались центрифугированием при 4000 об/мин, в течение 10 мин. Полученные супернатанты использовались для измерения активности ферментов и проведения ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях.

4.2.12 Культивирования штаммов *P. verruculosum* на ферментационной установке

Культивирование штаммов *P. verruculosum* проводили на ферментационной установке КФ-104/3 (ООО «Проинтех», Россия), содержащей четыре 3-х литровых ферментера, имеющих

барботёры и мешалки, а также устройства рН- и термостатирования. Управление процессом осуществляли с помощью программы Lonet (ООО «Проинтек», Россия).

Ферментацию проводили при температуре 32 °С, рН 4,75±0,25, парциальном давлении кислорода (pO₂) на уровне 30% от насыщения и расходе воздуха 0,5 л/мин.

Инокулят выращивали в колбах Эрленмейера объемом 750 мл в 100 мл среды для инокулята в течение 48 часов при 30°C и перемешивании со скоростью 220 об/мин. Полученным инокулятом засеивали ферментёр со средой СФС для ферментёра. Культивирование проводилось в течение 144 часов. В процессе культивирования в ферментёр раз в сутки вносили подпитки начиная с 48 часа и до 120 часов.

После окончания ферментации КЖ осаждали центрифугированием при 6000 об/мин в течение 20 мин. Полученные супернатанты использовали для измерения активности ферментов и проведения ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях.

4.2.13 Определение концентрации белка

Концентрацию белка в культуральных жидкостях определялась методом Лоури [164]. Измерение оптической плотности проводилось на спектрофотометре «Varian Cary 50 UV-Vis» (Agilent Technologies, США). В качестве стандарта использовался бычий сывороточный альбумин (Merck KGaA, Германия).

4.2.14 ПААГ-электрофорез в денатурирующих условиях

Электрофорез КЖ проводили в денатурирующих условиях по методике Лэммли [165] с модификациями. Для электрофореза использовалась камера Mini Protein II (Bio-Rad Laboratories, США). В качестве маркеров использовался Unstained Protein MW Marker #26610 (Thermo Fisher Scientific, США). Белки в ПААГ окрашивались красителем Кумасси G-250 или R-250 (Ferak, Германия).

4.2.15 Масс-спектрометрический анализ

Фрагменты белковых полос площадью ~2 мм² вырезались из полиакриламидного геля. Далее проводился трипсинолиз белков, после чего пептиды экстрагировались 20% ацетонитрилом и 0,1% трифторуксусной кислотой [166]. MALDI-TOF масс-спектрометрия пептидов проводилась в центре коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» ФИЦ Биотехнологии РАН на приборе «UltraflexXtreme» (Bruker Daltonik GmbH, Германия) Идентификация белков проводилась методом пептидного картирования с помощью онлайн службы MASCOT (<http://www.matrixscience.com>).

4.2.16 Определение ферментативных активностей

Ферментативные активности по ксилану и карбоксиметицеллюлозе (КМЦ) субстратам определяли по начальным скоростям образования восстанавливающих сахаров (ВС) (за 5-10 мин ферментативной реакции) методом Шомоди-Нельсона [166, 167] из соответствующего субстрата

(10 г/л) при pH 5,0 (0,1 М Na-ацетатный буфер) и температуре 50 °С. Авицелазную активность определяли, анализируя ВС [167, 168], образовавшиеся через 60 мин ферментативной реакции с микрокристаллической целлюлозой (МКЦ) (10 г/л) при pH 5,0 и температуре 40 °С

β -глюкозидазную и β -лактозидазную активности определяли по гидролизу *para*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозиды (*n*НФГ) и *para*-нитрофенил- β -лактопиранозиды соответственно при pH 5,0 и температуре 40 °С. Аликвоту (0,05 мл) запасного раствора субстрата (10 мМ) смешивали с 0,85 мл 0,1 М Na-ацетатного буфера, смесь предварительно прогревали при 40°C в течение 5 мин и далее начинали ферментативную реакцию внесением 0,1 мл предварительно разбавленного и раствора фермента. Через 10 мин инкубации смеси реакцию останавливали, добавлением 0,5 мл 1 М раствора Na₂CO₃. Далее на спектрофотометре измеряли поглощение раствора при 400 нм против кюветы с контрольным раствором субстрата, приготовленный точно так же, но с 0,1 мл ацетатного буфера вместо раствора фермента. Количество выделившегося *n*-нитрофенола (*n*-НФ) рассчитывали, используя его коэффициент экстинкции ($\lambda_{400} = 18300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [169].

Во всех случаях за единицу активности принимали количество фермента, которое приводит к гидролизу 1 мкмоль гликозидных связей либо к образованию 1 мкмоль продукта (ВС или *n*-НФ) в 1 мин при указанных условиях реакции.

Определение активности глюкозооксидазы в культуральных жидкостях проводилось с небольшими изменениями по методике Bergmeyer и др. [170]. Для этого 0,1 мл раствора фермента добавляли к реакционной смеси, содержащей 0,7 мл 12,5% раствора глюкозы в 0,1 М Na-фосфатном буфере (pH 7,0), 0,1 мл 0,066% раствора *o*-дианизидина и 0,1 мл раствора пероксидазы. (0,05 Ед/мл). Далее кинетику изменения окраски раствора измеряли при длине волны 436 нм. Активность рассчитывалась по формуле:

$$A = (\Delta D_{(436)} / \Delta t_{(\text{минуты})}) * (V_{\text{pc}} / V_{\text{ф}}) * (1 / E_{\text{m}}) * P_{\text{ф}} = (\Delta D_{(436)} / \Delta t_{(\text{минуты})}) * (Re / 0,83),$$

где V_{pc} - объем реакционной смеси (1 мл), $V_{\text{ф}}$ - объем раствора фермента (0,1 мл), E_{m} - коэффициент молярной экстинкции продукта реакции окисления *o*-дианизидина (8,3 мМ-1см-1), $P_{\text{ф}}$ - разведение фермента. Анализы активности ферментов проводили в трех экземплярах. Все измерения проводились в трёх повторностях.

4.2.17 Хроматографический анализ ферментных препаратов

Ферментные препараты предварительно осаждали сульфатом аммония (80% насыщения при 25 °С). После этого их растворяли в стартовом буфере (0,02 М Bis-Tris/HCl, pH 6,8) и обессоливали на колонке P2 Bio-Gel (Bio-Rad Laboratories, США) на жидкостном хроматографе АКТА Purifier 100 (GE Healthcare, США), после чего элюировали стартовым буфером при скорости потока 0,8 мл/мин.

Для анионообменной хроматографии использовалась колонка Source 15Q HR 16/5 (Pharmacia, Швеция). Образец, содержащий 5 мг белка, наносили на колонку, уравновешенную тем же стартовым буфером. Белок, связанный с носителем, элюировали линейно возрастающим градиентом NaCl от 0 до 0,4 М со скоростью потока 0,8 мл/мин (объем градиента 50 мл). В собранных фракциях определяли ферментативную активность. Составы ФП определяли в соответствии с активностью, измеренной в собранных фракциях, и рассчитывали по соответствующим площадям хроматографических пиков.

4.2.18 Клонирование генов транскрипционных факторов *xlnR*, *clr1*, *clr2* и *tacA*

В *T. marneffeii* были найдены нуклеотидные последовательности гомологов XlnR, Clr1, Clr2 (GenBank AN: XP_002145389.1, XP_002147949.1, XP_002151678.1), последовательности кодирующие данные белки (GenBank AN: NW_002196661.1, NW_002196663.1, NW_002196666.1). Последовательность гена *tacA* (GenBank AN: LC012352.1) была взята у гриба *T. pinophilus*. Кодирующие области нуклеотидных последовательностей были выровнены с 8-10 ближайшими гомологами из базы «wgs» родов *Talaromyces* и *Penicillium* программой AlignX (VNTI v.10.0) (Invitrogen, США). На консервативные участки генов выбраны праймеры (Таблица 7).

Таблица 7 – Праймеры использованные для клонирования внутренних фрагментов генов *clr1*, *clr2*, *xlnR* и *tacA P. verruculosum*.

Название	Структура олигонуклеотида 5' → 3'
CLR1D1	tgatcataagcacattacatcgattga(g/a)ac
CLR1D2	catgtcttcgaggcagtgga(g/a)gc
CLR1D3	cacttgattctggtgc(a/c)atgcttaatagagc
CLR1D4	atgaatgggaagg(t/c)ga(c/t)atgaagtccag
CLR1R1	ctctattaagcat(g/t)gcaccagaatcaagtgg
CLR1R2	ctggacttcat(a/g)tc(g/a)ccttcccattcat
CLR1R3	tgcgccattcttcgactgttt(g/a)tg
CLR1R4	agattcg(g/a)tagcgggctcgaagcat
CLR2D1	cgagcatgcattcatgccgtca
CLR2D2	ggaagcatcaccgc(a/t/c)gcaggcgt
CLR2D3	ctctccaatggtggaaca(t/c)ctccc
CLR2D4	cagtcatgcgatggcgcttcta(c/t)aa
CLR2R1	gggagattgtccaccattggag(g/c)ag

CLR2R2	tgtagaagcgccatcgcatgactgt
XLNRD1	gcaaaccactttac(t/c)gg(c/a)ctcac
XLNRD2	ctgggtagcagc(t/a)cagactag(c/t)ga
XLNRR1	g(a/g)tccatcacgta(a/g)agaagccacca
XLNRR2	ggtt(a/t)cgcgcatgattca(a/g)atcgac
PVtacAD	tcctcttcaaaagtctgccagaa(g/a)ca
PVtacAR	tcatgtcggcactcggagg(t/a)tg

С использованием различных сочетаний прямых и обратных праймеров были получены ПЦР-фрагменты для каждого гена (Таблица 8).

Таблица 8 – Размеры полученных ПЦР-фрагментов фрагментов генов *xlnR*, *clr1* и *clr2* *P. verruculosum*.

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Размер фрагмента, п.о.
<i>clr1</i>	CLR1D1	CLR1R1	~ 950
<i>clr1</i>	CLR1D4	CLR1R4	~ 600
<i>clr2</i>	CLR2D1	CLR2R2	~ 1500
<i>clr2</i>	CLR2D2	CLR2R2	~ 700
<i>xlnR</i>	XLNRD1	XLNRR1	~ 1000
<i>xlnR</i>	XLNRD1	XLNRR2	~ 800
<i>tacA</i>	PVtacAD	PVtacAR	~ 1800

Полученные ПЦР-фрагменты кодирующих областей генов секвенировались с праймеров, использованных для ПЦР. Анализ хроматограмм показал, что все полученные фрагменты ДНК гомологичны искомым последовательностям.

Для клонирования 5' и 3' фланкирующих областей генов был использован метод «прогулки по неклонированной ДНК» [170]. На секвенированные ранее последовательности кодирующих областей генов были подобраны праймеры (Таблица 9).

Таблица 9 – Праймеры для «прогулки» по 5' - и 3' -фланкирующим областям генов *clr1*, *clr2*, *xlnR* *P. verruculosum*.

Ген	Название	Структура олигонуклеотида 5' → 3'
<i>clr1</i>	CLR1CD1	acccttcgaagagttagctgacacgctcca
	CLR1CR1	cgaagttgaggttcgtggtgtgccggttat
	CLR1CD2	ttgtctcttgaagacaacgttcccatcca
	CLR1CR2	cgagcgggtcatcgtttaatgtggtgtctga
<i>clr2</i>	CLR2CD1	tgagctttctcaatctcaaaaccctcggca
	CLR2CR1	gattgagcagttccgtgtgtgtagggctcg
	CLR2CD2	tggtactgccactacatcagccagcccaat
	CLR2CR2	gattcctggatcttggaggcgattttgatg

<i>xlnR</i>	XLNRCR1	tgcatgtgcgaggttggtttgatgtagga
	XLNRCR2	gcggatgtgctggcaaagtaaagatcaaga
	XLNRCD1	ctaccggagcagtcgatgatgttgccacat
	XLNRCD2	aaagccatgaccgagatggcaatgtcgaga
<i>tacA</i>	TACCD1	gactttcaactcttcccgtctgccgatctc
	TACCD2	agtctggatcctgttcctcattcgcagacc
	TACCR1	ggttgaggttttggagaagagttggagggag
	TACCR2	aagggaagacatacgtggttggtggtg

С помощью данных праймеров были получены 5'- и 3'- фланкирующие области соответствующих генов (Таблица 10)

Таблица 10 – ПЦР-фрагменты, полученные в результате амплификации 5'- и 3'- фланкирующих областей генов *clr1*, *clr2*, *xlnR* *P. verruculosum* с использованием праймера AP2 и ген-специфичных праймеров.

Ген	Область	Название фрагмента	Длина, п.н.	Праймер для секвенирования
<i>clr1</i>	3`	C1D4	~ 3500	CLR1CD2
	5`	C1R4	~ 2700	CLR1CR2
<i>clr2</i>	3`	C2D3	~ 1600	CLR2CD2
	5`	C2R4	~ 3700	CLR2CR2
<i>xlnR</i>	3`	XD2	~ 3500	XLNRCD2
	5`	XR1	~ 2200	XLNRCR2
<i>tacA</i>	3`	TD1	~ 1200	TACCD1
	5`	TD2	~ 1000	TACCR2

Полученные в результате «прогулки» по 5'- и 3'- фланкирующим областям ПЦР-фрагменты генов *clr1*, *clr2*, *xlnR*, *tacA* *P. verruculosum* далее секвенировались с праймера AP2 и ген-специфичных праймеров. На секвенированные последовательности были выбраны праймеры, которые использовались для дальнейшего секвенирования фланкирующих фрагментов генов *clr1*, *clr2*, *xlnR* *P. verruculosum* (Таблица 11).

Таблица 11 – Праймеры для для дальнейшего секвенирования фланкирующих фрагментов C1D4, C1R4, C2D3, C2R4, XD2, XR1 генов *clr1*, *clr2*, *xlnR* *P. verruculosum*.

Название фрагмента	Название праймера	Структура олигонуклеотида 5'→3'
C1D4	CLR1SD1	cgagaatcgtctcgtacatcactgtg
C1R4	CLR1SR1	acaccacgaacctcaacttcgct
C2D3	CLR2SD1	gagccccagagtctggacgactt
C2R4	CLR2SR1	ttccaactcttcaatggtgga

XD2	XLNRSD1	ccttcgcagcagcttctgcaatat
XR1	XLNRSR1	aacgagtcgctaataatgcagacgaaa

Вновь секвенированные последовательности были снова использованы для подбора праймеров для секвенирования (Таблица 12).

Таблица 12 – праймеры для секвенирования C1R4, C2D3, C2R4, XD2, XR1 генов *clr1*, *clr2*, *xlnR* *P. verruculosum*.

Название фрагмента	Название праймера	Структура олигонуклеотида 5' → 3'
C1R4	CLR1SR2	gatcgtggtggaaaacccatggt
C2D3	CLR2SD2	ttggattggaccgctactaccgct
C2R4	CLR2SR2	gcgagacatgtgtttctacagacg
XR1	XLNRSD2	gttggtcgggtaagcgtga
	XLNRSD3	ccagtgaagtggacttcggttaag
XD2	XLNRSR2	gcctcggattctgatgccatc

4.2.19 Клонирование фрагмента гена *niaD* *P. verruculosum*

Консервативные области гена *niaD* *P. verruculosum* были определены путем выравнивания следующих полногеномных последовательностей из GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) для родов *Penicillium* и *Talaromyces*: (NW_002196662.1: 1674201-1676795 *P. marneffeii* ATCC 18224, NW_002990114.1: 2133873-2135800 *T. stipitatus* ATCC 10500, NW_017971432.1: 2233740-2236407 *T. atrovirens*, штамм IBT 11181). Пара праймеров *niaDF252* ttcaatgt(t/c)ga(a/g)cctccactgac и *niaDR698* tccatgaccagttgag(c/t)tt(g/c)ac была выбрана для консервативных областей, чтобы амплифицировать фрагмент гена *niaD* с приблизительной длиной 450 п.о.

4.2.20 Получение плазмид для редактирования генома *P. verruculosum* системой CRISPR-Cas9

Плазмида pGpdCas9GFP для конститутивной экспрессии гена химерного белка Cas9::eGFP была получена из исходной плазмиды pSpCas9(BB)-2AGFP (addgene plasmid #48138), содержащей бактериальный ген *cas9* *Streptococcus pyogenes* адаптированный к экспрессии в дрожжах *Pichia pastoris*, которая была получена от профессора О. Geliadi (Structural Genomic Consortium, SGC, Oxford, UK). Для этого промотор гена *gpdA* *P. verruculosum*, длиной около 900 п.н., был амплифицирован с использованием прямого праймера GpdNdeF, с введенным на 5'-конце сайтом рестрикции *NdeI*, и обратного праймера GpdNLS1, 3'-область которого была обратно комплементарна 3'-концу промотора гена *gpdA*, а 5'- область – началу NLS SV40 (Таблица 15). Геномная ДНК *P. verruculosum* была использована в качестве матрицы. Далее ген

Spcas9:eGFP с NLS SV40 на 5` конце и *cas9 S. pyogenes* был амплифицирован с использованием праймеров NLSCasD и GFPTCbhR (Таблица 13) и плазмиды pSpCas9(BB)-2AGFP в качестве матрицы. Терминатор *cbh1* был амплифицирован с помощью праймеров TCbhGFPF и TCbhBamR и матрицы геномной ДНК *P. verruculosum*. Полученные ПЦР-фрагменты были очищены и использовались для «перекрывающейся» ПЦР, после чего ПЦР-продукт был клонирован в вектор pUC18 (addgene plasmid #50004) по рестрикционным сайтам *NdeI* и *BamHI* [159].

Таблица 13 – Олигонуклеотиды использованные для получения плазмид системы CRISPR/Cas [159, 172].

Название	Структура олигонуклеотида 5'→3'
CasGFPSD1	cgacagcttctccacagactg
CasGFPSD2	caacctgctggcccagatc
CasGFPSD3	ccgcatcccctactacgtgg
CasGFPSD4	ccctgacactgttgaggacag
CasGFPSD5	ccgtggaaaacaccagct
CasGFPSD6	caaagtgcgcgagatcaaca
CasGFPSD7	ggtggccaaagtggaaaagg
CasGFPSR1	gtccacgatgtgccgaag
NlsCasD	tcaccgcaatcatgccaaagaagaagcggaaggtcggt
GpdNdeF	gatccatatgcgactcagacctggatcgg
GpdNLS1	ttcttcttgcatgattgcggtgatagttgc
GFPTCbhR	acacagtcagaattcctgtacagctcgtcc
TCbhGFPF	gagctgtacaaggaattctgactgtgcgccctcctctag
TCbhBamR	aattcggatccgatccaccttac
CasStopD2	ggccaggcaaaaaaagaaaagtaattctgactgtgtcg
CasStopR2	cgacacagtcagaattacttttcttttgcctggcc
5SAn160HindIIIF	atcgcaagcttggatttctcaccaccagataagcc
5SAnR	ttctgtcctttcatacaacagaagggttcgctggt
sgRNAF	cgaatcccttctgtgtatg
sgRNABamHIR	acactggatccaaaaagcaccgactcg

Плазмида pGpdCas9, содержащая ген *cas9 S. pyogenes*, фланкированный NLS вируса SV40 в начале, NLS гена нуклеоплазмидина в конце была получена вырезанием гена eGFP из плазмиды pGpdCas9GFP с помощью «обратной» ПЦР, с использованием прямого праймера CasStopD2 (Таблица 13) , 5` область которого была комплементарна концу NLS нуклеоплазмидина с

введенным стоп кодоном, а 3` область – началу терминатора транскрипции гена *cbh1* *P.verruculosum*, и обратного праймера CasStopR2 (Таблица 13), комплементарного прямому праймеру. Продукт ПЦР был трансформирован в клетки *E. coli*. Из выросших клонов была выделена плазмидная ДНК, и после скрининга по размеру, была проверена на правильность сборки и отсутствие мутаций секвенированием с праймеров CasGFPSR1, CasGFPSD1, CasGFPSD2, CasGFPSD3, CasGFPSD4, CasGFPSD5, CasGFPSD6 и CasGFPSD7 (Таблица 13) [159].

Для получения плазмиды p5SniaD промотор 5S рРНК и кодирующая последовательность 5S рРНК были амплифицированы из геномной ДНК *A. niger* с использованием праймеров 5SAn160HindIII и 5SAnR (Таблица 13), разработанных в соответствии с [153]. Кодирующая последовательность sgRNA с линкером и спейсером на 5'-конце была синтезирована и клонирована в вектор pAL2-T компанией «ЕВРОГЕН» (Россия). sgRNA амплифицировали с использованием праймеров sgRNAF и sgRNABamHIR (Таблица 9), разработанных в соответствии с [153]. Полученные ПЦР-продукты использовали для перекрывающейся ПЦР с праймерами 5SAn160HindIII и sgRNABamHIR (Таблица 13). После этого, амплифицированный фрагмент был клонирован по сайтам рестрикции *HindIII* и *BamHI* в плазмиду pBluescript SK II (+) [172].

Плазмиды pGCC1, pGCCR1, pGCCR2, pGCX, pGCT были получены путём лигирования по рестрикционным сайтам *BamHI* и *Sall* в плазмиду pGpdCas9 фрагментов, кодирующих sgRNA со спейсерами для нокаутов гена соответствующих генов из плазмид серии p5Snnn (p5Scbh1, p5Sclr1, p5Sclr2, p5SxlnR, p5StacA соответственно) (Рисунок 11) которые были получены из плазмиды p5SniaD в результате замен последовательности спейсера sgRNA с помощью ПЦР-мутагенеза с использованием соответствующих пар праймеров (Таблица 14).

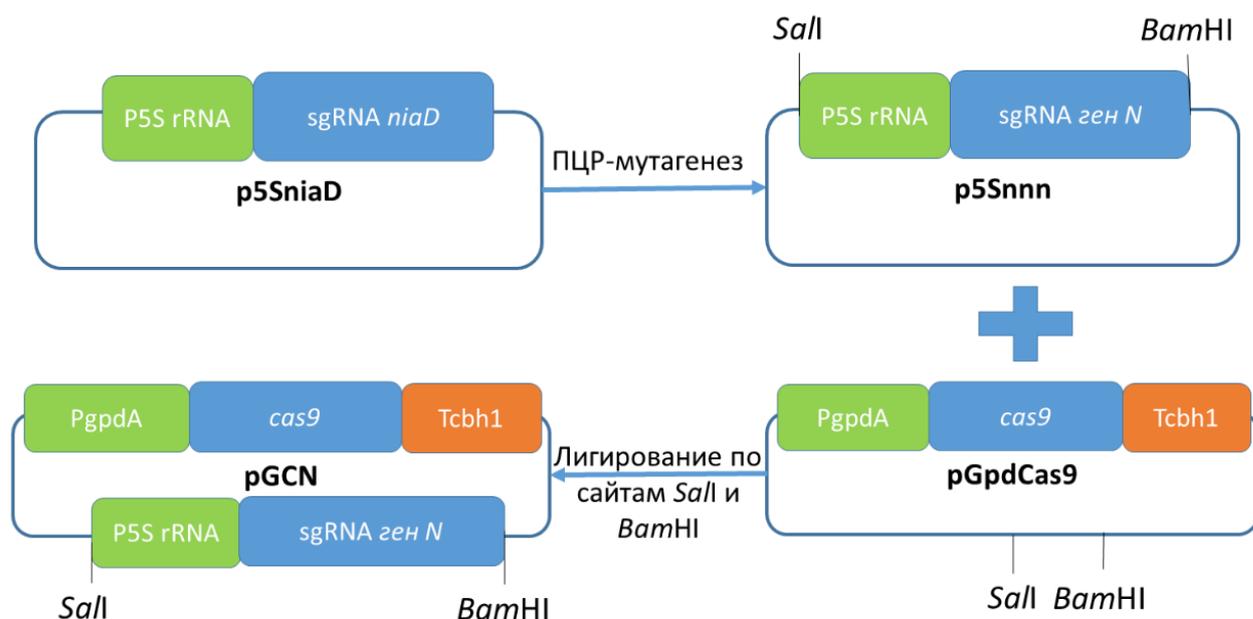


Рисунок 11 – Схема получения плазмид для нокаута целевых генов системой CRISPR-Cas9

Таблица 14 – Олигонуклеотиды использованные для получения плазмид серии p5Snnn

Плаزمида	Целевой ген	Название олигонуклеотида	Структура олигонуклеотида 5' → 3'
p5Scbh1	<i>cbh1</i>	sgRcbh1F	tggtctacttgcaaatcagggttttagagctagaatagcaag
		sgRcbh1R	cctgatttgcaagtagaccactattcgtcctttcatacaacag
p5Sclr1	<i>clr1</i>	clr1_13sgRF	gagaagacagaatcttcgtggttttagagctagaatagcaag
		clr1_13sgRR	caagaagattctgtcttctcctattcgtcctttcatacaacag
p5Sclr2	<i>clr2</i>	clr2_65sgRF	ctacaacaagacgaagcgagggttttagagctagaatagcaag
		clr2_65sgRR	ctcgtctcgtcttgtagctattcgtcctttcatacaacag
p5SxlnR	<i>xlnR</i>	xlnR219sgRF	gcattctgctgatacgggtggttttagagctagaatagcaag
		xlnR219sgRR	caaccgatcagcagaatgcctattcgtcctttcatacaacag
p5StacA	<i>tacA</i>	tacAsgR+	tttgaagaggacaatagggagtttagagctagaatagcaag
		tacAsgR-	tcctattgtcctcttcaagctattcgtcctttcatacaacag

ПЦР праймеры для получения плазмид серии p5Snnn были разработаны на основе последовательностей протоспейсеров для нокаута соответствующих генов, подобранных в программе ChopChop (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) (Таблица 15)

Таблица 15 – Последовательности протоспейсеров для нокаута генов системой CRISPR-Cas9/

Ген	Последовательность протоспейсера 5' → 3'
<i>niaD</i>	agggtgggatgtcttcatcg

<i>cbh1</i>	tggtctacttgcaaatcagg
<i>clr1</i>	gagaagacagaatcttcgtg
<i>clr2</i>	ctacaacaagacgaagcgag
<i>xlnR</i>	gcattctgctgatacggttg
<i>tacA</i>	tttgaagaggacaataggga

4.2.21 Отбор трансформантов после применения системы CRISPR-Cas 9

Для получения нокаута гена *niaD* штамм *P. verruculosum* В1-221-151 котрансформировали плазмидами pGPDCas и p5SniaD и трансформанты высевали на минимальную среду с 10мМ NH₄Cl с добавлением 0,6М NaClO₃. На 6 сутки после трансформации на среде с 0,6 М более крупные колонии пересевались на минимальную среду 10мМ хлорида аммония и 1 М хлоратом натрия. Выросшие на такой среде клоны рассеивали на минимальные среды с 10мМ хлорида аммония и 10мМ нитратом натрия для подтверждения неспособности утилизировать ими нитраты. После выделения ДНК из грибных колоний отобранных клонов фрагменты редактируемых генов амплификаровали с использованием праймеров подобранных для соответствующих генов (Таблица 16). Для амплифицирования гена *niaD* использовались праймеры приведённые в п 4.2.19 данной главы.

Таблица 16 –ПЦР-праймеры для амплификации фрагментов редактируемых генов.

Ген	Название олигонуклеотида	Структура олигонуклеотида 5' → 3'
<i>cbh1</i>	cbh1sd008	atgatgaggagattgttcttagc
	cbh1R593	cattgagagtcacagtatccgacac
<i>clr1</i>	C1DD1	tgatgactcgtacctgatatcaagacattt
	Clr1_1925R	gggcgtgattcatcacatcttgc
<i>clr2</i>	C2DD1	gctagtcgactccgcatttatgtgtctaga
	C2DR1	gagttgttcttgttctcctggatcgcgatg
<i>xlnR</i>	XlnRF1	ctttctgtcgcacgaccgac
	XLNSR1	ccttcgcagcagcttctgcaatat
<i>tacA</i>	tacAF1	acgagccaatcagcgctaaaggc
	TACCR1	ggttgaggttttggagaagagtggagggag

4.2.22 Создание конструкций для конститутивной экспрессии генов *clr1*, *clr2*, *xlnR* *P. verruculosum*

Для получения плазмид pGpdClr1, pGpdClr2 и pGpdXlnR на начало терминатора транскрипции гена *cbh1* *P. verruculosum* и на 3'-конец промотора гена *gpdA* были выбраны олигонуклеотидные праймеры CBGP_VGD и CBGP_VGR (Таблица 15). Используя плазмиду

pGpdCasGFP в качестве матрицы, методом ПЦР был получен линейный фрагмент ДНК (вектор), несущий терминатор транскрипции гена *cbh1*, плазмиду pUC18 и промотор гена *gpdA*. На гены активаторов также были выбраны пары праймеров, 3`-область которых была комплементарна началу и концу кодирующих областей генов активаторов, а 5`-область комплементарна крайним последовательностям вектора (3`конец промотора и 5`область терминатора транскрипции). Кодирующие части генов активаторов амплифицировали, используя подобранные пары праймеров (Таблица 17) и геномную ДНК *P. verruculosum* в качестве матрицы.

Таблица 17 – ПЦР-фрагменты и олигонуклеотиды использованные для сборки плазмид pGPDclr1, pGPDclr2, pGPDxlnR.

ПЦР-продукт	Матрица	Размер ПЦР-продукта, т.п.о.	Праймер	Структура олигонуклеотида 5' → 3'
вектор	pGpdCasGFP	3.6	CBGPVGD	gactgtgtcgcctcctc
			CBGPVGR	gattgcggtgatagttgcttag
<i>clrA</i>	геномная ДНК <i>P. verruculosum</i>	2.4	CLR1GD	caactatcaccgcaatcatgagcaagcgtcctcac
			CLR1GR	ggagggcgacacagtcctataacagccgaacaaggtc
<i>clrB</i>	геномная ДНК <i>P. verruculosum</i>	2.3	CLR2GD	caactatcaccgcaatcatgtttctcacattcgagtcc
			CLR2GR	ggagggcgacacagtcctactggatcctagcatcg
<i>xlnR</i>	геномная ДНК <i>P. verruculosum</i>	2.9	XLNRGD	caactatcaccgcaatcatggcacaaccgtcgcaaac
			XLNRGR	ggagggcgacacagtcctacaaagctaaccgctgc

Смесь вектора и ПЦР-фрагмента для каждого гена активатора обрабатывали Gibson Assembly® Master Mix (NEB, Великобритания), после чего смесью трансформировали клетки *E. coli*. Из выросших клонов выделяли плазмидную ДНК, и секвенировали по методу Сэнгера (ООО «Синтол», Россия) в обоих направлениях для исключения мутаций.

4.2.23 Ферментативный гидролиз МКЦ и измельченной осинового древесины

Ферментативный гидролиз проводили в трех повторах в 2-мл пробирках в объеме 1,5 мл при 50 °С и перемешивании со скоростью 1000 об/мин. Реакционная смесь содержала 0,1 М ацетатный буфер, pH 5,0; 100 г/л (по сухому веществу) субстрата и 10 мг/мл (по белку) ФП. Для консервации от микроорганизмов добавляли 1 мМ NaN₃ и 0,05 мг/мл ампициллина. Пробы отбирали через 3, 24 и 48 часов. Концентрацию ВС определяли по методу Шомоди-Нельсона [167], концентрацию глюкозы - набором «Глюкоза-Агат» (ООО «АГАТ-МЕД», Россия).

5 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ¹

5.1 Адаптация системы редактирования генома CRISPR-Cas9 для мицелиального гриба *P. verruculosum*

Логика экспериментальной работы, направленной на изучение влияния транскрипционных факторов на биосинтез ферментов в мицелиальном грибе *P. verruculosum*, предполагала адаптацию методического подхода редактирования генома с использованием системы CRISPR-Cas9. Этот метод активно применяется в обратной генетике, поскольку позволяет проводить быстрый нокаут целевых генов, что дает возможность сократить время получения результатов за счет отсутствия необходимости клонирования протяжённых фланкирующих целевой ген участков генома. Однако применение системы CRISPR-Cas9 имеет ряд ограничений, например: 1) Нуклеаза Cas9 не должна быть токсична для клеток микроорганизма/либо должна существовать в клетке в активном состоянии короткое время; 2) Ген, подвергаемый нокауту, желателно должен присутствовать в геноме в единичной копии.

В качестве модельного гена при адаптации метода был использован ген *niaD*, кодирующий нитратредуктазу, задействованную в метаболическом пути ассимиляции нитратного азота. Нокаут гена *niaD* кроме потери способности использовать использовать

В данной главе обсуждаются результаты диссертационной работы, опубликованные в статьях по теме диссертации:

1. Чулкин А.М., Кислицин В.Ю., Зоров И.Н., Сеницын А.П., Рожкова А.М. Определение копийности целевых генов карбогидраз в рекомбинантных штаммах гриба *Penicillium verruculosum* // Биотехнология. – 2019. – Т. 35. - №. 5. – С.51-57.
2. Кислицин В.Ю., Чулкин А.М., Синельников И.Г., Сеницын 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.
3. Кислицин В.Ю., Чулкин А.М., Зоров И.Н., Шашков И.А., Сатрутдинов А.Д., Сеницын А.П., Рожкова А.М. Влияние моно- и олиго сахаридов на транскрипцию гена *cbh1* в мицелиальном грибе *Penicillium verruculosum* // Биотехнология. – 2021. – Т. 37. - №. 1. - С. 45-53.
4. 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. – Т. 18. – С. 101023.
5. Кислицин В. Ю., Чулкин А. М., Зоров И. Н., Синельников И. Г., Сеницын А. П., Рожкова А. М. Функция транскрипционного фактора XlnR у мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* // Биотехнология. – 2022. – Том 38. - №6. – С. 29–39.
6. Чулкин А.М., Кислицин В.Ю., Зоров И.Н., Шашков И. А., Рожкова А.М. Влияние нокаута транскрипционного фактора TасА на транскрипцию и экспрессию гена *cbhI* в штамме мицелиального гриба *Penicillium verruculosum*. Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. – 2023. – Т. 64. - №. 2.

нитраты использовать нитраты как источник азота, также приводит к повышению устойчивости к хлоратам, что позволяет вести первичный отбор трансформантов по способности расти на среде с хлоратами [172].

Таким образом, на первом этапе работы нами была проверена цитотоксичность нуклеазы Cas9 для клеток гриба *P. verruculosum*, а также подобрана схема доставки системы CRISPR-Cas9 в клетки гриба.

5.1.1 Создание плазмиды для конститутивной экспрессии гена *cas9* и проверка внутриклеточной локализации белка Cas9

Для конститутивной транскрипции гена *cas9* было решено использовать аутологичный конститутивный промотор гена *gpdA*, кодирующего глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназу [159]. Была получена плазмида pGpdCasGFP (Рисунок 12) (см. раздел 4.2.20), содержащая ген *cas9* под контролем промотора *gpdA*, фланкированный последовательностью сигнала внутриядерной локализации (NLS) вируса SV40 в начале, и NLS гена нуклеоплазмина в конце [172], слитый с геном зеленого флуоресцентного белка GFP (*gfp*), для определения внутриклеточной локализации нуклеазы Cas9.

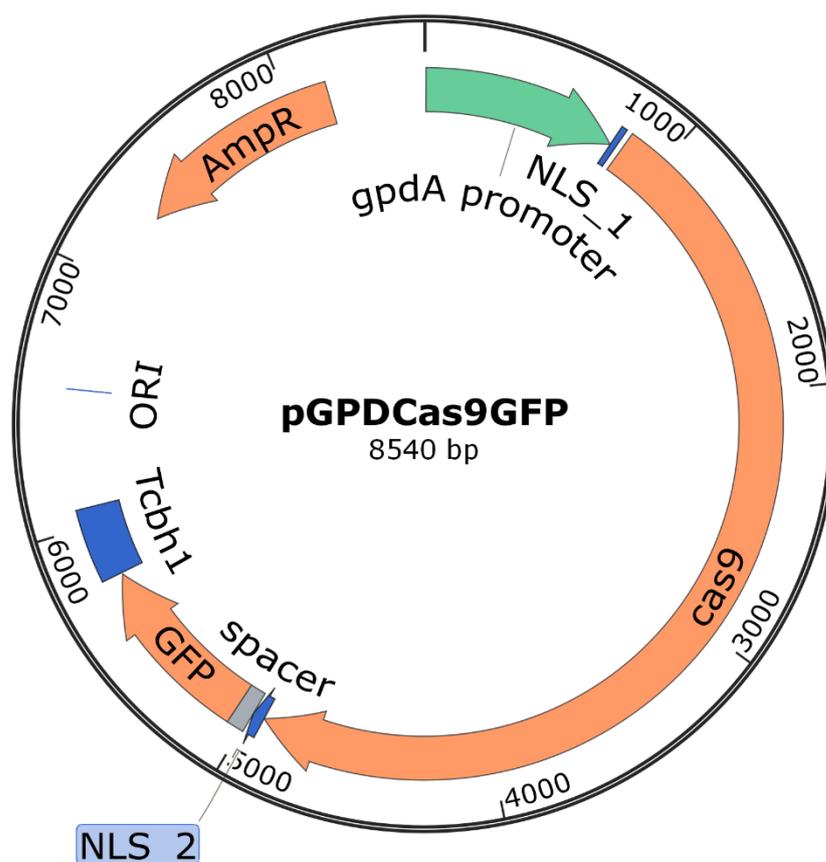


Рисунок 12 – Карта плазмиды pGpdCas9GFP [158]

Плазмидой pGpdCas9GFP был трансформирован реципиентный штамм *P. verruculosum* B1-537 (см. раздел 4.2.7). Из мицелия трансформантов были выделены ДНК и РНК, после чего в

них было определено относительное число копий гена *cas9* и уровень его транскрипции, используя метод количественной ПЦР в реальном времени. В качестве референсных генов были выбраны гены *gpdA*, *tub2* и *actA* *P. verruculosum* (см. раздел. 4.2.3). Результаты измерения относительного числа копий гена *cas9*, встроившихся в геном, и относительного уровня транскрипции в рекомбинантных клонах показали, что из пяти проверенных клонов наибольшее число копий имеется в клонах 1, 2 и 3. Уровень экспрессии коррелировал с количеством встроившихся в геном копий гена *cas9:gfp* (Рисунки 13, 14) [159].

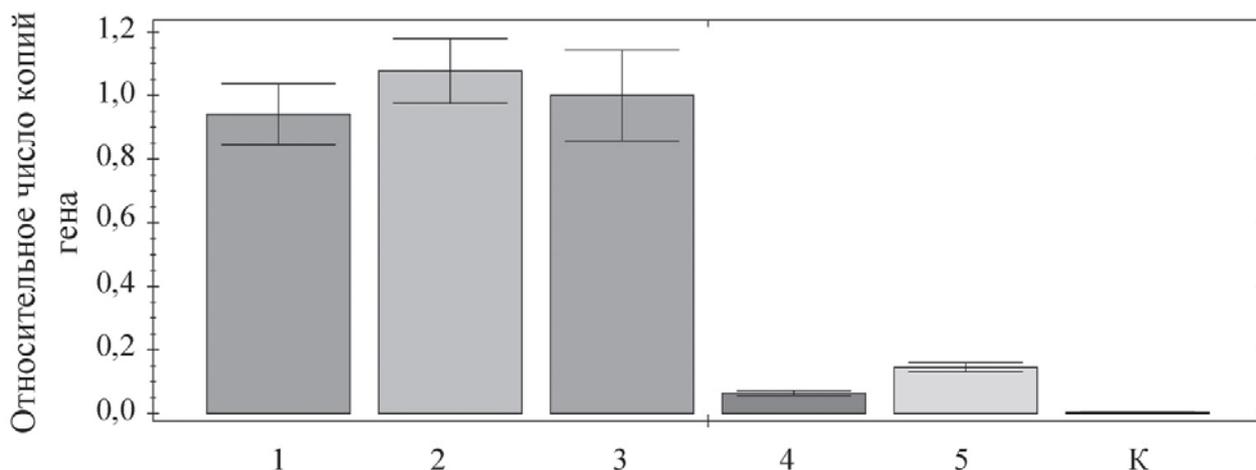


Рисунок 13 – Относительное число копий гена *cas9* в трансформантах (1–5) и в реципиентном штамме (К) [158]

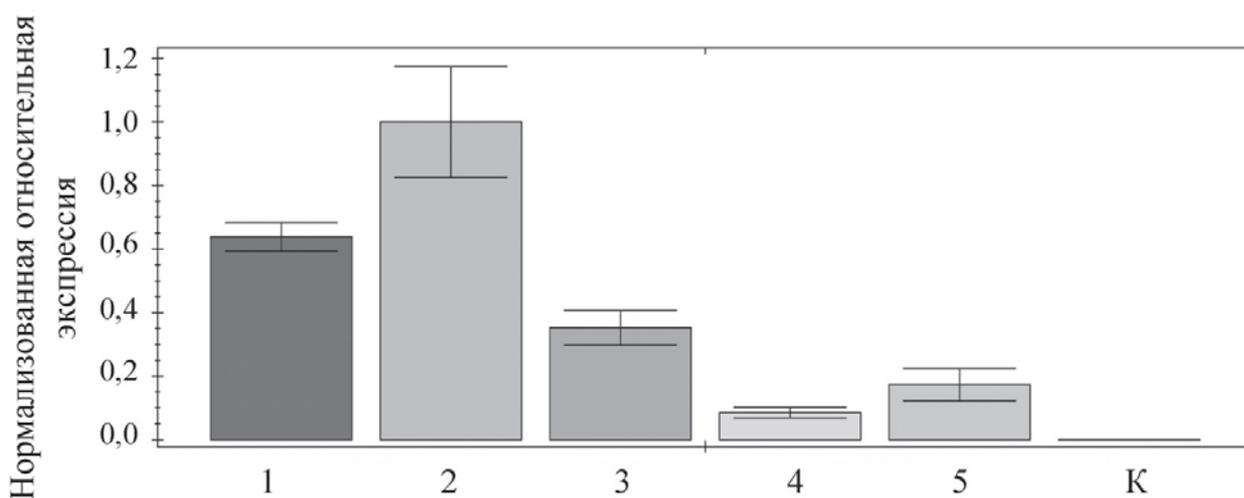


Рисунок 14 – Относительный уровень транскрипции гена *cas9* в трансформантах (1–5) и в реципиентном штамме (К) [159]

Далее, методом флуоресцентной микроскопии пророщенных спор клона №1, на приборе была определена локализация химерного белка Cas9:GFP.–(см. раздел 4.2.8.) в мицелии. На

полученных снимках мицелия, наблюдалась зеленая флюоресценция с усилением в точках, что свидетельствует о накоплении белка Cas9:GFP в ядрах (Рисунок 15) [159].

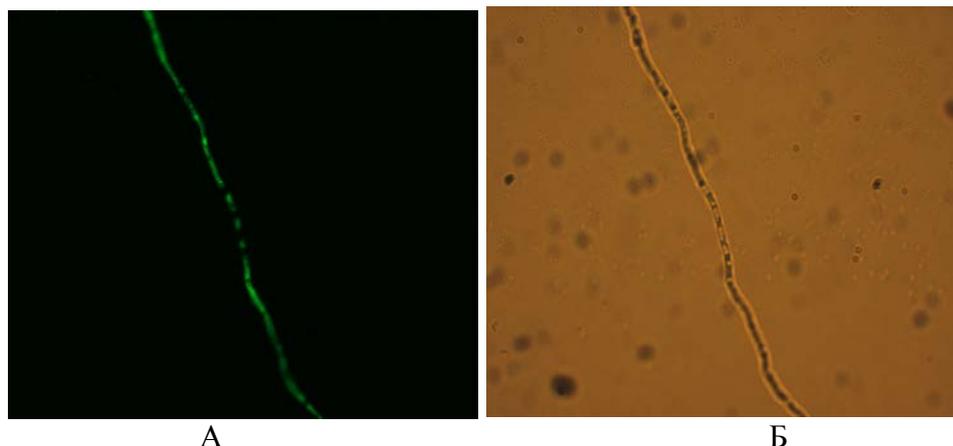


Рисунок 15 – Флюоресцентная микроскопия (А) и микроскопия в проходящем свете (Б) растущего мицелия клона №1 с после трансформации плазмидой pGpdCas9GFP 1 на приборе Axiscope 40 (Carl Zeiss, Германия) [159].

Таким образом было показано, что конститутивная экспрессия гена нуклеазы Cas9 под контролем промотора гена *gpdA* не является токсичной для *P. verruculosum*.

Поскольку транскрипция гена *cas9* под контролем промотора гена *gpdA* и ядерная локализация химерного белка Cas9:GFP были подтверждены, для дальнейшей работы была получена плаزمида pGpdCas9 (см. раздел 4.2.20) (Рисунок 16), аналогичная плазмиде pGpdCas9GFP, но не содержащая последовательности, кодирующей зелёный флюоресцирующий белок [159].

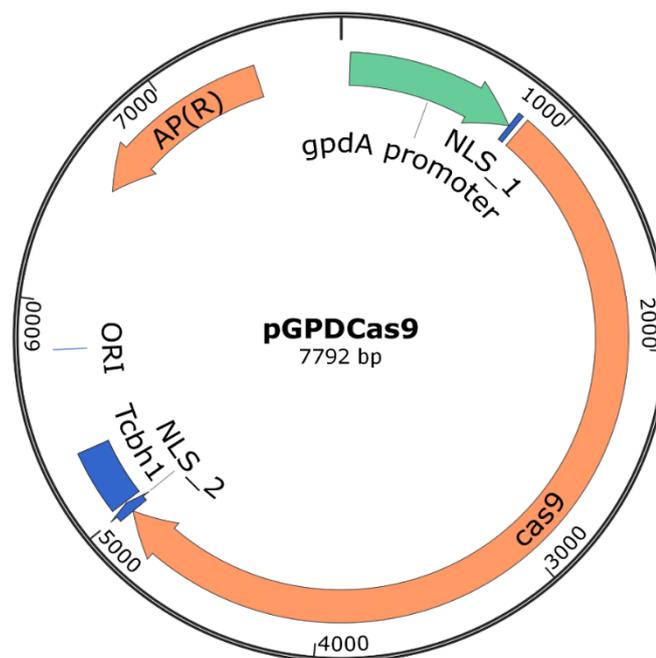


Рисунок 16 – Карта плазмиды pGpdCas9

5.1.2 Нокаут маркерного гена *niaD* в грибе *P. verruculosum*

Для эффективного геномного редактирования системой CRISPR-Cas9 важен правильный выбор маркерного гена. Например, в качестве маркерного гена в мицелиальных грибах часто используется ген *pyrG*, нокаут которого обеспечивает устойчивость к 5'-фтороротовой кислоте (5'-ФОК) [174,175]. Нокауты генов *wA*, *pksP* или *albA* приводят к образованию бесцветного мицелия [175, 176]. Однако, штамм *P. verruculosum* В1 обладает высокой устойчивостью к 5'-ФОК и имеет неокрашенный мицелий. Поэтому, для редактирования генома *P. verruculosum* в качестве маркерного гена был выбран, ген нитратредуктазы (*niaD*), поскольку его нокаут приводит к потере способности использовать нитраты в качестве источника азота и к устойчивости к хлоратам [177]. Кроме того, такой штамм будет удобно использовать в качестве реципиента, котрансформируя его плазмидой с целевым геном и плазмидой с комплементирующим геном *niaD*. Поскольку для выбора последовательности спейсера направляющей-РНК необходимо иметь точную последовательность нокаутируемого гена, внутренний фрагмент гена *niaD* *P. verruculosum* был амплифицирован и секвенирован (см. раздел. 4.2.19). Сравнение секвенированного фрагмента (Рисунок 17) выявило высокую гомологию (91%) с геном *niaD* *P. marneffeii*.

```
5' . . . . GAAGGTTTCTTGGACATCTCCAGAGTTATTCTACGTCAGAAATCATGGGCCCGTCCCACGAGTCCGCGATGAAGACATCCCAACCTGGGAACTCAGCATCGAGGGGTTAGATTACCTTGGCATGACCTTGAAGAAATATATCAACTGACAAACATATTAGACTTGTGTGAGAACCCCATTTGTGCTTGACTTTAGACAGATCTTACAAGAGTTTCGACACAGATTACGGCACCCATCACCTTGTATGTGCCGGCAACCGACGCAAAGAGCAGAACCAAGTCCGAAAGTCAAAGGGTTTCTCATGGGGAGCAGCCGGTGTCTCGACTGCCCTCTTACAGGTCCAATGATGCCGGGACGTCATCAAACGAGCAAAAACCAATGAGGAGGGGСТАААТАТGTTTGTATGGAGGGGAGCAGACAATTGGTTAGCCATATTCACCATTGGTTTTCAGGCTTCTCAСТАACGTCTTTTGCAGCCGATTG . . . . 3'
```

Рисунок 17 – последовательность секвенированного фрагмента гена *niaD* *P. verruculosum*

Далее с помощью программы ChopChop (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) была выбрана последовательность спейсера для нокаута гена *niaD* (см. раздел 4.2.19). Для нокаута гена *niaD* была сконструирована плазида p5SniaD (см. раздел 4.2.20), содержащая промотор 5S рРНК *A. niger* с последовательностью, кодирующей 5S рРНК, которая также выполняет функцию промотора, и кодирующую последовательность sgRNA со специфическим спейсером для нокаута гена *niaD* (Рисунок 18) [172].

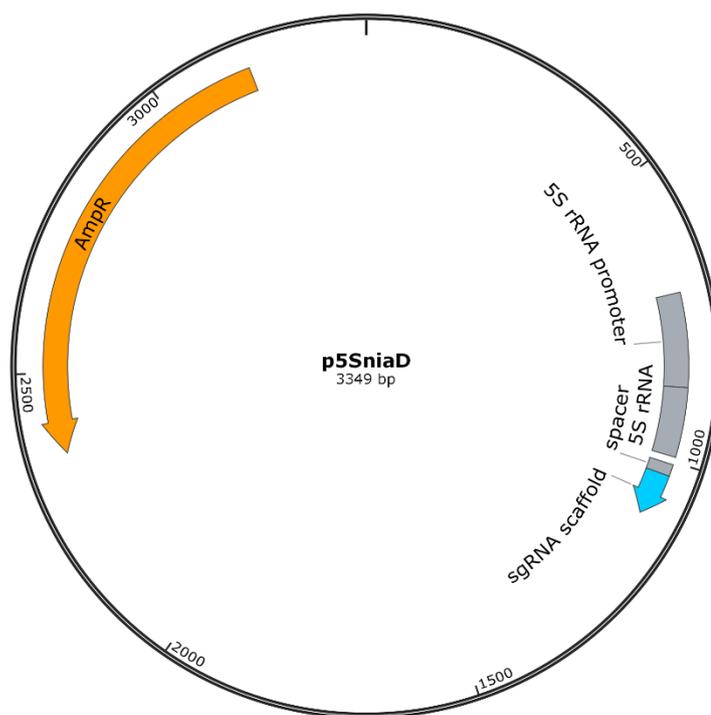


Рисунок 18 – Карта плазмиды p5SniaD

После трансформации штамма *P. verruculosum* B1-221-151 плазмидами pGPDcas9 p5SniaD и селекции на хлорате натрия (см. раздел 4.2.21) из выросших колоний были случайным образом отобраны 8 трансформантов, из которых была выделена ДНК для амплификации фрагмента гена *niaD*. Результаты показали наличие мутаций, приводящих к сдвигу рамки считывания у 4 клонов в области, где должен был произойти двухцепочечный разрыв геномной ДНК из-за действия нуклеазы Cas9 (Рисунок 19). Интересно, что нам не удалось обнаружить наличие генов *cas9* и sgRNA в этих клонах. Вероятно, эти факты могут указывать на то, что прямой транскрипции генов *Cas9* и sgRNA из плазмид после трансформации было достаточно для нокаута *niaD*.

	PAM	Протоспейсер	
B221-151	CAGAAATCATGGGCCCGTCCCACGAGT	CCGCGAT GAAGACATCCCA	ACCTGGGAACTCAGCATCGAGGG
B1-537	CAGAAATCATGGGCCCGTCCCACGAGTCCGCGAT	GAAGACATCCCA	ACCTGGGAACTCAGCATCGAGGG
клон 1	CAGAAATCATGGGCCCGTCCCACGAGTCCGCGAT	TGAAGACATCCCA	ACCTGGGAACTCAGCATCGAGGG
клон 2	CAGAAATCATGGGCCCGTCCCACGAGTCCGCGA-	GAAGACATCCCA	ACCTGGGAACTCAGCATCGAGGG
клон 3	CAGAAATCATGGGCCCGTCCCACGAGTCCGCGAT	TGAAGACATCCCA	ACCTGGGAACTCAGCATCGAGGG
клон 4	CAGAAATCATGGGCCCGTCCCACGAGTCCGCGA-	GAAGACATCCCA	ACCTGGGAACTCAGCATCGAGGG

Рисунок 19 – Выравнивание последовательностей фрагментов гена *niaD* *P. verruculosum* в районе действия нуклеазы Cas9

Таким образом в данной выборке клонов процент генов *niaD* с нокаутами составил 50%, что сопоставимо с эффективностью редактирования других мицелиальных грибов (Таблица 18).

Таблица 18 – Эффективность геномного редактирования в мицелиальных грибах.

Вид гриба	Ген(ы)	Эффективность	Источник
<i>A. fumigatus</i>	<i>pksP</i>	25-53%	176
<i>A. oryzae</i>	<i>wA</i> и <i>pyrG</i>	10-20%	178
<i>P. crysogenum</i>	<i>pks17</i>	33-100%	155
<i>P. subrubescens</i>	<i>ku70</i>	17%	179
<i>P. verruculosum</i>	<i>niaD</i>	50%	Данная работа

Далее, споры клона №4, были рассеяны до одиночных колоний на МС с хлоридом аммония в качестве источников азота (см. раздел 4.1.3.). Из выросших колоний четыре были пересеяны на чашки с МС с нитратом натрия в качестве источников азота (см. раздел. 4.1.3.) чтобы подтвердить их неспособность использовать нитраты в качестве источника азота. В результате, все клоны оказались не способны расти на нитрате, что свидетельствовало о нарушении механизма ассимиляции азота. В результате один из данных клонов был выбран для дальнейшего использования в качестве реципиентного штамма и назван *P. verruculosum* В1-2743.

Поскольку нокаут гена *niaD* проводился с целью получения реципиентного штамма, то одним из критериев оценки нового штамма является сохранение компонентного состава базового секретлируемого комплекса ферментов. Для этого новый реципиентный штамм *P. verruculosum* В1-2743 культивировался на среде СФС. В качестве сравнения был выбран реципиентный штамм *P. verruculosum* В1-537, полученный по классической схеме с использованием мутагена нитрозогуанидина и УФ-обработки с последующей многоступенчатой селекцией [1, 3]. По результатам измерений ферментативных активностей в КЖ на 6-ые сутки видно, что уровень активностей штаммов В1-537 и В1-2743 различаются не существенно (Таблица 19).

Таблица 19 – Удельные активности ферментов и концентрация белка в КЖ штаммов В1-537 и В1-2743 на 6-ые сутки культивирования в колбах (ед/мг белка).

Штамм	Концентрация белка (мг/мл)	Ферментативные активности			
		МКЦ	пНФГ	Ксилан бука	КМЦ
В1-537	6±0,2	0,61±0,04	2±0,2	12±1,1	7,0±0,58
В1-2743	6±0,1	0,62±0,05	2±0,1	12±1,2	6,0±0,49

5.1.3 Проверка нового реципиентного штамма *P. verruculosum* В1-2743 на примере экспрессии гетерологичной глюкозооксидазы

Для проверки возможности использования штамма *P. verruculosum* В1-2743 в качестве реципиента для экспрессии гетерологичных генов, был клонирован ген *goxA*, кодирующий глюкозооксидазу *A. niger* под контролем *cbh1* промотора. Данный фермент был выбран,

поскольку он хорошо изучен, широко применяется в пищевой промышленности [180], кроме того, глюкозооксидазная активность определяется относительно просто и отсутствует в ферментных препаратах *P. verruculosum* при культивировании в стандартных условиях [2, 3]. Была проведена котрансформация нового штамма плазмидами pCBHISS-GOX (Рисунок 20) (см. раздел 4.2.9.) и pSTA-10 (см. раздел 4.2.7.). В качестве контроля штамм *P. verruculosum* В1-537 был трансформирован аналогично.

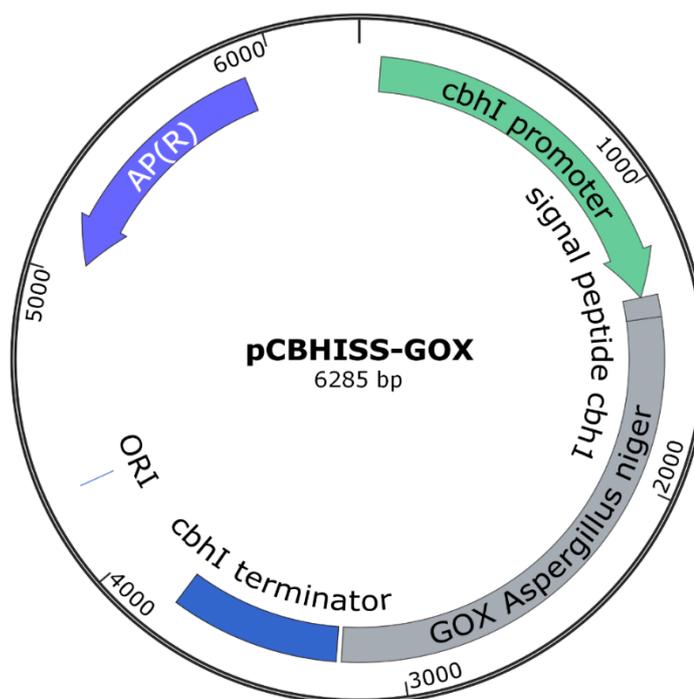


Рисунок 20 – Карта плазмиды pCBHISS-GOX

В результате на чашках Петри со средой МС с нитратом натрия в качестве источника азота в обоих случаях было получено более 60 трансформантов. Это подтвердило, что неспособность использовать нитраты в качестве источника азота штаммом *P. verruculosum* В1-2743 обусловлена именно нарушением гена нитратредуктазы. Затем по три трансформанта на основе штаммов В1-2743 (Клоны 1-3) и на основе штамма В1-537 (Клоны 4-6) были культивированы с использованием стандартной ферментационной среды (см. раздел 4.1.3.) в течение 6 суток. Активность глюкозооксидазы в КЖ рекомбинантов измеряли ежедневно, начиная с 3-х суток. Максимальная активность глюкозооксидазы наблюдалась на 4-ые сутки культивирования (Таблица 20). К 6-ым суткам культивирования активность падала, что связано с закислением ферментационной среды в процессе роста гриба и частичным протеолизом глюкозооксидазы.

Таблица 20 – Активность глюкозооксидазы в КЖ рекомбинантных клонов ГОКС-537 и ГОКС-2743 на 4-ые сутки культивирования. Акт – активность, С_б концентрация белка.

	В1-2743 (К1)	В1-537 (К2)	ГОКС- В1-2743			ГОКС-В1-537		
			Клон 1	Клон 2	Клон 3	Клон 4	Клон 5	Клон 6
Акт., ед/мл	0	0	72±1,2	160±2,8	90±2,1	120±3,0	80±4,1	120±3,1
С _б , мг/мл	5,3±0,11	5,5±0,1 3	5,9±0,2 1	7,1±0,23	5,1±0,11	6,9±0,23	4,0±0,38	7,0±0,34
Акт., ед/мг	0	0	12±1,2	22±1,8	20±2,1	18±3,3	20±2,5	20±3,4

Также был проведён ПААГ-электрофорез КЖ в денатурирующих условиях (см. раздел 4.2.14.), отобранных на 4 сутки культивирования, где видны «мажорные» полосы рекомбинантного белка в районе 68 кДа (Рисунок 21).

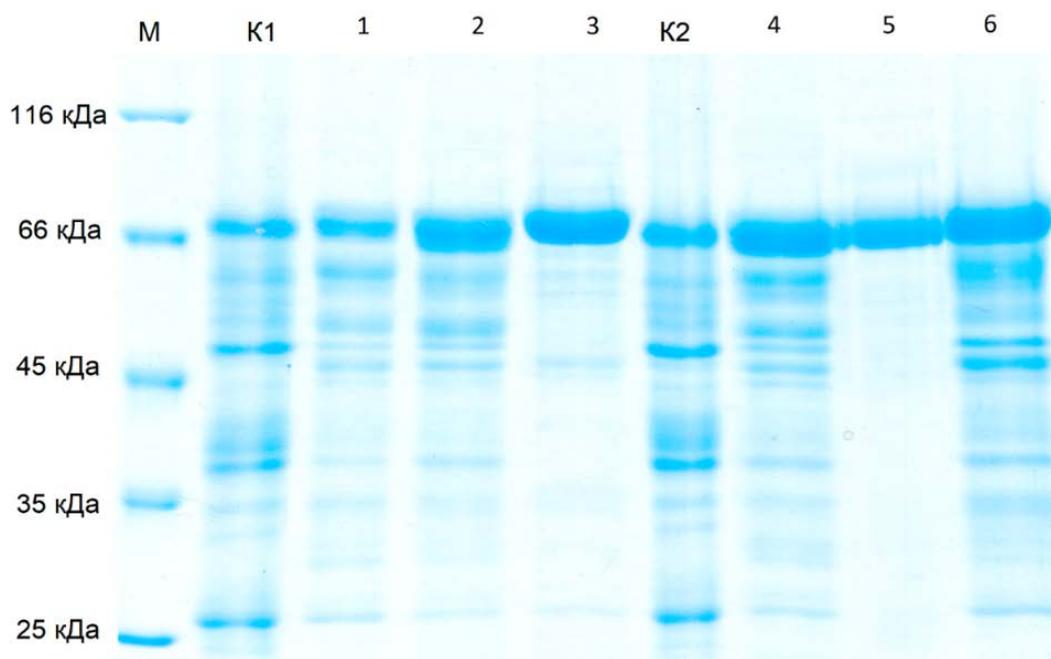


Рисунок 21 – Электрофореограмма КЖ штаммов, экспрессирующих глюкозооксидазу на 4-ые сутки культивирования. М - белковый маркер. К1 – В1-2743, 1-3 – ГОКС-В1-2743, К2 – штамм В1-537, 4-6 – ГОКС-В1-537.

Таким образом, было подтверждено, что штамм *P. verruculosum* В1-2743, полученный методом геномного редактирования, сопоставим по своим физиологическим характеристикам с штаммом *P. verruculosum* В1-537, и может быть использован для эффективной экспрессии рекомбинантных ферментов. Получение нового реципиента доказало эффективность адаптированной для мицелиального гриба *P. verruculosum* методики редактирования генома на основе системы CRISPR-Cas9.

5.1.4 Адаптация системы CRISPR-Cas9 для двойных нокаутов в штамме *P. verruculosum* B1-221-151

На следующем этапе проверки адаптированной методики геномного редактирования *P. verruculosum* системой CRISPR-Cas9 был осуществлён двойной нокаут целевого и маркерного (*niaD*) генов. В качестве целевого гена был выбран ген *cbh1*.

Ген *cbh1* *P. verruculosum* кодирует «мажорный» фермент – ЦБГ1, которая, является основным компонентом ферментативной системы, необходимой для разрушения целлюлозы. На основе регуляторных областей гена *cbh1* была ранее разработана система индуцибельной системы экспрессии, позволяющей создавать эффективные–ферментативные комплексы для разрушения биомассы [161].

Тем не менее, существует ряд биотехнологических задач, при которых наличие целлюлогидролазной активности в промышленном ферментном препарате нежелательно. Например, в процессах выделения МКЦ, при ее очистке от гемицеллюлозной матрицы [181]. В этом смысле, получение нового реципиентного штамма с генотипом Δ *niaD* и Δ *cbh1* расширит возможности использования *P. verruculosum* как продуцента гемицеллюлаз или других промышленных ферментных препаратов для технологических процессов, требующих сохранения целлюлозной матрицы.

Ранее на мицелиальном грибе *T. reesei* было показано, что нокаут гена *cbh1*, даже без удаления промоторной области изменяет соотношение ферментов в секретлируемом комплексе [182, 183]. Было показано, что при делеции гена *cbh1* и, соответственно, удалении ЦБГ1 из ферментативного комплекса *T. reesei* увеличивается содержание ЦБГ2, но при этом гидролитическая активность комплекса по фильтровальной бумаге снижается. При этом увеличиваются β -глюкозидазная и эндоглюканазная активности [182]. Данные эффекты свидетельствуют, о наличии регуляторного механизма, связывающего биосинтез ЦБГ1 с экспрессией других целлюлаз.

Таким образом, получение штамма *P. verruculosum* Δ *niaD Δ *cbh1* может представлять интерес для экспрессии рекомбинантных белков и получения ферментных препаратов со сниженной целлюлогидролазной активностью, а также, для изучения механизмов регуляции экспрессии гликозил-гидролаз. Поэтому, адаптированный метод CRISPR-Cas9 был применен к получению двойного нокаута в штамме *P. verruculosum* B1-221-151.*

5.1.5 Получение штаммов *P. verruculosum* с нокаутами генов *cbh1* и *niaD*

Для осуществления двойного нокаута была проведена котрансформация протопластов штамма *P. verruculosum* B1-221-151 двумя плазмидами: плазмидой pGCC1 (Рисунок 12), содержащей ген *cas9* и sgRNA со спейсером к гену *cbh1* и плазмидой p5SniaD (Рисунок 19). Таким образом, при селекции трансформантов на среде с хлоратом натрия (см. раздел 4.2.21)

отбираются только те, в которые попали кодирующие последовательности sgRNA для нокаута обоих генов.

Последовательность протоспейсера для нокаута гена *cbh1* была выбрана в программе ChopChop (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) (см. раздел 4.2.20)

После отбора трансформантов на среде с хлоратом натрия (см. раздел 4.2.21) аналогичному селекции одиночных мутантов по гену *niaD*, было отобрано восемь клонов, из которых была выделена геномная ДНК, которая использовалась для амплификации фрагментов генов *niaD* и *cbh1*. Следует отметить, что из клонов 1, 4, 5 и 7 амплифицировать ген *cbh1* не удалось. Амплифицированные фрагменты генов *niaD* и *cbh1* были секвенированы (Рисунок 22). В гене *niaD* у всех клонов имелись мутации в ожидаемых областях. В случае гена *cbh1* клона №2 произошла замена цитозина на аденина, у клона №3 произошла делеция цитозина, а у клона №6 – инсерция одного цитозина. В случае клона №8 произошла делеция 9 нуклеотидов в фазе ОРС, что привело к вырезанию 3 аминокислот, без сдвига рамки считывания. Таким образом, можно считать, что у клонов № 2, 3, и 6 последовательности гена *cbh1* подтвердили его нокаут. Мутации в гене *niaD* у всех отобранных клонов кроме клона №5 приводят к сдвигу ОРС, однако, удаление 4 аминокислот может являться достаточным для инактивации нитратредуктазы.

```

                                PAM|   spacer   |
niaD wt  TGGGCCCGTCCCACGAGTCCGCGATGAAGACATCCCAACCTGGGA
          TGG-----ACATCCCAACCTGGGA
          TGGGCCCGTCCCACGAGTCCGCGA-GAAGACATCCCAACCTGGGA
Клоны с 1 по 8 TGGGCCCGTCCCACGAGTCCGCGA-GAAGACATCCCAACCTGGGA
          TGGGCCCGTC-----GAAGACATCCCAACCTGGGA
          TGGGCCCGTCCCACGAGTCCGCGA-GAAGACATCCCAACCTGGGA
          TGGGCCCGTCCCACGAGTCCGCGA-GAAGACATCCCAACCTGGGA
          TGGGCCCGTCCCACGAGTCCGCGA-GAAGACATCCCAACCTGGGA
          TGGGCCCGTCCCACGAGTCCGCGA-GAAGACATCCCAACCTGGGA
          TGGGCCCGTCCCACGAGTCCGCGA-GAAGACATCCCAACCTGGGA
  
```

А

```

                                |   spacer   |PAM
cbh1 wt  TCTTTGAGCTGGTCTACTTGCAAATCAGGTGGTAGCTGC
          S L S W S T C K S G G S C
Клон 2   TCTTTGAGCTGGTCTACTTGCAAATCAGGTGGTAGCTGC
          S L S W S T C K *
Клон 3   TCTTTGAGCTGGTCTACTTGCAAATGACGTCGTAGCTGC
          S L S W S T C K *
Клон 6   TCTTTGAGCTGGTCTACTTGCAAATCCAGGTGGTAGCTG
          S L S W S T C K S R W *
Клон 8   TCTTTGAGCTGGTCTACTTGCAAATCC-----TGC
          S L S W S T C K S C
  
```

Б

Рисунок 22 –Выравнивание последовательностей фрагментов гена *niaD* (А) и *cbh1* (Б) *P. verruculosum* в районе действия нуклеазы Cas9 [172]

verruculosum в районе действия нуклеазы Cas9 [172]

Клоны 2, 3, 6, 8 культивировали в колбах по стандартной ферментационной схеме (см. раздел 4.2.11). Отобранные на 6-е сутки КЖ были подвергнуты ПААГ-электрофорезу в денатурирующих условиях (см. раздел 4.2.14) (Рисунок 23).

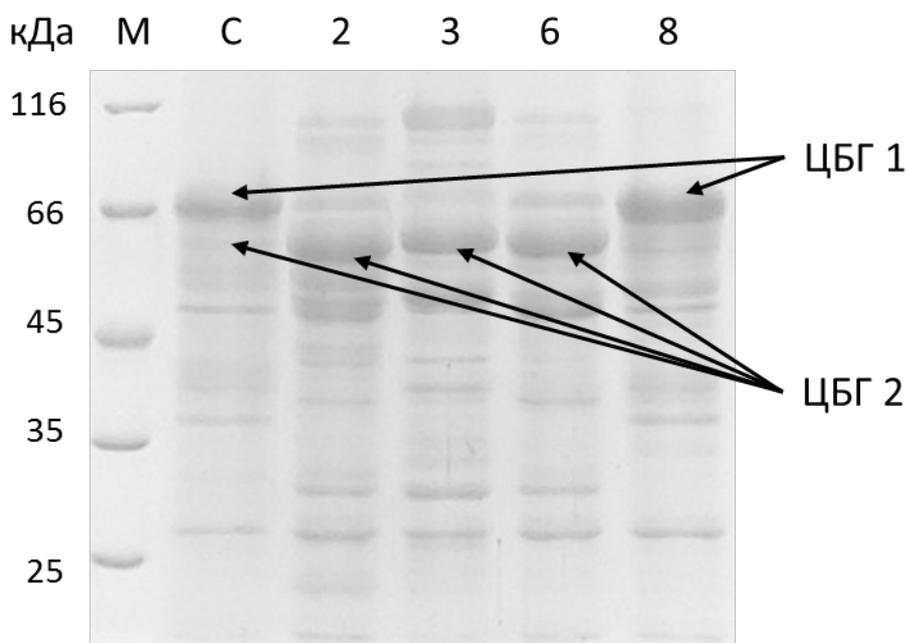


Рисунок 23 – ПААГ-электрофорез КЖ клонов *P. verruculosum* Δ niaD и Δ cbh1 на шестые сутки культивирования [172]

К – КЖ штамма В1-221-151, М - белковый маркер, номера дорожек 2, 3, 6 и 8 соответствуют номерам клонов

Электрофоретический анализ показал, что у клона №8 сохраняется полоса характерная для ЦБГ1 сохранилась, а у клонов № 2, 3 и 6 наблюдается увеличение содержание ЦБГ2 в районе 60 и 50 кДа, что соответствует двум формам ЦБГ с целлюлозосвязывающим доменом и без него. Также в КЖ этих клонов присутствует белок размером около 66 кДа, что может соответствовать молекулярной массе ЦБГ1. Поэтому белки, экстрагированные из полос размером 66 кДа для клонов 3 и 6, были подвергнуты MALDI-TOF масспектрометрии (см. раздел 4.2.15).

Полученные пептиды не совпадали ни с одним из теоретических пептидов ЦБГ1. Поиск возможных белков с помощью онлайн сервиса MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) по базе данных NCBI также не дал результатов. Таким образом, отсутствие ЦБГ1 было подтверждено и клон 3 был отобран для наработки ферментного препарата. В дальнейшей работе данный клон получил обозначение В1-Z3.

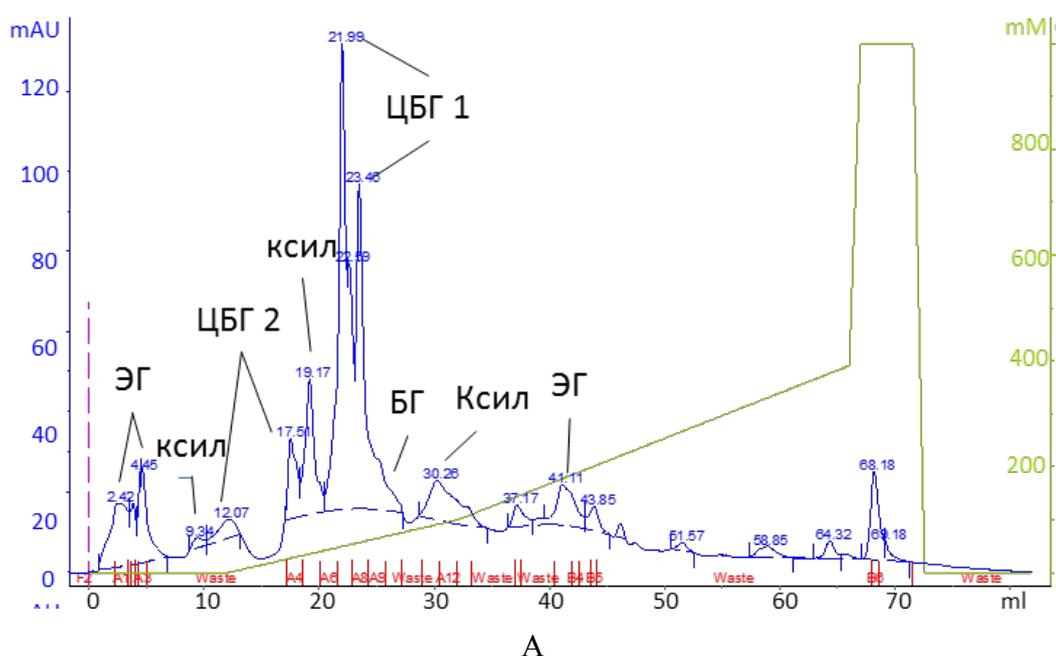
Клон В1-Z3 был использован для культивирования в ферментере объемом 2,5 л, чтобы выявить влияние нокаута гена *cbh1* на компонентный состав и активность нового ферментного комплекса. Результаты измерения активности и концентрации белка в ферментных препаратах В1-Z3 и В1-221-151 представлены в Таблице 21.

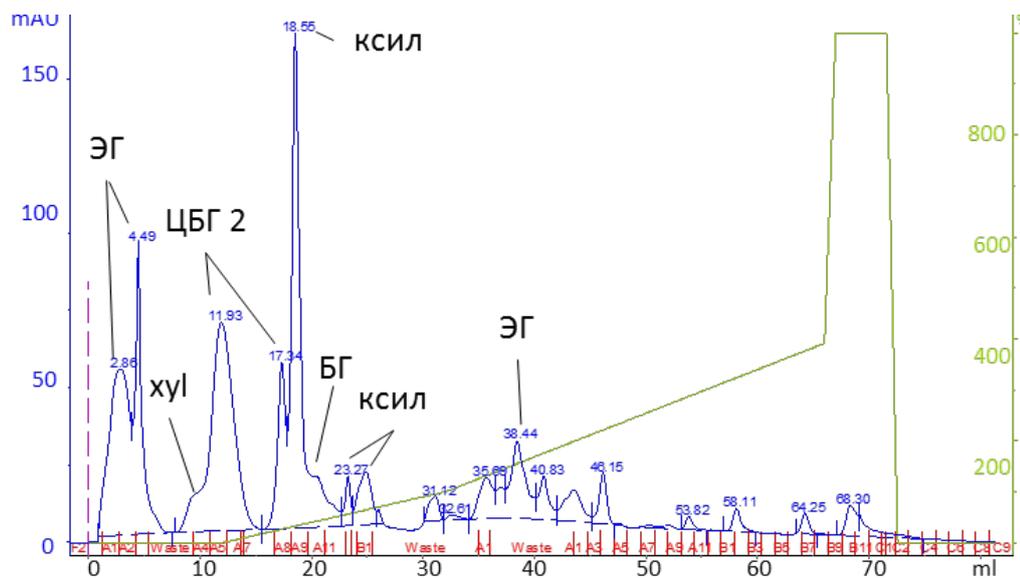
Таблица 21 – Удельные ферментативные активности в ФП В1-Z3 и В1-221-151 (ед/мг) [171].

ФП	Белок, мг/мл	КМЦ	пНФГ	МКЦ	Ксилан бука	пНФЛ
В1-Z3	29±0,9	12±0,7	2±0,3	0,2±0,06	69±0,4	0,01±0,00 6
В1-221-151	37±0,9	6±0.6	1±0,2	0,4±0,02	47±0,4	0,03±0,00 8

У штаммов с делецией гена *cbh1* снижается продуктивность по секретируемому белку, что может объясняться нарушением физиологии микроорганизма при нокауте гена *cbh1*, кодирующего «мажорную» ЦБГ1. Также ФП В1-Z3 имеет авицелазную активность в два раза меньше, а β -глюкозидазная, ксиланазная и эндоглюканазная активности у него соответственно в 2 и 1,5 раза выше по сравнению с ФП В1-221-151. Активность по отношению к пНФЛ, характеризующая наличие ЦБГ1 и ЭГ1 [181] в ФП В1-Z3 отсутствует. Это также подтверждает отсутствие ЦБГ1 в ферментативном комплексе В1-Z3.

Чтобы определить изменения в компонентном составе ФП В1-Z3 в сравнении с ФП В1-221-15, было проведено хроматографическое фракционирование этих ферментных препаратов (см. раздел 4.2.17) (Рисунок 24).





Б

Рисунок 24 – Хроматограмма разделения ФП и В1-221-151(А) В1-Z3 (Б), Двум пикам ЦБГ1 и ЦБГ2 соответствуют формы с целлюлозосвязывающим доменом и без него

Состав ФП В1-221-151, определенный в данной работе (Таблица 24), сопоставим с ранее полученными результатами [184]. Содержание ксиланаз было определено впервые: 20% для В1-151-221 и 24% для В1-Z3. По-видимому, содержание суммарных ксиланаз возросло не столь значительно. Наиболее интересный результат был выявлен при анализе перераспределения основных целлюлолитических активностей. Содержание ЦБГ 2, ЭГ и БГЛ было увеличено в ФП В1-Z3 в 2,6, 1,7 и 1,6 раза соответственно по сравнению с содержанием этих ферментов в ФП В1-151-221. Следует отметить, что ЦБГ 1 полностью отсутствовал в ФП В1-Z3. Увеличение доли ЭГ, ксиланаз и БГЛ в ФП В1-Z3 коррелирует с увеличением активности соответствующих ферментов (Таблица 22).

Таблица 22 – Компонентный состав ФП В1-Z3 и ФП В1-221-151 [171].

ФП	ЦБГ1, %	ЦБГ2, %	ЭГ, %	БГ, %	Ксиланазы, %	Прочее, %
В1-Z3	-	26	35	5	24	10
В1-221-151	29	12	17	2	19	21

Аналогичные результаты были получены для *T. reesei* при делеции гена *cbh1*. При делеции гена основной целлюлазы *T. reesei* ЦБГ1, также возросли удельные активности β -глюканызы и эндоглюканызы, а содержание ЦБГ2 и ЭГ1 увеличивалось в 4 и 2 раза соответственно. Общая целлюлазная активность по фильтровальной бумаге снизилась в 2 раза [182, 183]. В целом полученные данные доказывают, что у *P. verruculosum* имеется механизм регуляции экспрессии

карбогидраз, зависящий от экспрессии других компонентов целлюлолитического комплекса так же, как у *T. reesei*.

5.2 Исследование механизма активации промотора *cbh1* *P. verruculosum*

5.2.1 Определение числа копий целевых генов в штаммах *P. verruculosum* «моно»- и «гетеро»- продуцентах рекомбинантных белков

Поскольку при использовании промотора *cbh1* для экспрессии белков наблюдается разделение рекомбинантных штаммов на «моно»- и «гетеро»- продуценты рекомбинантных белков, было решено исследовать причину этого явления, определив число копий генов *cbh1* и *bgl1*. Для исследования были выбраны штаммы *P. verruculosum* F12 («гетеропродуцент» БГЛ *A. niger*), *P. verruculosum* F10 («монопродуцент» БГЛ *A. niger*), (Таблица 23) (см. раздел 4.1.1)

Таблица 23 – Компонентный состав ферментных препаратов (%) и содержание белка (г/л) в КЖ рекомбинантных штаммов [7, 185].

Штамм	С _б , г/л	ЦБГ1 +ЦБГ2	ЦБГ1	БГЛ <i>A. niger</i>	ЭГ
В1-537 (контроль)	40	56	35	0	10
БГЛ-F10	15	18	14	80	<1
БГЛ-F12	35	43	32	21	8

У исследуемых штаммов методом количественной ПЦР было определено число встроившихся в геном гетерологичных генов и количество копий гена *cbh1* (Таблица 24). В качестве контроля использовался штамм *P. verruculosum* В1-537 [7].

Таблица 24 – Число копий генов *bgl1*, *cbh1* в рекомбинантных штаммах [7].

Ген	Штамм	Число копий	Относительное число копий*	Стандартная ошибка среднего относительного числа копий	Абсолютное число копий
<i>bgl1</i>	В1-537 (контроль)	0	0,00010	0,00001	0
	БГЛ-F10	7,85	1,00000	0,04886	7–8
	БГЛ-F12	1,66	0,21087	0,03598	2
<i>cbh1</i>	В1-537 (контроль)	1,01	0,99065	0,02799	1
	БГЛ-F10	1,00	0,98151	0,01224	1
	БГЛ-F12	1,02	1,00000	0,03583	1

Из представленных результатов количественной ПЦР (Таблица 24) следует, что в штамме «моно»-продуценте *P. verruculosum* БГЛ-F10, число копий гена *bgl1* в 3–4 раза больше, чем в штамме «гетеро»-продуценте [7].

Полученные данные показывают, что содержание БГЛ в ферментных препаратах БГЛ-F10 и БГЛ-F12 составляет 80% и 21%, соответственно, что пропорционально количеству копий гена

bgl1 в рекомбинантных штаммах *P. verruculosum* БГЛ-F10 и *P. verruculosum* БГЛ-F12 (7–8 копий и 2 копии). Данный эффект может объясняться титрованием положительных факторов транскрипции в штамме *P. verruculosum* F10, имеющего 8–9 копии промотора гена *cbh1*, что типично для грибных продуцентов [7, 74]. Этот вывод подтверждается тем, что количество копий гомологичного гена *cbh1* под собственным промотором во всех исследуемых штаммах одинаково и равно 1, а относительное количество белка ЦБГ1 в штаммах с гетерологичным геном *bgl1* падает [7].

Интересно, что содержание ЦБГ1, которая кодируется 1 копией гена *cbh1* в рекомбинантных штаммах, падает пропорционально увеличению содержания гетерологичного фермента. При этом всего 1 копия гена *cbh1* в реципиентном штамме приводит к максимальному содержанию ЦБГ1 [7].

Анализ данных Таблиц 23 и 24 показал также, что введение копий гетерологичного гена не приводит к увеличению общего секретируемого белка, а понижает его. Кроме того, степень снижения секреции белка не пропорциональна числу копий промотора. Это говорит о том, что титрование положительных факторов транскрипции является не единственным фактором снижения секретируемого белка [7].

Таким образом, при экспрессии целевых гетерологичных генов в рекомбинантных штаммах *P. verruculosum* эффект появления «моно»-продуцентов (содержание целевых ферментов до 50–80% от общего секретируемого белка и пониженный уровень секреции общего внеклеточного белка) объясняется, скорее всего, «токсическим» действием гетерологичных генов, что выражается в замещении гомологичных белков (ЦБГ и ЭГ) [7], а также нехваткой положительных факторов транскрипции для «обслуживания» дополнительных копий промотора *cbh1*.

Одним из возможных путей поддержания высокого уровня общей продуктивности рекомбинантных штаммов может служить клонирование и экспрессия положительных факторов транскрипции, среди которых можно отметить, по меньшей мере, три транскрипционных фактора – ClrA и ManR/ClrB [7, 59], XlnR [7, 60, 186] или их гомологи Clr1, Clr2 и Xyr1. Таким образом, необходимо изучить влияние данных транскрипционных активаторов на промотор *cbh1* и синтез целлюлаз в грибе *P. verruculosum* [7].

5.2.2 Влияние моно- и олигосахаридов на транскрипцию гена *cbh1* *P. verruculosum*

Кроме различий в наборах целлюлазных генов регулируемых ортологами генов транскрипционных факторов *xlnR*, *clr1* и *clr2* у разных видов мицелиальных грибов, также различается чувствительность к различным моно- и олигосахаридам, индуцирующим транскрипцию генов гликозил-гидролаз. Например, для гриба *A. niger* индуктором является

ксилоза, для многих представителей рода *Penicillium* некоторые дисахариды, такие как гентиобиоза и софороза, для *T. reesei* также софороза и лактоза [163, 187-189].

Из результатов количественной ПЦР (Рисунок 25) следует что целлобиоза, гентиобиоза и ксилоза индуцируют экспрессию гена *cbh1* уже через 75 мин культивирования *P. verruculosum*. Лактоза и трегалоза не индуцируют транскрипцию гена *cbh1* в течение всего эксперимента (3 ч). Влияние целлотриозы в смеси ЦОС 2–3 (смесь целлобиозы и целлотриозы) в проведенном опыте оценить трудно, можно лишь предположить, что максимальная индукция в данном случае обеспечивается целлобиозой.

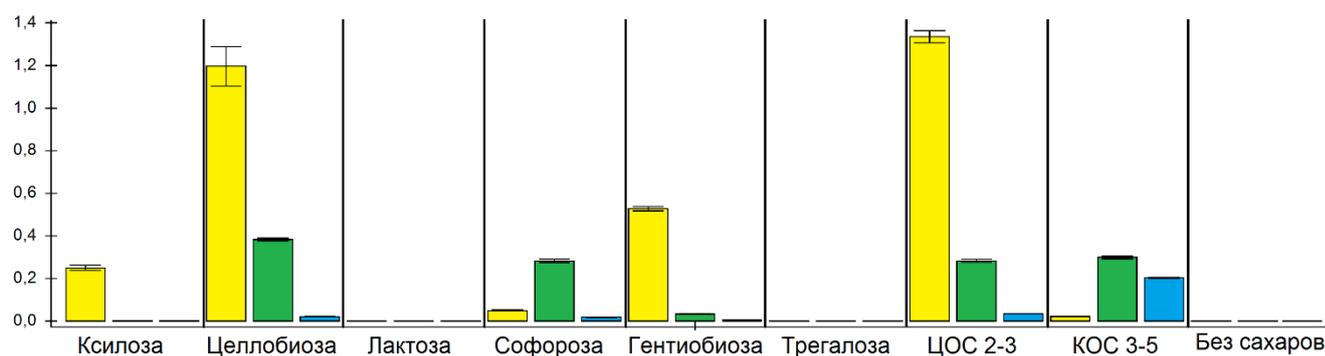


Рисунок 25 – Влияние моно- и олигосахаридов на экспрессию гена *cbh1* *P. verruculosum* через Жёлтый столбик – 75 мин, зелёный – 3 ч, синий – 5 ч культивирования гриба. Данные представлены как относительные уровни мРНК гена *cbh1*, нормализованные на уровни экспрессии генов *actA*, *tub2* и *gpdA* *P. verruculosum* [163].

Смесь ксилоолигосахаридов КОС 3–5 (ксилотриоза, ксилотетраоза и ксилопентаоза), по-видимому, также не индуцирует экспрессию гена *cbh1*, но продукты их гидролиза, такие как ксилоза и, возможно, ксилобиоза, работают как индукторы. Гидролиз ксилана в мицелиальных грибах осуществляется ксиланазами. Однако известно, что гомолог гена *cbh1* *P. verruculosum*, кодирующий целлобиогидролазу ХупА *P. funiculosum*, имеет ксиланолитическую активность [190].

Ранее было показано, что гомогенная ЦБГ1 *P. verruculosum* имеет ксиланазную активность [191]. Следовательно, под действием ЦБГ1 в *P. verruculosum* могут образовываться продукты гидролиза ксилана (ксилоза и ксилобиоза), индуцирующие экспрессию *cbh1* [163].

Таким образом, ещё одной вероятной причиной падения продуктивности у рекомбинантных штаммов «моно»-продуцентов может являться недостаток образования веществ-индукторов при культивировании на среде СФС (см. раздел 4.1.3.), поскольку снижается уровень содержания ЦБГ1 и ЦБГ2 в ферментативном комплексе, а следовательно и образование основного индуктора промотора *cbh1* – целлобиозы, образующейся из МКЦ в процессе ферментации.

5.3 Влияние транскрипционных факторов Clr1, Clr2, XlnR и TacA *P. verruculosum* на транскрипцию генов *cbh1*, *egl2* и *bgl1*

В настоящее время изучение функций транскрипционных факторов обычно проводят методами обратной генетики [60, 69, 73]. Таким образом, адаптировав систему редактирования генома CRISPR-Cas9 для гриба *P. verruculosum* получить штаммы с нокаутами генов клонированных нами транскрипционных факторов и определить последствия нокаутов на индукцию транскрипции основных целлюлаз (*cbh1*, *egl2* и *bgl1*) под действием индукторов промотора *cbh1* (см. раздел 5.2.2) являлось нашей следующей задачей.

5.3.1 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 (см. раздел 4.2.18.). В результате секвенирования клонированных фрагментов генов транскрипционных активаторов были получены их нуклеотидные последовательности (Приложение А-Г). 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 участки, кодирующие домен типа «Цинковый палец», который характерен для транскрипционных регуляторов у эукариот.

Было проведено сравнение полученных последовательностей с последовательностями транскрипционных факторов из базы данных NCBI «Non-redundant protein sequences» для грибов (Fungi taxid:4751) (Таблица 25).

Таблица 25 – Сравнение транслированных последовательностей клонированных генов транскрипционных факторов *P. verruculosum* с белковыми последовательностями из базы данных NCBI [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>].

Клонированный ген	Ближайший гомолог	Совпадение, %
<i>clr1</i>	C6 finger domain protein, putative [<i>Talaromyces marneffe</i> 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>Talaromyces cellulolyticus</i>] BAQ59099.1	90
	C6 transcription factor, putative [<i>Talaromyces marneffe</i> i ATCC 18224] XP_002151678.1	81
<i>xlnR</i>	Xylanolytic transcriptional activator xlnR [<i>Talaromyces marneffe</i> i PM1] KFX43185	91

	Xylanolytic transcriptional activator xlnR [<i>Talaromyces pinophilus</i>] KAF3401166.1	93
<i>tacA</i>	aceA like protein [Talaromyces pinophilus] BAQ59092.1	94
	C2H2 transcription factor (Ace1), putative [Talaromyces marneffeii ATCC 18224] Sequence ID: XP_002153476.1	92

Таким образом, полные кодирующие части генов *P. verruculosum* оказались гомологичны генам активаторов транскрипции *clr1*, *clr2* и *xlnR*. Ген *tacA* также, как и ген *tacA T. celluloliticus* [73], был гомологичен гену транскрипционного фактора Ace1.

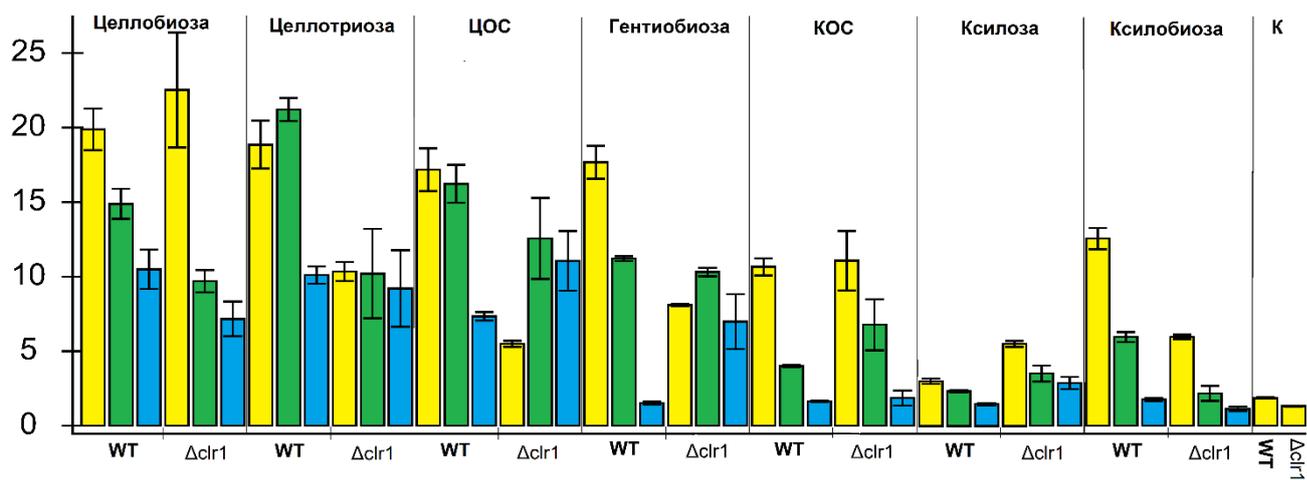
5.3.2 Влияние нокаута гена *clr1* на транскрипцию генов *cbh1*, *egl2*, *bgl1*

Для нокаута гена *clr1* была использована методика, апробированная на нокауте гена *cbh1* (см. раздел 5.1.4). Для этого плазида pGCCR1 (см. раздел 4.2.20) была использована для трансформации штамма *P. verruculosum* B1-221-151. В результате трансформации, на селективной среде с хлоратом натрия и хлоридом аммония было получено 5 трансформантов, из которых в 4-х не наблюдалось роста на среде с нитратом натрия. Для всех клонов было проведено секвенирование фрагмента гена *clr1* (см. раздел 4.2.21) два из них содержали мутацию в месте двухцепочечного разрыва ДНК нуклеазой Cas9: у клона 1 произошла вставка одного нуклеотида, что привело к сдвигу ОРС, у клона 3, произошла делеция 15 нуклеотидов, что не привело к сдвигу ОРС, хотя это привело к потере 5 АК в белке, что может быть функционально значимым. (Рисунок 26).

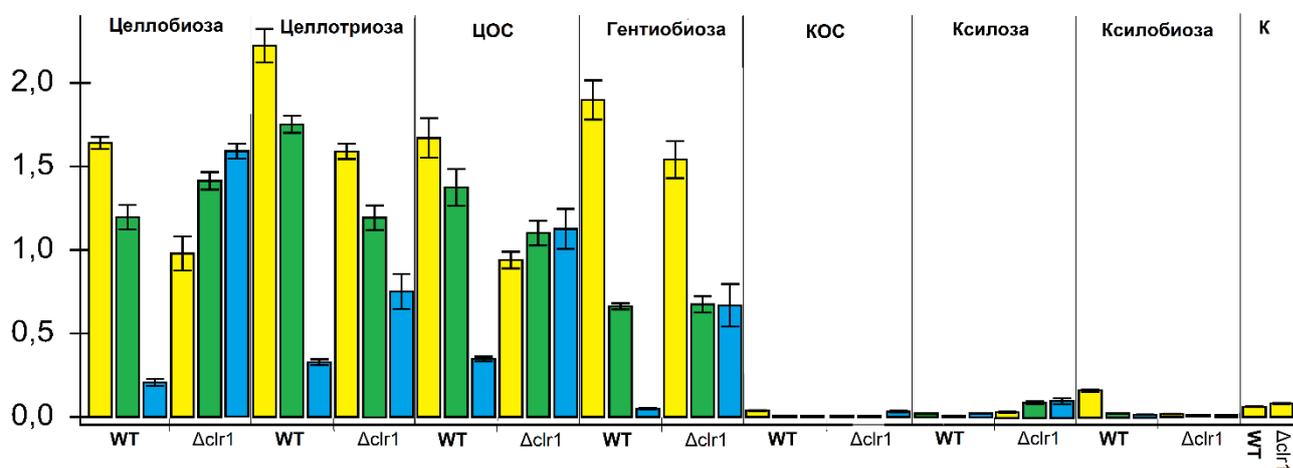
	PAM	protospacer
<i>clr1</i> wt	acaatgagcaagcgtcctcac	gaagattctgtcttctcaaaagactgccaact
1	ACAATGAGCAAGCGTCCTCAC	A GAAGA TCTGTCTTCTCAAAGACTGCCAACT
2	ACAATGAGCAAGCGTCCTCAC	GAAGATTCTGTCTTCTCAAAGACTGCCAACT
3	ACAATGAGCAAGCGTCCT	-----TTCTCAAAGACTGCCAACT
4	ACAATGAGCAAGCGTCCTCAC	GAAGATTCTGTCTTCTCAAAGACTGCCAACT
5	ACAATGAGCAAGCGTCCTCAC	GAAGATTCTGTCTTCTCAAAGACTGCCAACT

Рисунок 26 – Выравнивание последовательностей фрагментов гена *clr1 P. verruculosum* в месте редактирования нуклеазой Cas9

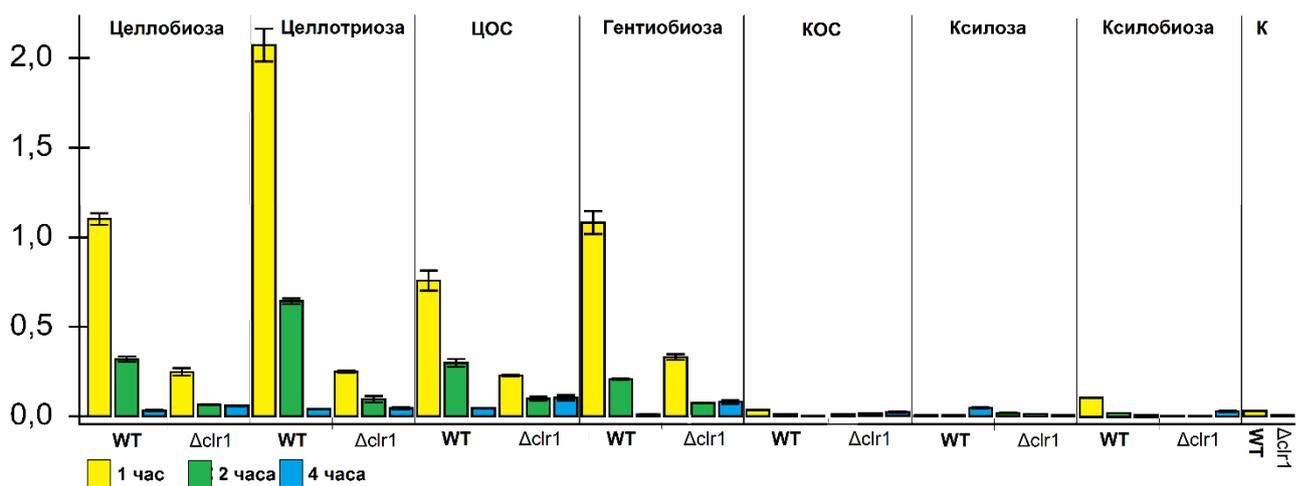
Для изучения влияния нокаута гена *clr1* на транскрипцию генов *cbh1*, *bgl1* и *egl1* методом количественной ПЦР был выбран клон №1. Результаты определения уровней транскрипции генов при культивировании штамма на среде с индукторами (см. раздел 5.2.2), показаны на Рисунке 27.



А



Б



В

Рисунок 27 – Нормализованная относительная транскрипция генов *clr1* (А), *bgl1* (Б) и *egl2* (В) в штамме *P. verruculosum* $\Delta clr1$ и исходном штамме *P. verruculosum* В1-221-151 (WT). Ось Y – относительная нормализованная транскрипция, К – контрольные пробы без добавления индукторов

Результаты количественной ПЦР показали, что нокаут гена *clr1* слабо влияет на транскрипцию генов *cbh1* и *bgl1* (Рисунок. 41А, Б). В то же время, для гена *egl2* наблюдается значительное падение уровня транскрипции под действием всех исследованных индукторов от 3 до 8 раз в зависимости от индуктора. В целом, при оценке транскрипции генов *egl2* и *bgl1* следует отметить полное отсутствие их индукции ксилобиозой и ксилозой в исходном штамме В1-221-151.

Полученные результаты показывают, что транскрипционный фактор Clr1 у *P. verruculosum* в отличие от своего гомолога в *N. crassa* [69] не столь важен для транскрипции всех генов ферментов целлюлазного комплекса и активирует, главным образом, только транскрипцию гена *egl2*, подобно своему гомологу в *A. niger* [60]

5.3.3 Влияние нокаута гена *clr2* на транскрипцию генов *cbh1*, *egl2*, *bgl1*

Для нокаута гена *clr2*, кодирующего транскрипционный фактор Clr2, штамм *P. verruculosum* В1-221-151 был трансформирован плазмидами p5SniaD и pGCCR2 (см. раздел 4.2.20). В результате трансформации, на селективной среде с хлоратом натрия и хлоридом аммония было получено 13 трансформантов, в которых не наблюдалось роста на среде с нитратом натрия. Для всех клонов было проведено секвенирование фрагмента гена *clr2* (см. раздел 4.2.21) и 7 из них содержали мутацию в месте двухцепочечного разрыва ДНК нуклеазой Cas9, при этом все мутации приводили к сдвигу фазы ОРС (Рисунок 28):

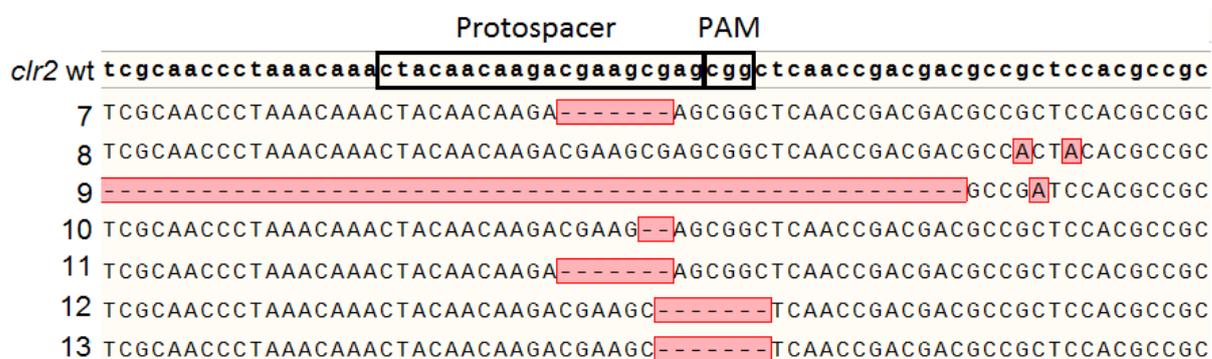


Рисунок 28 – Выравнивание последовательностей фрагментов гена *clr2* *P. verruculosum* в месте редактирования нуклеазой Cas9

Клон №11 был использован для изучения влияния нокаута гена *clr2* на транскрипцию генов *clr1*, *bgl1* и *egl2* методом количественной ПЦР (см. раздел 4.2.5) (Рисунок 29).

Наблюдаемые эффекты при нокауте гена *clr2* у *P. verruculosum* оказались нетипичны, поскольку в таких мицелиальных грибах как *A. niger* [60], *P. oxalicum* [81] и *N. crassa* [69] было показано, что гомологи *clr2* строго необходимы для индукции целлюлолитического ответа и нокаут *clr2* приводит к практически полному подавлению экспрессии целлюлаз. Однако данные количественной ПЦР показали, что нокаут гена *clr2* в *P. verruculosum* приводит лишь к задержке транскрипции генов *cbh1* и *bgl1* (Рисунок 29А, Б) при индукции целлотриозой и гентиобиозой в случае *cbh1* и при индукции целлобиозой, целлотриозой и ЦОСами для *bgl1*. В то же время, уровень транскрипции гена *egl2* при нокауте гена *clr2* (Рисунок 29В) значительно снизился (от 5 раз на целлотриозе до практически полной потери индукции на гентиобиозе), но практически не изменился под действием ЦОС. Эти результаты свидетельствуют о необходимости фактора Clr2 для экспрессии гена *egl2*.

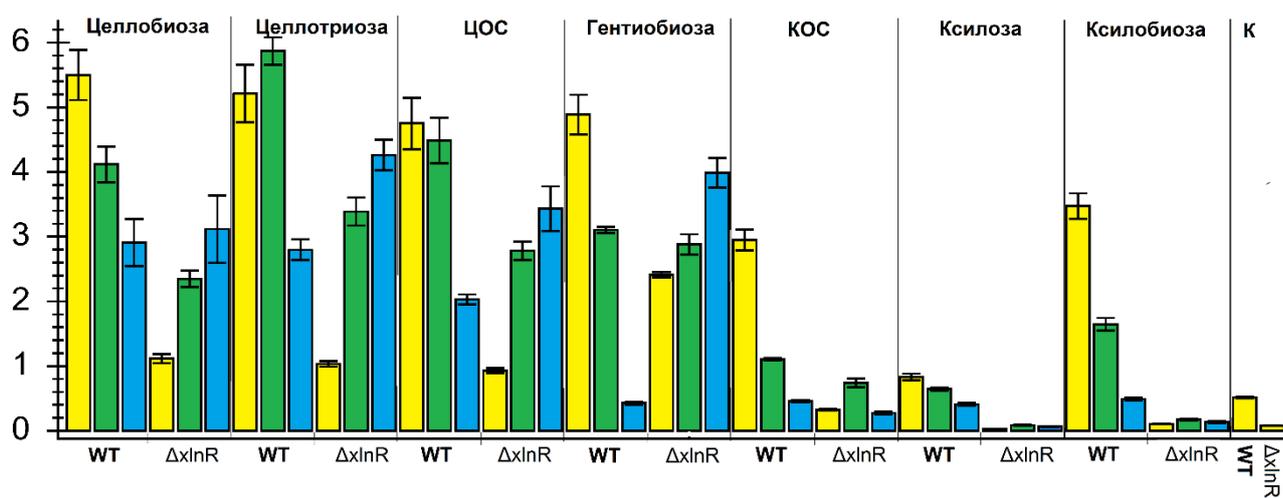
5.3.4 Влияние нокаута гена *xlnR* на транскрипцию генов *cbh1*, *egl2* и *bgl1*

Для нокаута гена *xlnR*, кодирующего транскрипционный фактор XlnR, штамм *P. verruculosum* В1-221-151 был трансформирован плазмидами р5SniaD и рGCX (см. раздел 4.2.20). В результате, на селективной среде с хлоратом натрия и хлоридом аммония было получено 10 трансформантов, из которых 7 были не способны утилизировать нитратный азот в качестве источника. В результате секвенирования (см. раздел 4.2.21) было установлено, что 6 клонов содержали мутацию в месте двухцепочечного разрыва ДНК нуклеазой Cas9, но лишь у одного клона №8 мутация привела к сдвигу рамки считывания (Рисунок 30) [192].

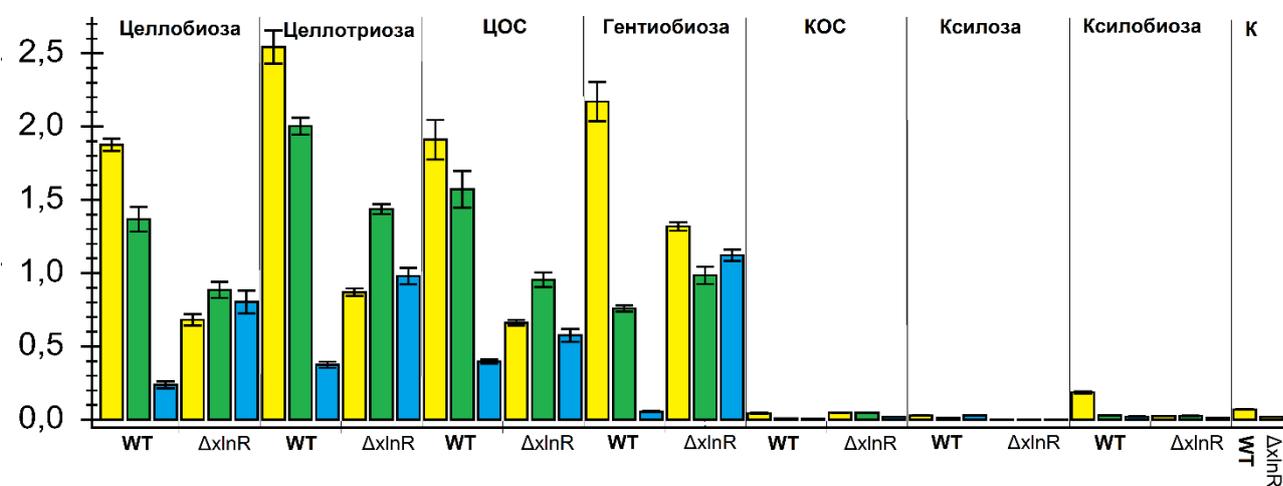
	protospacer		PAM
<i>xlnR</i> wt	ggtattcgcaagcattctgctgatacgg	ttg	cggtacgccggcggatt
2	GGTATTCGCAAGCATTCTGGTGATACGG	TTGCGGTACGCCGGC	GGATT
3	GGTATTCGCAAGCATTCTGCTGATACGG	TTGCGGTACGCCGGC	GGATT
4	GGTATTCGCAAGCATTCTGGTGATACGG	TTGCGGTACGCCGGC	GGATT
6	GGTATTCGCAAGCATTCTGGTGATACGG	TTGCGGTACGCCGGC	GGATT
7	GGTATTCGCAAGCATTCTGGTGATACGG	TTGCGGTACGCCGGC	GGATT
8	GGTATTCGCAAGCATTCTGGTGATACGGG	TTGCGGTACGCCGGC	GGATT
10	GGTATTCGCAAGCATTCTGGTGATACGG	TTGCGGTACGCCGGC	GGATT

Рисунок 30 – Выравнивание последовательностей фрагментов гена *xlnR* *P. verruculosum* в месте действия нуклеазы Cas9

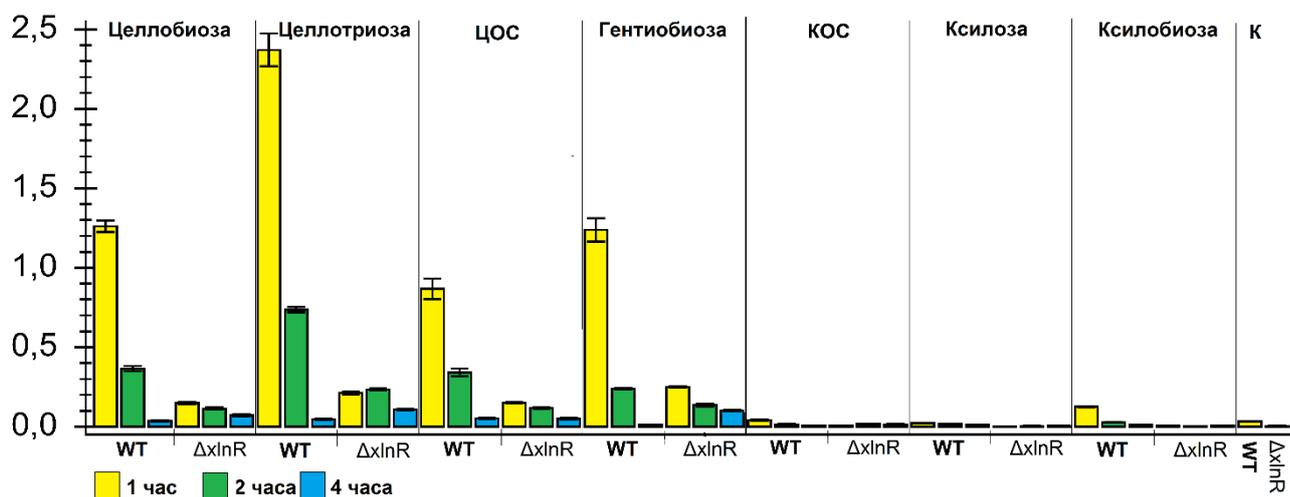
У клона №8 в гене *xlnR* было определено изменение транскрипция генов основных целлюлаз *cbh1*, *bgl1* и *egl2* на минимальной среде в присутствии индукторов (см. раздел 5.2.2) относительно исходного штамма (Рисунок 31).



А



Б



В

Рисунок 31 – Нормализованная относительная транскрипция генов *cbh1* (А), *bgl1* (Б) и *egl2* (В) у штамма *P. verruculosum* $\Delta xlnR$ и исходного штамма В1-221-151 (WT). Ось Y – относительная нормализованная транскрипция, К – контрольные образцы без добавления индукторов [192]

Из данных количественной ПЦР следует, что транскрипционный активатор XlnR участвует в активации транскрипции всех исследуемых генов. Однако снижение уровня транскрипции гена и *egl2* в штамме ΔxlnR было более значительно, чем в случае генов *cbh1* и *bgl1* при добавлении всех использованных индукторов.

Для гена *cbh1* также было характерно, что в штамме ΔxlnR полностью пропадал эффект индукции ксилозой и ксилобиозой (Рисунок 31А), а пик индукции целлобиозой, целлотриозой, ЦОС 3-5 и гентиобиозой сместился с 1 часа на 4 часа после их добавления, то есть процесс индукции замедлился. Небольшое повышение 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, было установлено, что транскрипционный фактор XlnR участвует в активации транскрипции генов основных целлюлаз у *P. verruculosum* также как у *T. reesei* и *P. oxalicum* [65 – 67], но лишь экспрессия гена *egl2* драматически снижается при его отсутствии, тогда как транскрипции генов *cbh1* и *bgl1*, поддерживается за счёт участия других транскрипционных факторов [192].

5.3.5 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 решено проверить влияние их конститутивной экспрессии на активность ферментативного комплекса *P. verruculosum*. Например, таким способом в мицелиальном грибе *N. crassa* были определены роли транскрипционных факторов Clr1 и Clr2 в активации экспрессии целлюлаз [70]. Конститутивная экспрессия ТФ позволяет избежать влияния регуляции их собственной экспрессии, а также может продемонстрировать, есть ли эффекты от увеличения их внутриклеточного титра.

Для конститутивной экспрессии активаторов генов Clr1, Clr2 и XlnR, в мицелиальном грибе *P. verruculosum* были получены плазмиды (Рисунок 32), в которых соответствующие гены находятся под контролем промотора гена *gpdA P. verruculosum*.

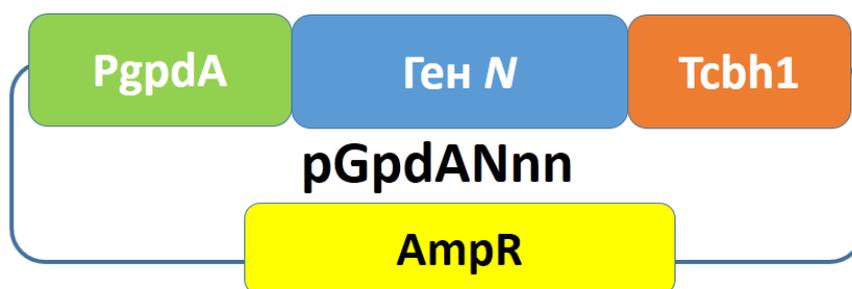


Рисунок 32 – Общая схема плазмид pGpdAClr1, pGpdAClr2 и pGpdAXlnR, где ген X соответственно *clr1*, *clr2*, *xlnR*

Полученные плазмиды pGpdAClr1, pGpdAClr2 и pGpdAXlnR были использованы для котрансформации штамма *P. verruculosum* В1-537 с плазмидой pSTA-10 (см. раздел 4.2.7.). В каждом случае было получено ~ 60 трансформантов, 30 из которых были проверены ПЦР скринингом (см. раздел 4.2.2.) на наличие вставок – генов *clr1*, *clr2*, *xlnR* (Рисунок 33).

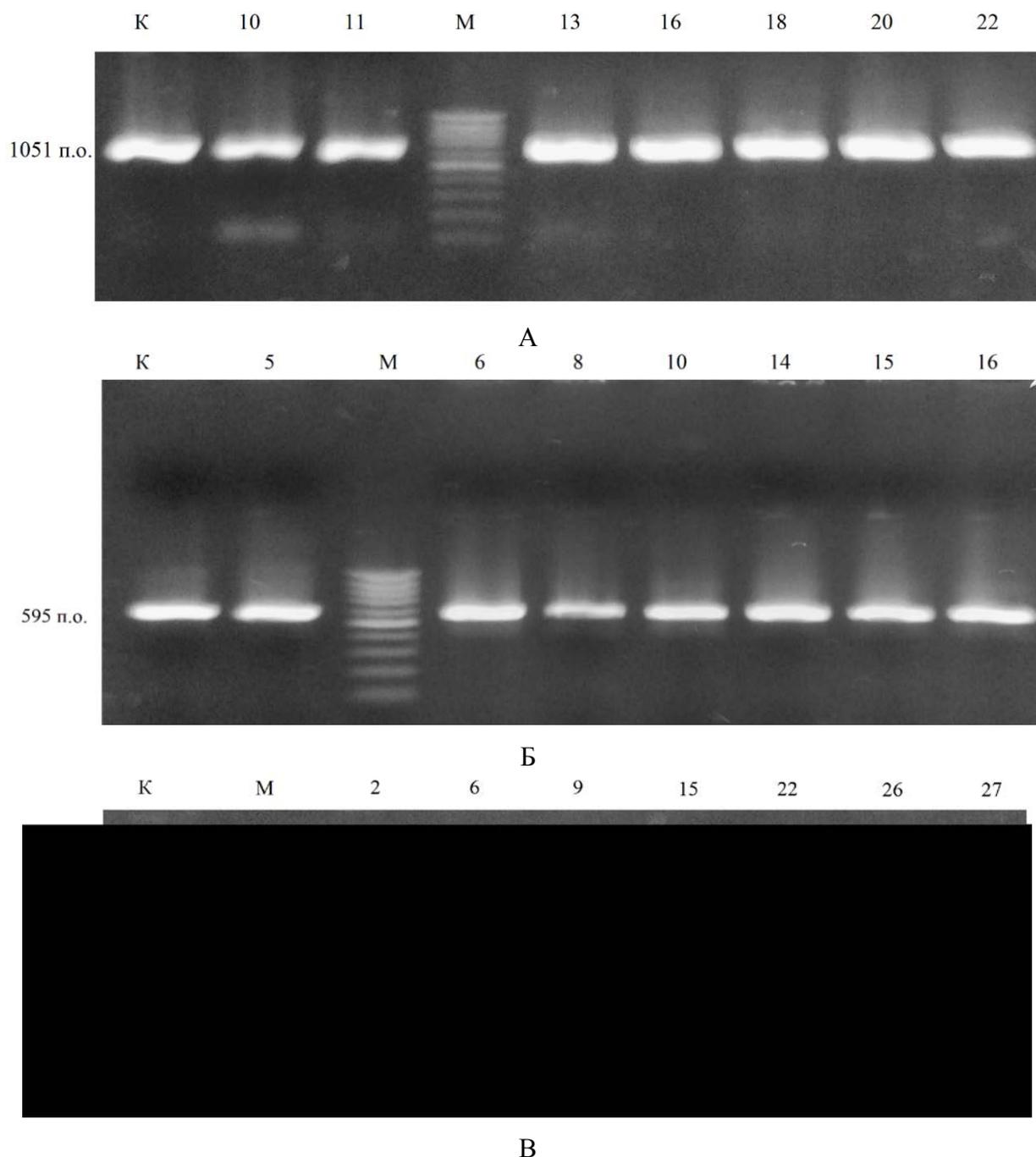


Рисунок 33 – ПЦР скрининг трансформантов *P. verruculosum* на встраивание генов *clr1* (А), *clr2* (Б) и *xlnR* (В) под контролем *gpdA* промотора (показана только часть положительных проб). К –

ПЦР продукт, полученный при использовании для амплификации в качестве матрицы плазмиды pGpdAClr1, pGpdAClr2 и pGpdAXlnR соответственно. М – маркер ДНК, нумерация по номерам

Из полученных рекомбинантных клонов серий *P. verruculosum* В1-С1 (с экспрессией ТФ Clr1), *P. verruculosum* В1-С2 (с экспрессией ТФ Clr2) и *P. verruculosum* В1-Х (с экспрессией ТФ XlnR) было выбрано по три клон, которые были названы как В1-С1-11, В1-С1-13, В1-С1-22, В1-С2-6, В1-С2-8, В1-С2-15, В1-Х-2, В1-Х-9, В1-Х-27. Данные клоны культивировались в колбах по стандартной схеме с отбором образцов КЖ на 3 – 6 сутки культивирования (см. разделы 4.1.3., 4.2.11). В отобранных пробах была определена концентрация белка (см. раздел 4.2.13) (Рисунок 34).

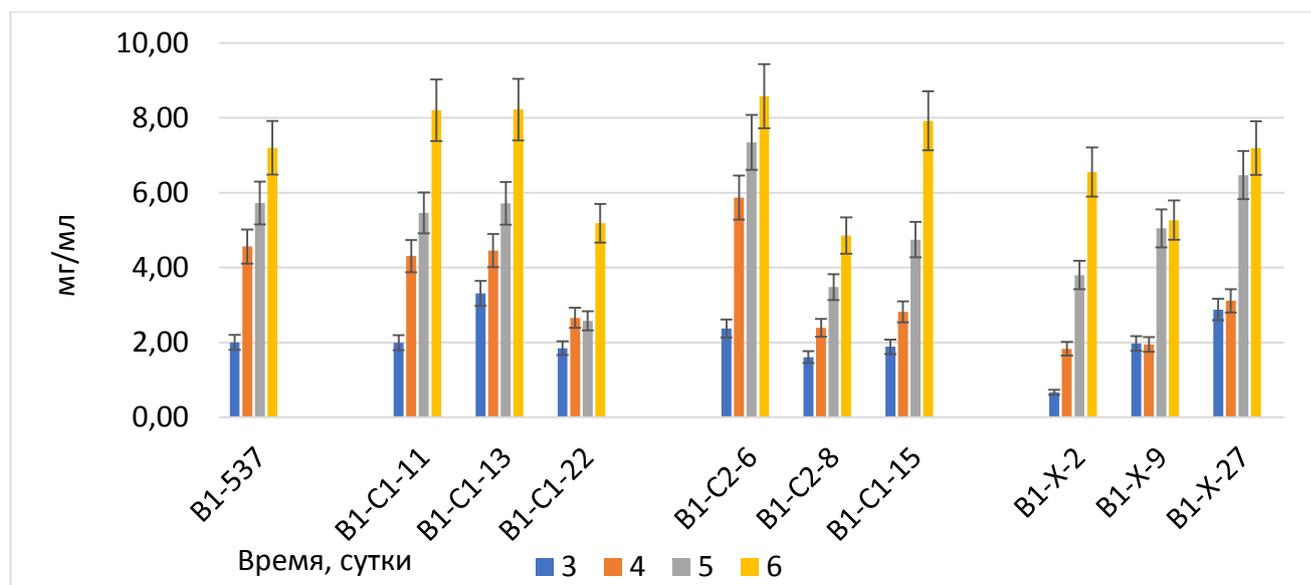


Рисунок 34 – Концентрации белка в КЖ клонов с конститутивной экспрессией генов *clr1*, *clr2* и *xlnR* при культивировании в колбах на 3 – 6- сутки

Данные о концентрации белка в КЖ показывают, что конститутивная экспрессия генов *clr1* и *clr2* немного увеличивают (в 1,1 и 1,2 раза соответственно) концентрацию белка, в то время как экспрессия гена *xlnR* не оказала влияния на концентрацию белка. Затем для культивирования в ферментёрах в стандартных условиях для *P. verruculosum* В1 (см. разделы 4.1.3., 4.2.13) было отобрано по одному штамму для каждого ТФ.

При культивировании в ферментерах штаммов штаммов *P. verruculosum* В1-С1-11, В1-С2-15, В1-Х-27 и контрольного штамма *P. verruculosum* В1-537 КЖ отбирались каждые 24 часа начиная со 2-х суток ферментации. В них были определены концентрация белка (см. раздел 4.2.13) (Рисунок 35) и основные ферментативные активности (см. раздел 4.2.16) (Рисунок 36).

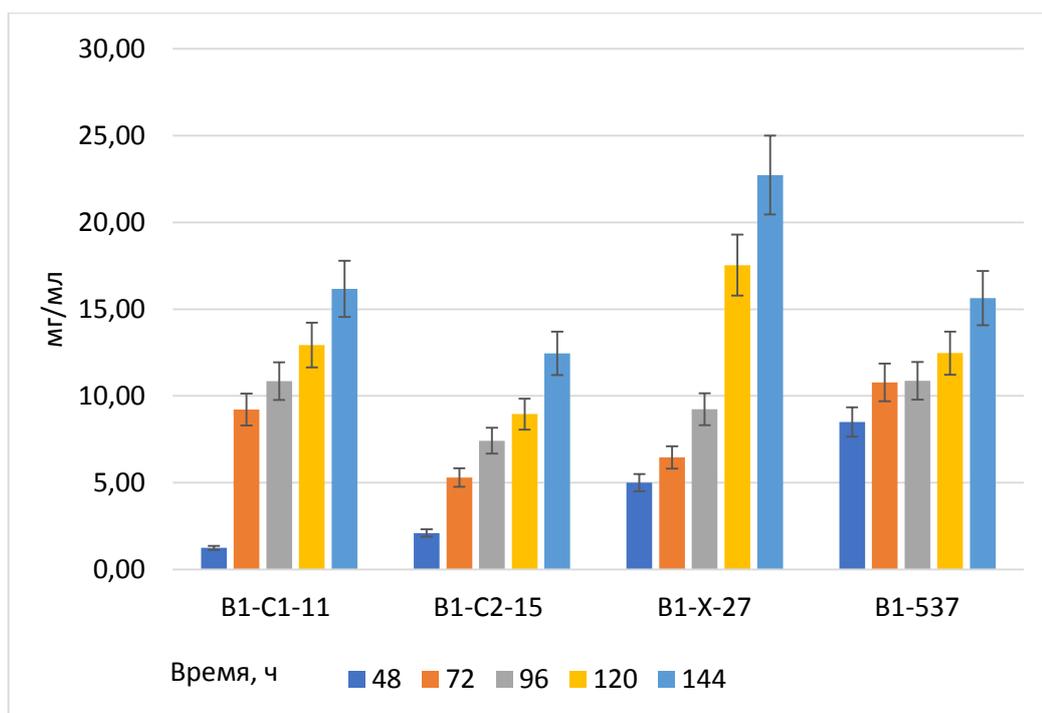
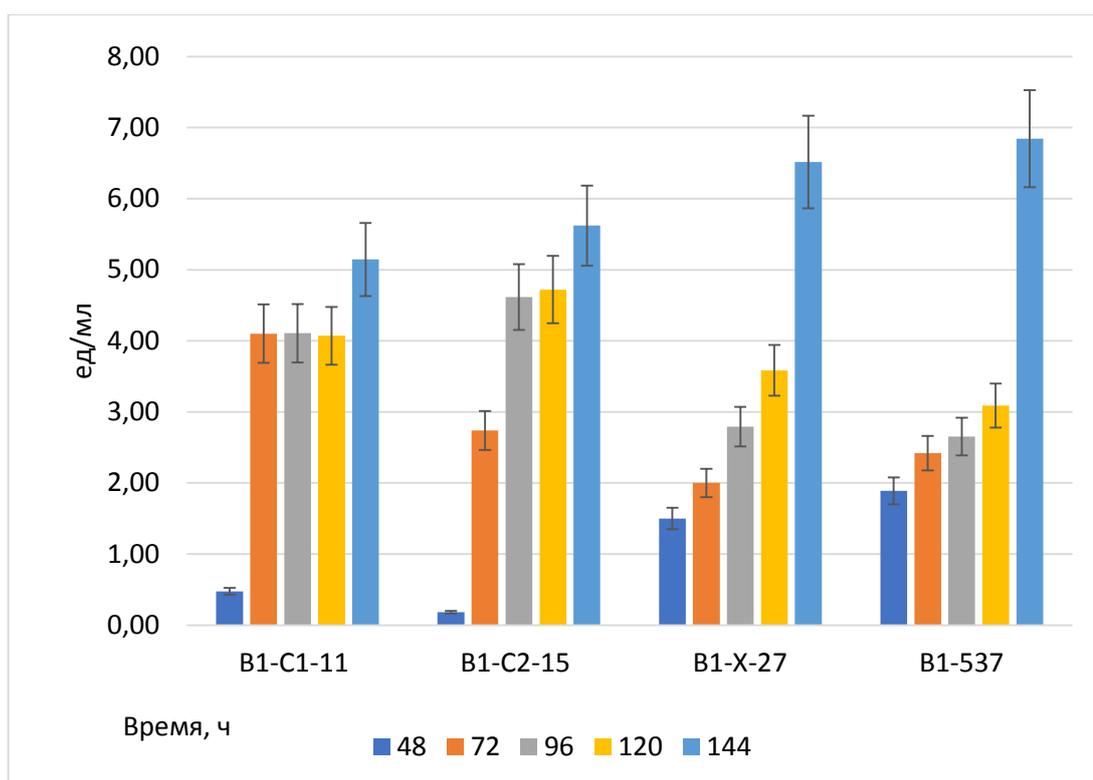
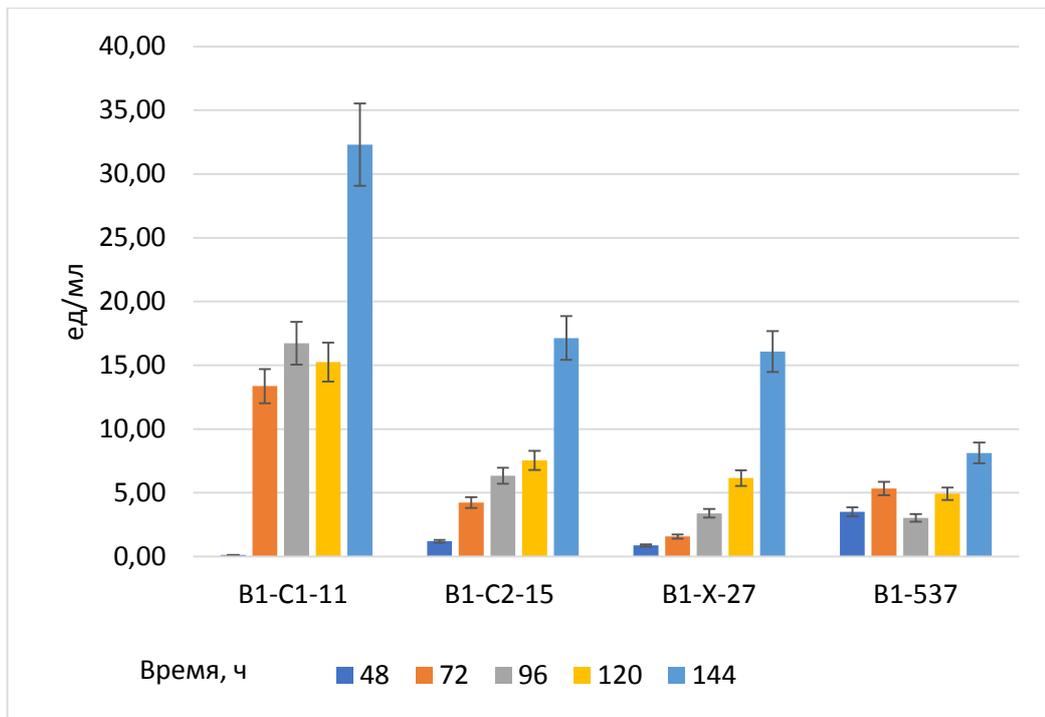


Рисунок 35 – Концентрация белка в КЖ штаммов *P. verruculosum* B1-C1-11, B1-C2-15, B1-X-27, *P. verruculosum* B1-537, отобранных в динамике на 72, 96, 120 и 144 часа культивирования



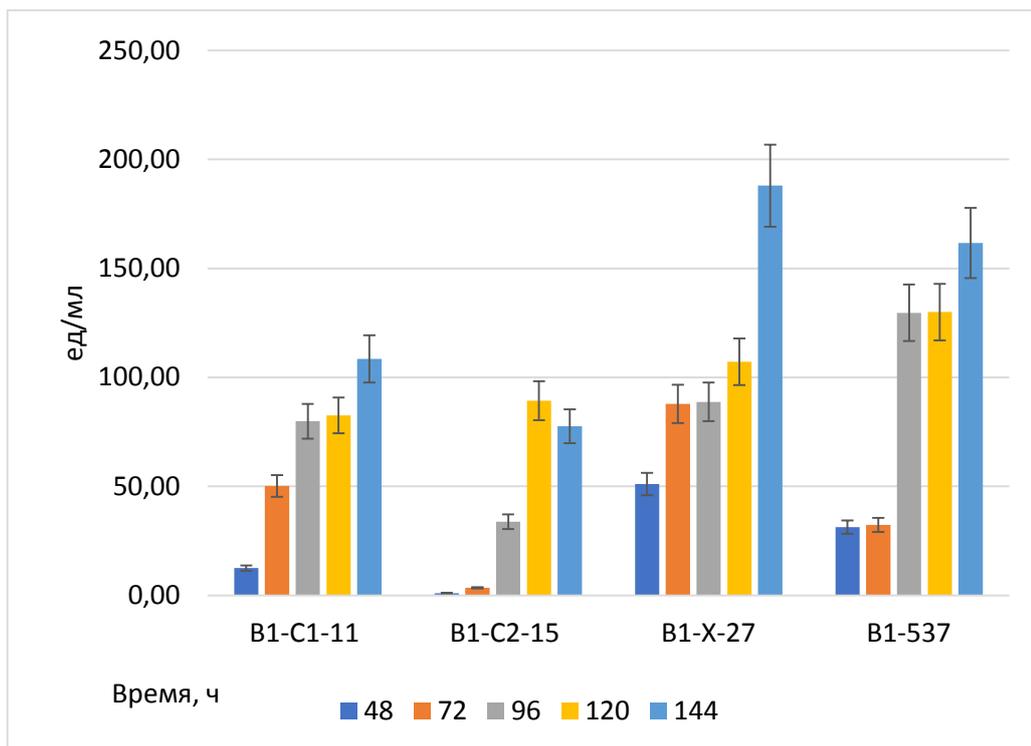
*При 40 °С, рН 5,0

А



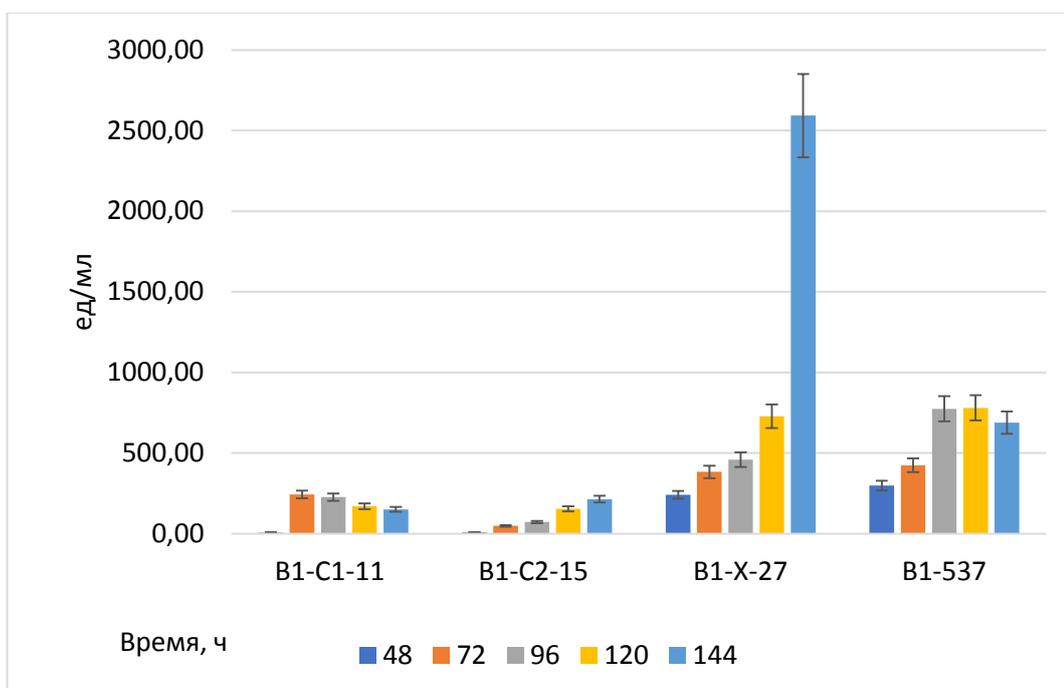
*При 40 °С, рН 5,0

Б



*При 50 °С, рН 5,0

В



*При 50 °С, рН 5,0

Г

Рисунок 36 – Целлобиогидролазная (А), β -глюкозидазная (Б), эндоглюканазная (В) и ксиланазная (Г) активности в КЖ штаммов *P. verruculosum* В1-С1-11, В1-С2-15, В1-Х-27, *P. verruculosum* В1-537, отобранных в динамике на 48, 72, 96, 120 и 144 часа от начала культивирования

Результаты измерений концентрации белка (Рисунок 35) показывают, что у штаммов *P. verruculosum* В1-С2-15 и В1-С1-11 концентрация белка остаётся на таком же уровне, а у штамма В1-Х-27 увеличивается в 1,4 раза. Конститутивная экспрессия ТФ Clr1 и ТФ Clr2 ТФ XlnR привели к увеличению к 144 часу культивирования β -глюкозидазной активности в 4, 2 и 2 раза соответственно (Рисунок 36Б). Авицелазная активность у штаммов В1-С1-11, В1-С2-15 и В1-Х-27 существенно не изменилась.

Только конститутивная экспрессия гена *xlnR* привела к повышению эндоглюканазной активности в 1,2 раза, а ксиланазной в 3,8 раза. Эти результаты также согласовываются с падением транскрипции гена *egl2* в штамме *P. verruculosum* Δ *xlnR*. Это показывает, что транскрипционный фактор XlnR у гриба *P. verruculosum* активирует главным образом экспрессию ксиланаз и эндоглюканазы, не оказывая решающего влияния на экспрессию остальных целлюлаз, хотя он необходим для активации транскрипции гена *cbh1* за счет ксилосахаридов.

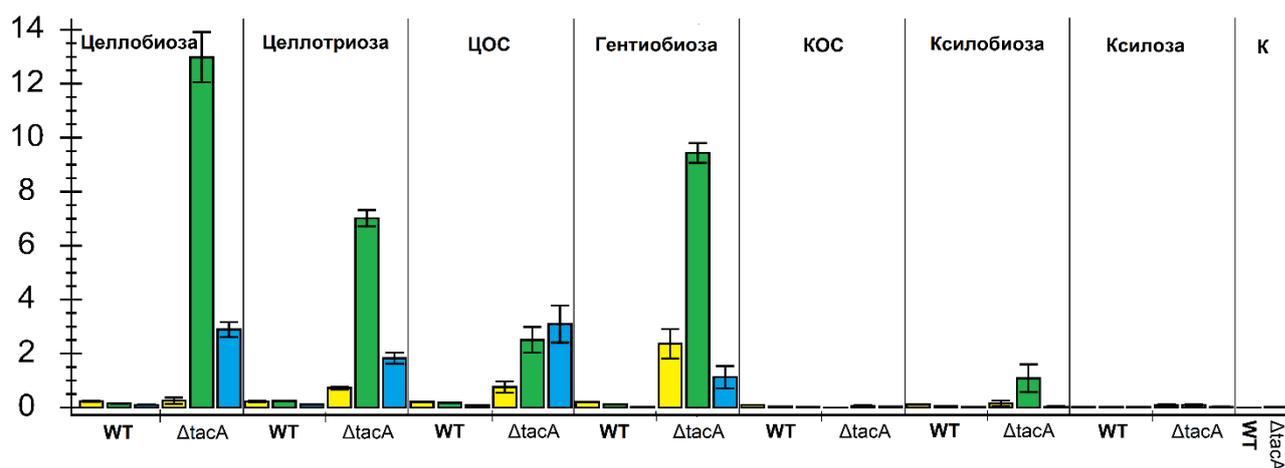
5.3.6 Влияние нокаута гена *tacA* на транскрипцию генов *cbh1*, *egl2* и *bgl1*

Для нокаута гена *tacA* штамм *P. verruculosum* B1-221-151 был трансформирован плазмидами pGCT (см. раздел 4.2.20) и p5SniaD. В результате трансформации, на селективной среде с хлоратом натрия и хлоридом аммония было получено более 12 трансформантов, из которых 7 не росли на среде с нитратом натрия. Для трёх клонов было проведено секвенирование (см. раздел 4.2.21) фрагмента гена *tacA* и два из них содержали мутацию в месте двухцепочечного разрыва ДНК нуклеазой Cas9, но лишь у клона №10 мутация привела к сдвигу рамки считывания (Рисунок 37).

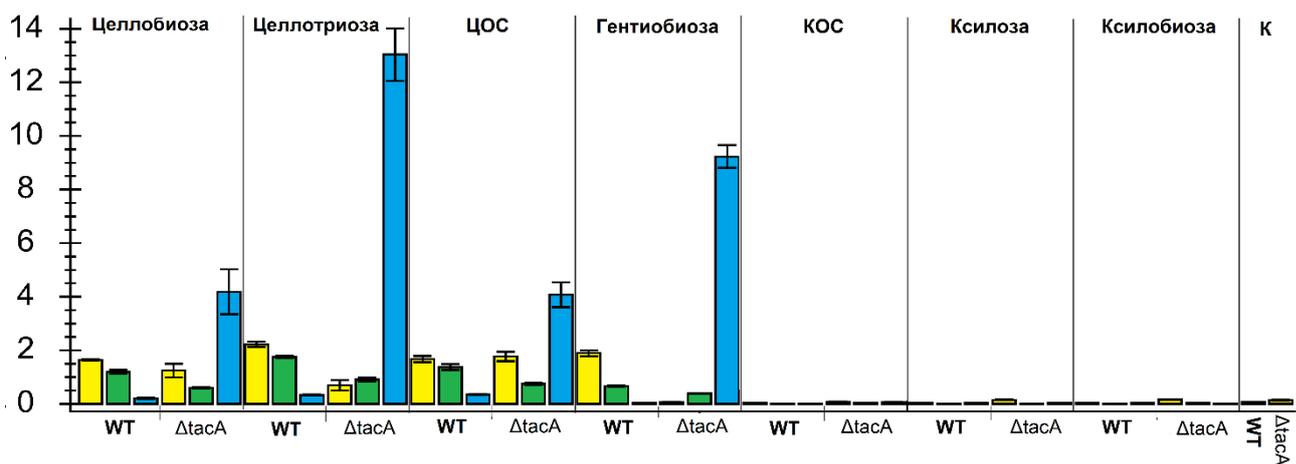
		PAM	protospacer	
<i>tacA wt</i>	tcatggaccggaaggaa	agtgt	accttcacctattgtcctcttcaaagtctgccagaagcaacag	
1	TCATGGACCGGAAGGAA	AGTGTACCTTCCCTATTGTCTCTTCAAAGTCTGCCAGAAGCAACAG		
8	TCATGGACCGGAaGGAA	GGG-----TATTGTCTCTTCAAAGTCTGCC		
10	TCATGGACCGGAAGGAA	AGTGTACCTTCCCT--TGTCCTCTTCAAAGTCTGCCAGAAGCAACAG		

Рисунок 37 – Выравнивание последовательностей фрагментов гена *tacA P. verruculosum* в области редактирования нуклеазой Cas9

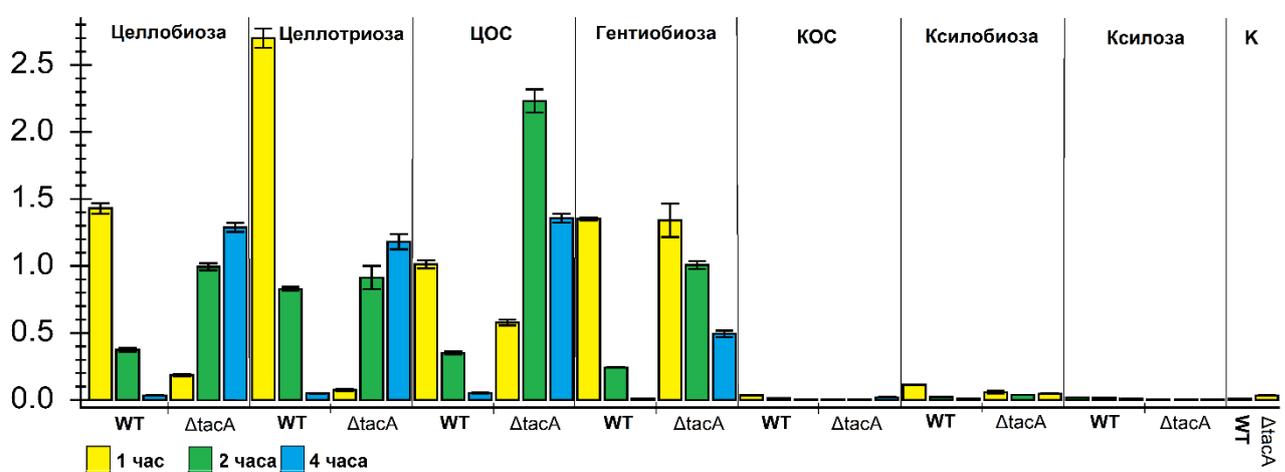
Далее полученный клон с нокаутом гена *tacA* был использован для анализа изменения транскрипции генов *cbh1*, *bgl1* и *egl1* методом количественной ПЦР (см. раздел 4.2.5) в присутствии ранее установленных индукторов транскрипции гена *cbh1* (см. раздел 5.2.2) для исходного штамма *P. verruculosum* B1-221-151 [162] (Рисунок 38).



А



Б



В

Рисунок 38 – Нормализованная относительная транскрипция генов *cbh1* (А), *bgl1* (Б) и *egl2* (В) у штамма $\Delta tacA$ и исходного штамма В1-221-151 (WT). Ось Y – относительная нормализованная транскрипция, К – контрольные пробы без добавления сахаров.

В штамме с нокаутом гена *tacA* наблюдается резкий рост уровня транскрипции гена *cbh1* уже через 2 ч после начала индукции целлобиозой, целлотриозой, смесью ЦОС, а также гентиобиозой в сравнении с транскрипцией гена *cbh1* в исходном штамме. Наибольшее увеличение транскрипции *cbh1* наблюдается при индукции целлобиозой через 2 ч, что является характерным для *P. verruculosum* [172]. Динамика увеличения транскрипции гена *cbh1* в штамме с нокаутом гена *tacA* при воздействии различных индукторов отличается: в случае индукции целлобиозой, целлотриозой и гентиобиозой максимальная транскрипция наблюдается через 2 ч, а через 4 ч уровень транскрипции падает. Однако при индукции штаммов смесью ЦОС наблюдается небольшое увеличение транскрипции гена *cbh1* после 4 ч индукции. По-видимому, это связано с образованием дополнительной целлобиозы из смеси ЦОС, в которой присутствует

незначительное количество примесей целлоолигосахаридов с степенью полимеризации от 4 до 6, под действием собственного комплекса целлюлолитических ферментов (ЦБГ1, ЭГ и БГЛ).

Полученные данные свидетельствуют о негативном влиянии транскрипционного фактора TасА на транскрипцию гена *cbh1*, несмотря на его высокую гомологию с TасА *T. cellulolyticus*, где по литературным данным он оказывал активирующий эффект [73]. Интересно, что в другом литературном источнике [72] транскрипционный фактор Ace1, гомолог TасА, позиционируется как репрессор транскрипции целлюлаз в *T. reesei*.

Ксилоолигосахариды, ксилобиоза и ксилоза в штамме Δ*tacA* так же, как и в исходном штамме В1-221-151 практически не индуцируют транскрипцию *cbh1*. В случае ксилобиозы через 2 ч наблюдается незначительное повышение транскрипции *cbh1* в штамме Δ*tacA*, однако значения относительной нормализованной экспрессии очень малы в сравнении со значениями при индукции целлобиозой и ЦОС (Рисунок 38А).

В случае гена *bgl1* (Рисунок 38Б) в штамме Δ*tacA* также наблюдается значительное увеличение уровня транскрипции особенно при добавлении целлотриозы и гентиобиозы, но в отличие от гена *cbh1* её резкий рост начинается только через 4 часа после добавления индукторов.

В случае гена *egl2* (Рисунок 38В), при нокауте гена *tacA* значительных изменений уровня транскрипции не наблюдалось, кроме варианта с индукцией ЦОС, где транскрипция несколько увеличилась. В то же время явно прослеживается тенденция к задержке индукции целлобиозой, целлотриозой и ЦОС. Вероятно, ТФ TасА не оказывает на его транскрипцию репрессирующего действия как в случае с генами *cbh1* и *bgl1*.

5.3.7 Влияние нокаута гена *tacA* на активность ферментного комплекса *P. verruculosum* в процессе биосинтеза ЦБГ1, ЭГ и БГЛ

Поскольку нокаут гена *tacA* привел к значительному усилению транскрипции генов *cbh1* и *bgl1* из чего следует, что ТФ TасА выполняет функции негативного регулятора подобно своему гомологу Ace1 в *T. reesei* [70], то было решено провести культивирование штамма *P. verruculosum* Δ*tacA* на ферментационной установке, для оценки изменения основных активностей ферментативного комплекса нового штамма в динамике. Электрофореграмма образцов КЖ представлена на Рисунке 39, значения концентрации белка в КЖ и основных ферментативных активностей на 2 – 6 сутки культивирования штамма *P. verruculosum* Δ*tacA* представлены на Рисунках 40 и 41 соответственно.

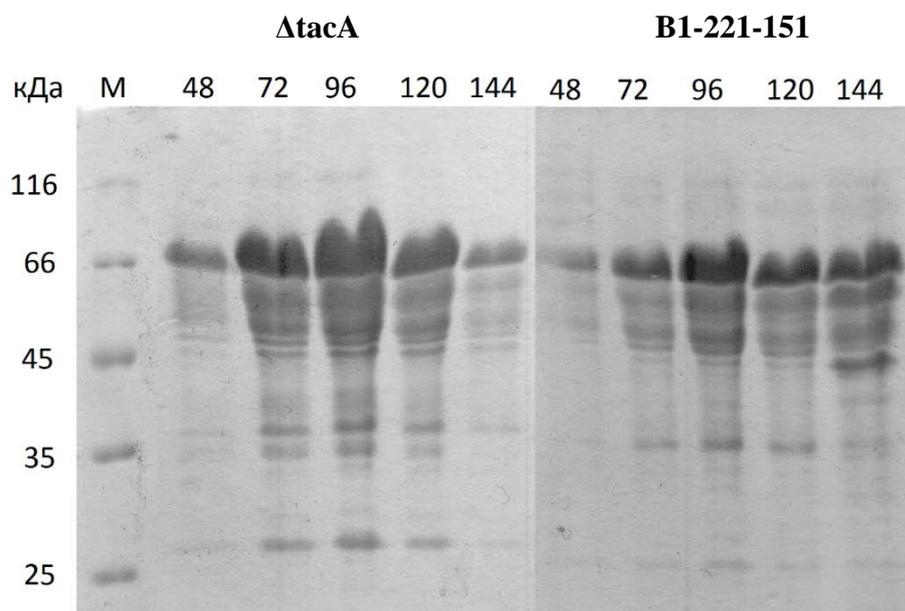


Рисунок 39 – Электрофореграмма образцов КЖ объёмом 5 мл при культивировании на ферментационной установке штаммов *P. verruculosum* $\Delta tacA$ и *P. verruculosum* B1-221-151 через 48 – 144 часа

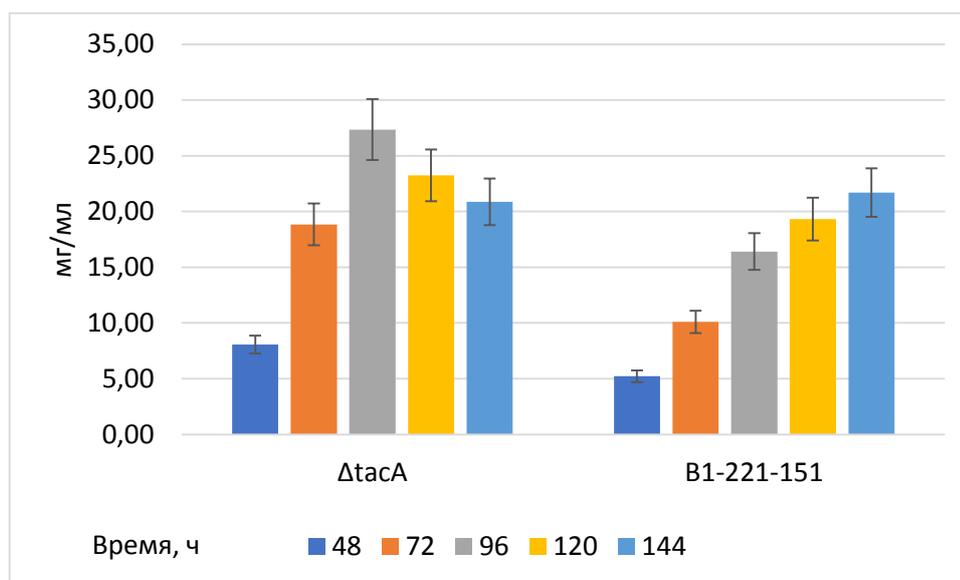
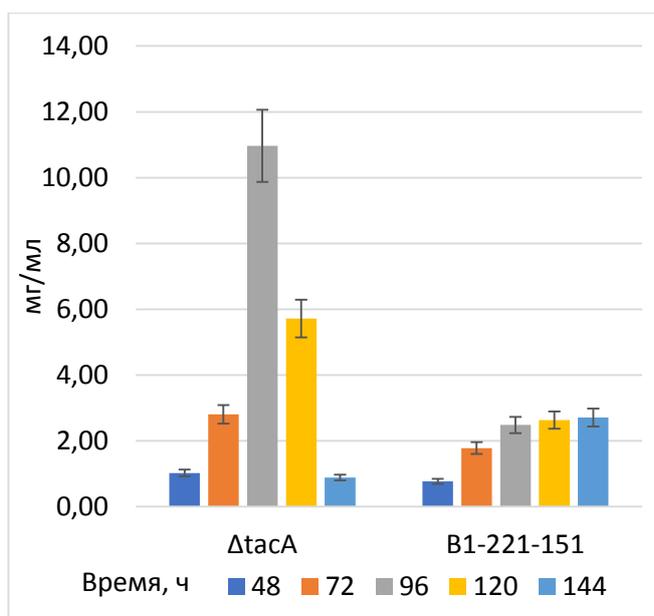
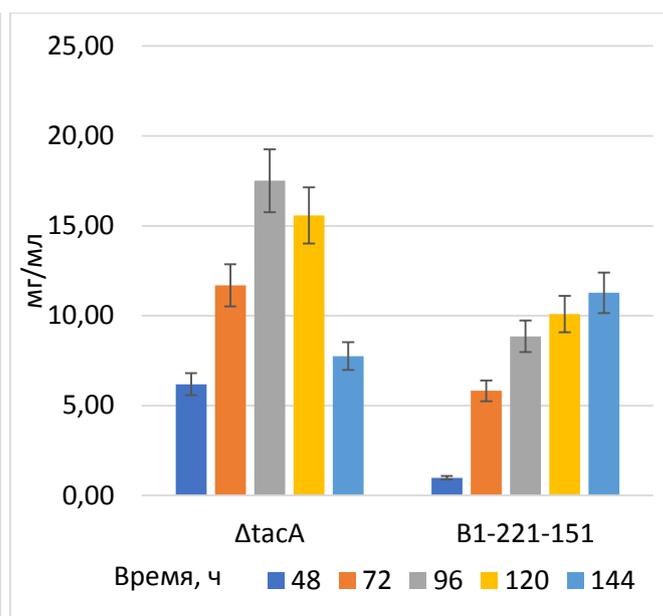


Рисунок 40 – Концентрации белка в образцах КЖ при культивировании на ферментационной установке штаммов *P. verruculosum* $\Delta tacA$ и *P. verruculosum* B1-221-151 через 2, 3, 4, 5, и 6 суток



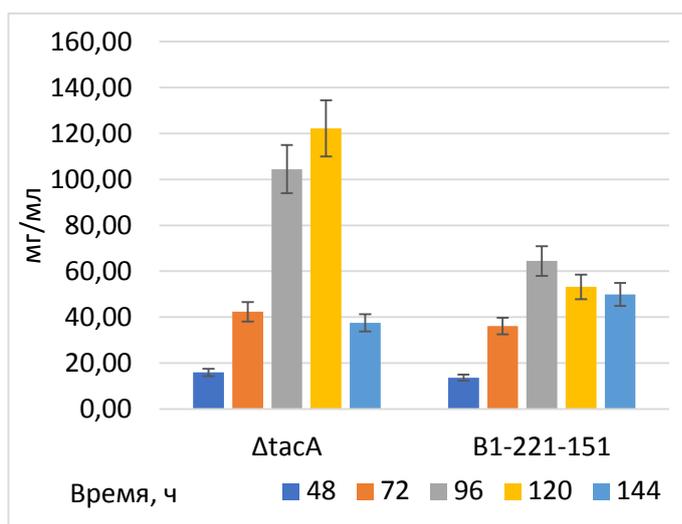
*При 40 °С, рН 5,0

А



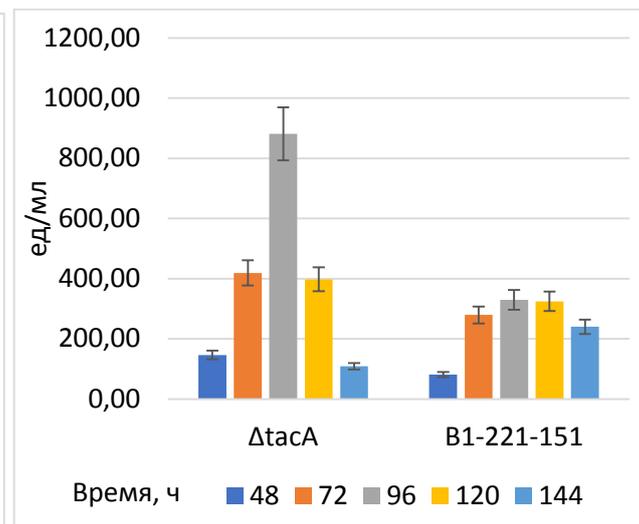
*При 40 °С, рН 5,0

Б



*При 50 °С, рН 5,0

В



*При 50 °С, рН 5,0

Г

Рисунок 41 – Динамика биосинтеза целлобиогидролазы (А), β-глюкозидазы (Б), эндоглюканазы (В) и ксиланазы (Г) в образцах КЖ при культивировании на ферментационной установке штаммов *P. verruculosum* $\Delta tacA$ и *P. verruculosum* B1-221-151 через 2, 3, 4, 5, и 6 суток

Результаты измерения концентрации белка (Рисунок 40) показали, что штамм *P. verruculosum* $\Delta tacA$, быстрее нарабатывает ферментативный комплекс и уже к 96 часам культивирования, концентрация белка в КЖ достигла максимума, после чего начала снижаться, тогда как исходный штамм достиг близкого значения только к 144 часам, что также видно на электрофореграмме (Рисунок 39). Целлобиогидролазная активность у штамма *P. verruculosum* $\Delta tacA$ также достигла максимума уже к 96 часам культивирования и превысила максимальный

уровень для исходного штамма более чем в два раза, что подтверждают результаты определения относительной транскрипции гена *cbh1* под действием индукторов (Рисунок 38А). Наблюдаемый эффект при культивировании штамма *P. verruculosum* Δ acA на ферментационной среде оказался аналогичен результатам культивирования штамма *T. reesei* Δ ace1 на целлюлозосодержащей среде [72].

Таким образом, новый штамм *P. verruculosum* Δ acA позволяет уже за 96 часов получить ферментный комплекс в 2,5 раза более активный по авицелазе, чем у исходного штамма при 144 часах культивирования, что сокращает время культивирования на ферментационной установке на 48 часов, что составляет одну треть от стандартной продолжительности культивирования исходного штамма.

5.4. Применение *P. verruculosum* Δ acA как реципиентного штамма

5.4.1 Экспрессия в штамме *P. verruculosum* Δ acA гена β -глюкозидазы *A. niger*

Так как культивирование штамма *P. verruculosum* Δ acA показало увеличение экспрессии ЦБГ1 к 96 ч, следующим этапом работы являлась проверка возможности экспрессии гетерологичных ферментов под контролем промотора *cbh1* в данном штамме. Для этого был выбран ген *bgl1*, кодирующий БГЛ *A. niger*. Известно, что БГЛ *A. niger* составляет до 80% внеклеточного белка, секретируемого штаммом *P. verruculosum* F10, однако общий уровень белка составляет всего около 15 г/л, кроме того, целлобиогидролазная активность ферментного комплекса F10 крайне низка [185]. Поэтому при осахаривании растительной биомассы ФП F10 не используется в чистом виде, а применяется только как β -глюкозидазная добавка к гидролитическому ФП В1-221-151.

Штамм *P. verruculosum* Δ acA был получен двойным нокаутом (см. раздел 5.3.6), поэтому обладал ауксотрофным признаком Δ niaD, что позволило использовать его как реципиентный штамм. *P. verruculosum* Δ acA был трансформирован плазмидой pPrCBHI- β GluAsp, использовавшейся для получения штамма *P. verruculosum* F10, в результате чего было получено 30 трансформантов, 16 из которых были использованы для первичного скрининга в колбах (см. раздел 4.2.12.). Электрофореграммы КЖ на 6-е сутки культивирования представлены на Рисунке 43.

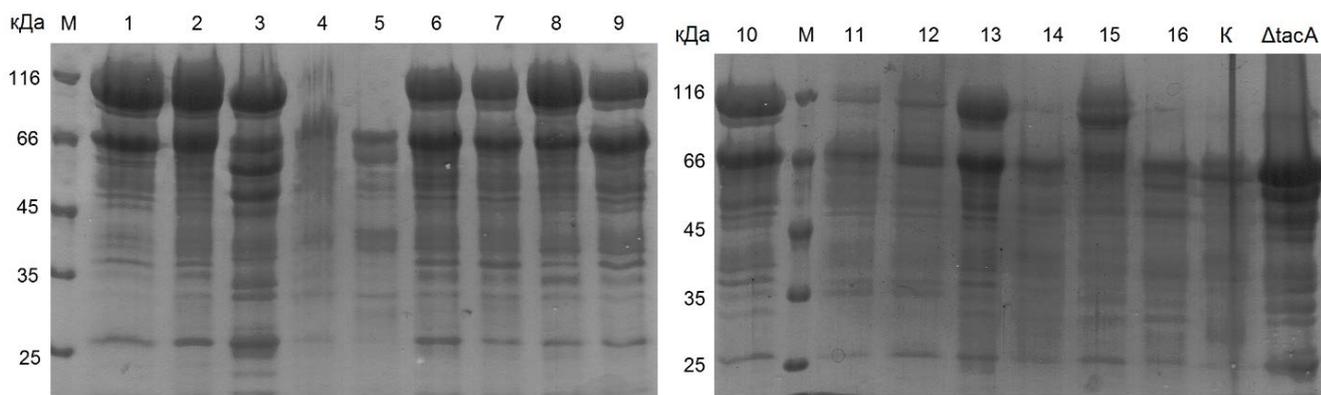
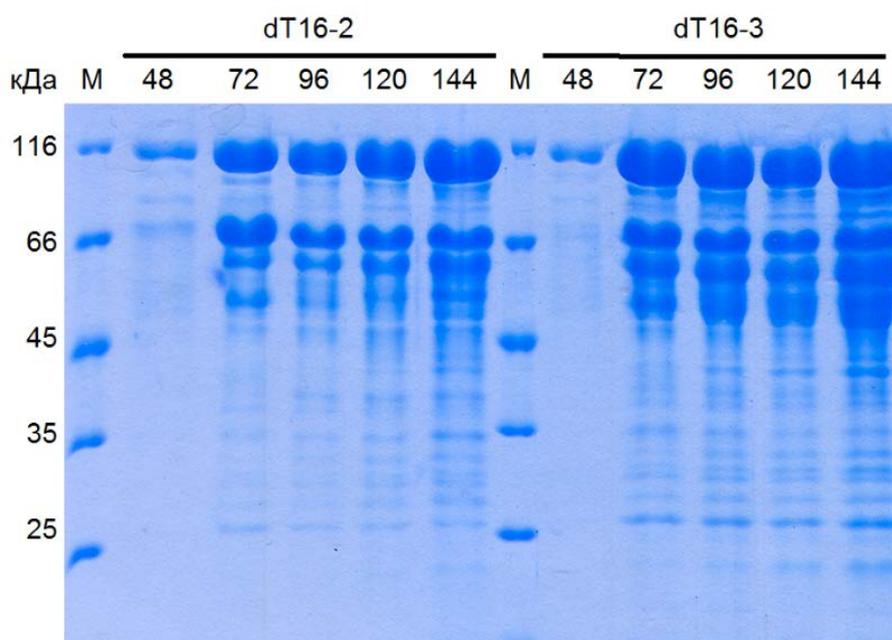
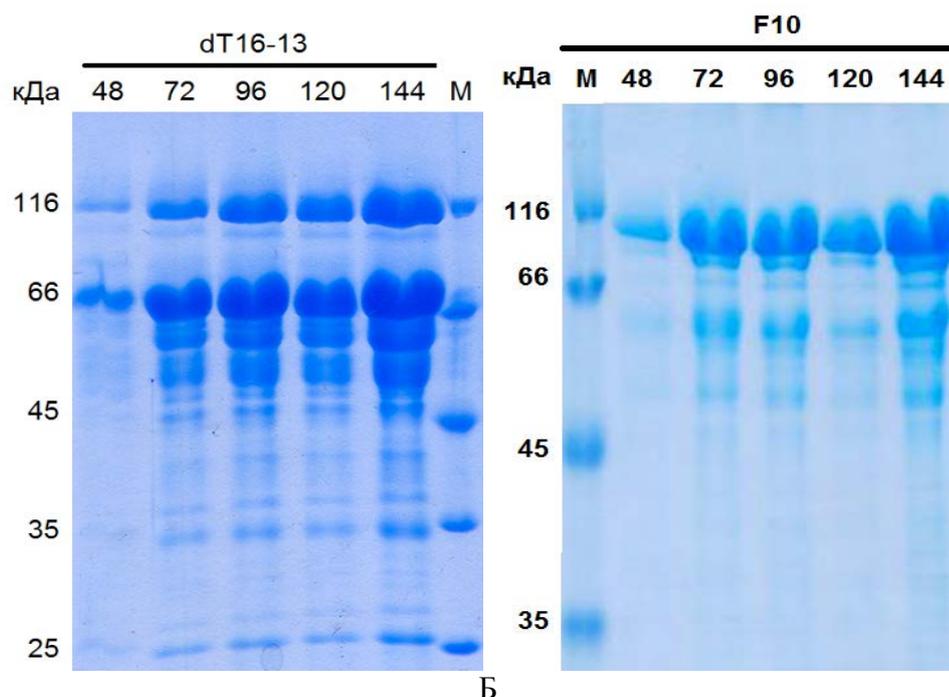


Рисунок 42 – Электрофореграммы КЖ клонов, полученных после трансформации штамма *P. verruculosum* $\Delta tacA$ геном *bglI* *A. niger*, на 6-е сутки культивирования в колбах на СФС. К – штамм В1-221-151

На Рисунке 42 видно, что клоны 1-3, 6-10, 13 и 15 содержат полосы с молекулярной массой, соответствующей БГЛ *A. niger* (116 кДа), а также в соответствующих дорожках сохраняется полоса ЦБГ1 (66 кДа). По итогам первичного отбора, клоны 2, 3 и 13 были выбраны для культивирования на ферментационной установке КФ-104/3 (см. раздел 4.2.13) в ЦКП «Промышленные биотехнологии» и обозначены как dT16-2, dT16-3, dT16-13 соответственно. Электрофореграммы КЖ полученных в результате культивирования новых штаммов и *P. verruculosum* F10 – продуцента БГЛ представлены на Рисунке 43.



А



Б

Рисунок 43 – Электрофореграммы КЖ штаммов *P. verruculosum* dT16-2, dT16-3 (А) и *P. verruculosum* dT16-3, F10 (Б), отобранных при культивировании на 2, 3, 4, 5 и 6 сутки.

Из Рисунка 43 следует, что КЖ всех штаммов, в том числе и *P. verruculosum* F10 содержат полосы характерные для β -глюкозидазы *A. niger* (116 кДа), и ЦБГ1 (66 кДа). При этом у штаммов *P. verruculosum* dT16-2 *P. verruculosum* dT16-3 полоса характерная для β -глюкозидазы несколько интенсивнее чем у ЦБГ1, а у *P. verruculosum* dT16-13 наоборот. Концентрация белка, а также β -глюкозидазная и авицелазная активности представлены на Рисунках 44, 45.

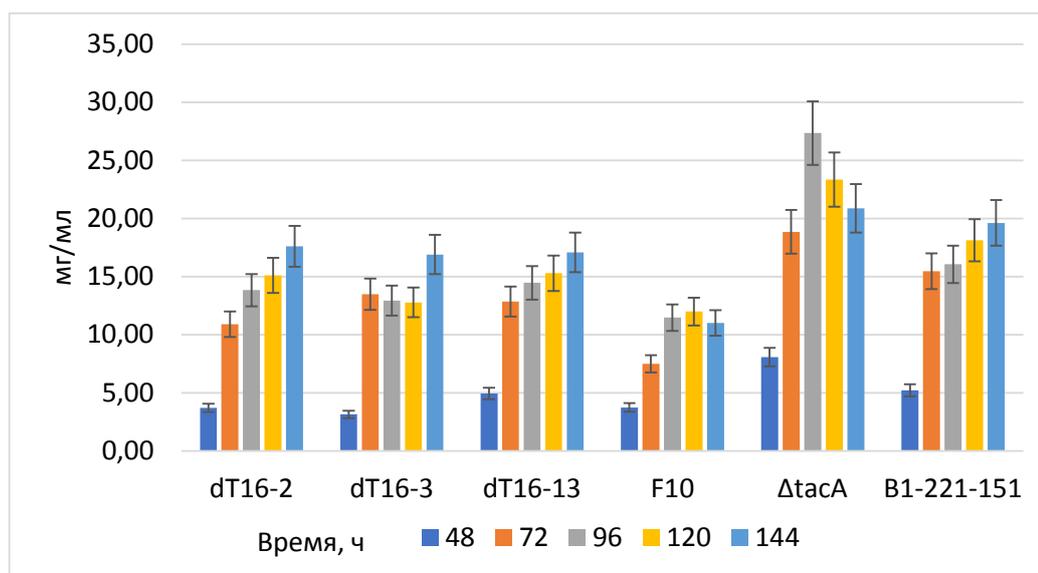
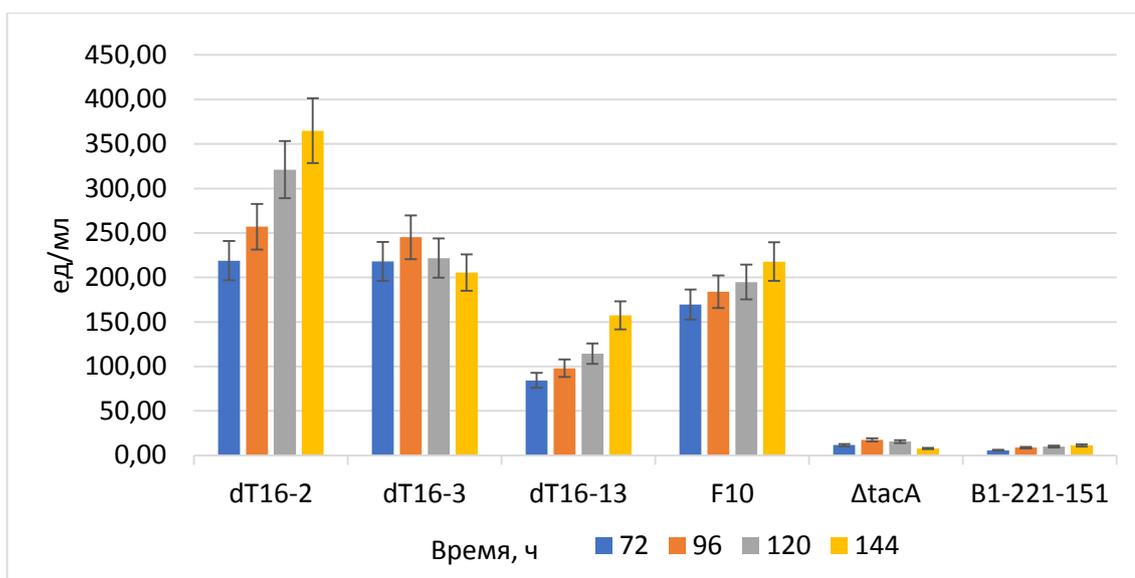
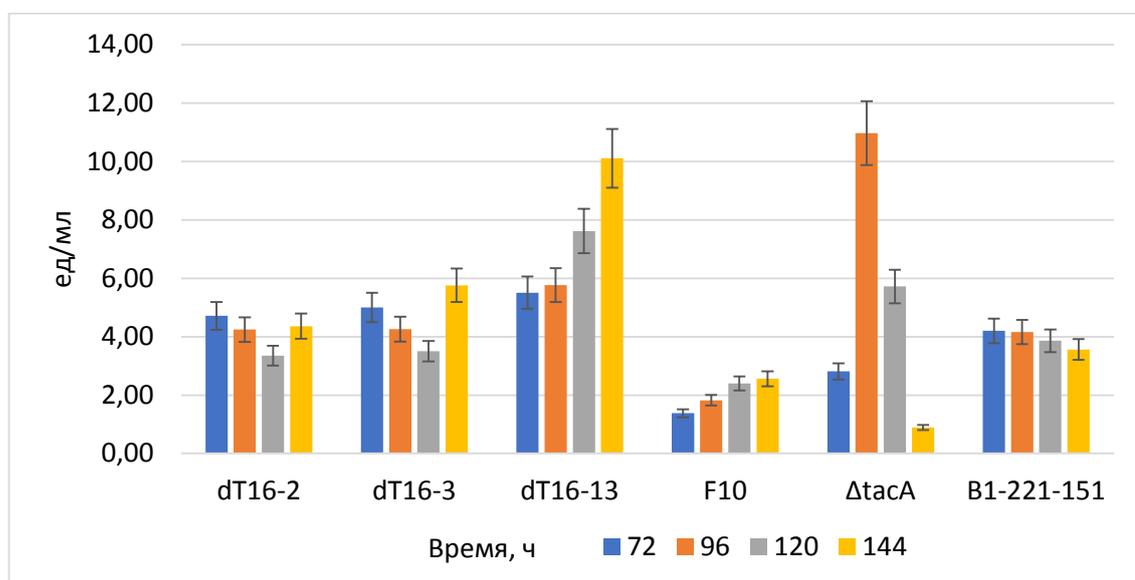


Рисунок 44 – Концентрация белка в образцах КЖ при культивировании на ферментационной установке штаммов *P. verruculosum* серии dT16, *P. verruculosum* $\Delta tacA$ и *P. verruculosum* B1-221-151 *P. verruculosum* на 2 – 6 сутки



*При 40 °С, рН 5,0

А



*При 40 °С, рН 5,0

Б

Рисунок 45 – β-глюкозидазная (А) и авицеллазная (Б) активности в образцах КЖ при культивировании штаммов *P. verruculosum* серии dT16, *P. verruculosum* ΔtacA и *P. verruculosum* B1-221-151 на 2 – 6 сутки

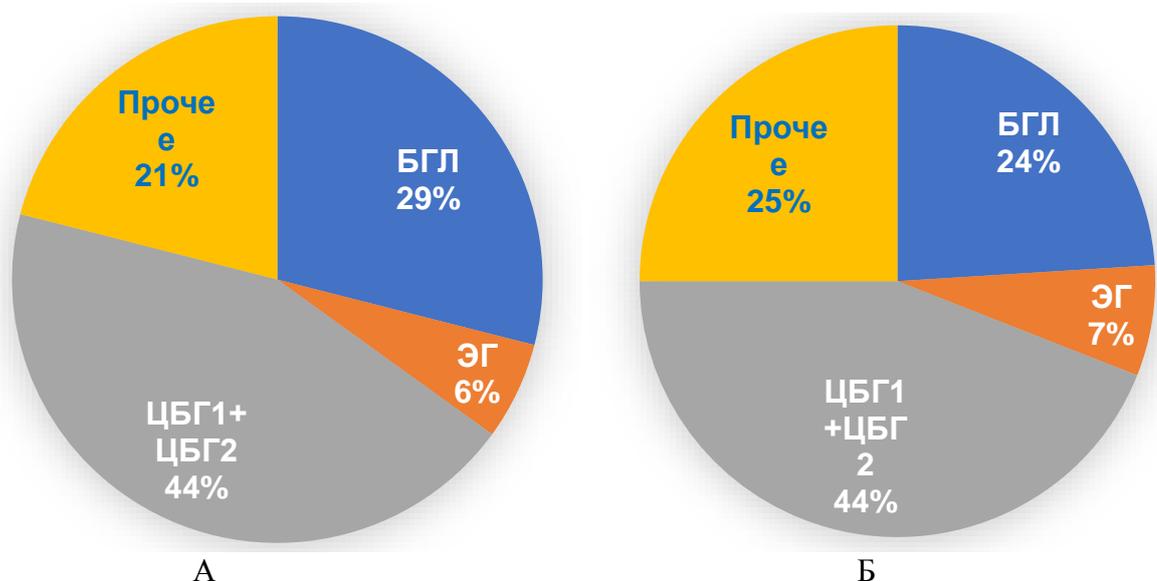
Все три новых штамма показали продуктивность по белку в 1,5 раза больше, чем штамм *P. verruculosum* F10. Авицеллазная и β-глюкозидазные активности у всех полученных штаммов различались между собой: авицеллазная активность у них была не меньше чем у штамма *P. verruculosum* B1-221-151 и в 1,7, 2,2, 3,9 раза выше чем у штамма *P. verruculosum* F10. Наибольшей авицеллазной активностью обладает штамм dT16-13, у которого уровень активности в 2,8 раза превосходит штамм *P. verruculosum* B1-221-151. Однако, этот же штамм обладает и

наименьшей β -глюкозидазной активностью среди трёх новых штаммов (эта активность в 1,4 раза меньше, чем у штамма *P. verruculosum* F10, но в 75 раз больше, чем у *P. verruculosum* B1-221-151). Штамм dT16-2 имеет, наоборот, наибольшую β -глюкозидазную активность, которая в 1,7 раза превышает таковую у *P. verruculosum* F10. Штамм dT16-3 имеет средние значения β -глюкозидазной и авицелазной активностей среди трёх новых штаммов. Различия в уровнях экспрессии БГЛ и ЦБГ у новых штаммов, вероятно, связаны с разным количеством встроившихся копий гена *bgl1* как уже ранее было показано для штаммов-продуцентов гетерологичных ферментов (см. раздел 5.3.1) [7].

Таким образом, ферментные препараты, полученные с помощью новых штаммов, должны иметь хорошую гидролитическую активность: с этой точки зрения наибольший потенциал среди них, имеет штамм dT16-13. Штамм dT16-2 может быть хорошей заменой штамму F10.

5.4.2 Определение гидролитической способности ферментных препаратов серии dT16

Перед проверкой гидролитической активности новых ФП хроматографическим разделением было определено соотношение их компонентов (Рисунок 46). Соотношение ферментов в ФП dT16-2 и dT16-3 оказалось очень близким: общая доля ЦБГ1 и ЦБГ2 в них была одинаковой, а содержание БГЛ *A. niger* отличалось всего на 5%. В препарате dT16-13 содержание ЦБГ1 и ЦБГ2 было почти в 1,5 раза больше, чем в ФП dT16-2 и dT16-3. В целом же у препаратов серии dT16 содержание БГЛ *A. niger* значительно меньше, чем в ФП F10 (в 3 – 5 раз), но доля ЦБГ и ЭГ значительно больше (в 4 – 5 раз и 2,5 – 3 раза соответственно).



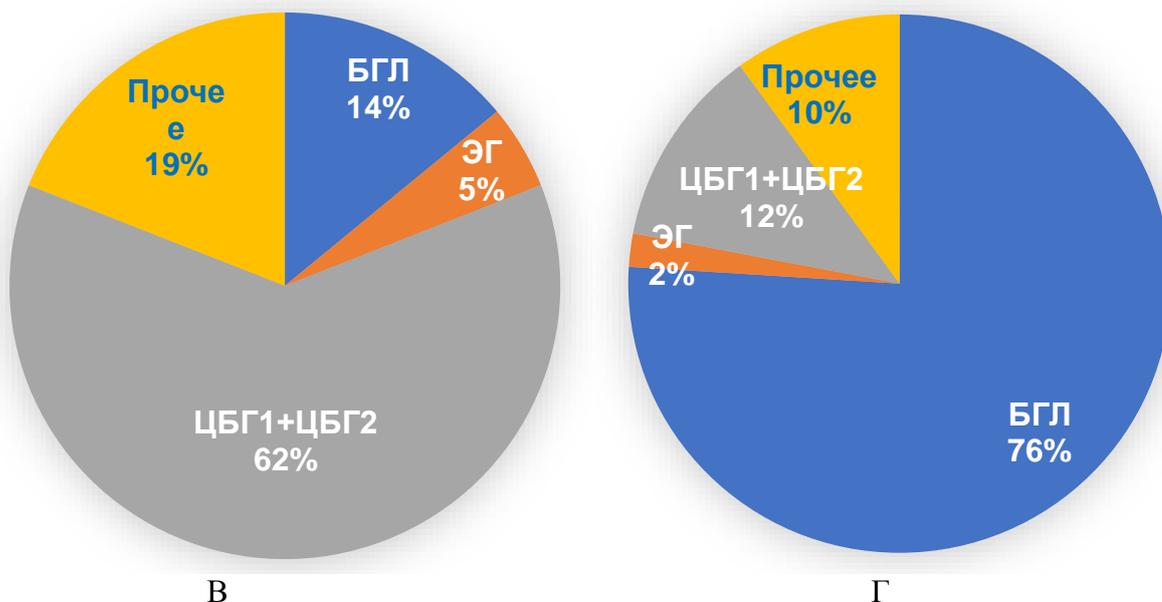
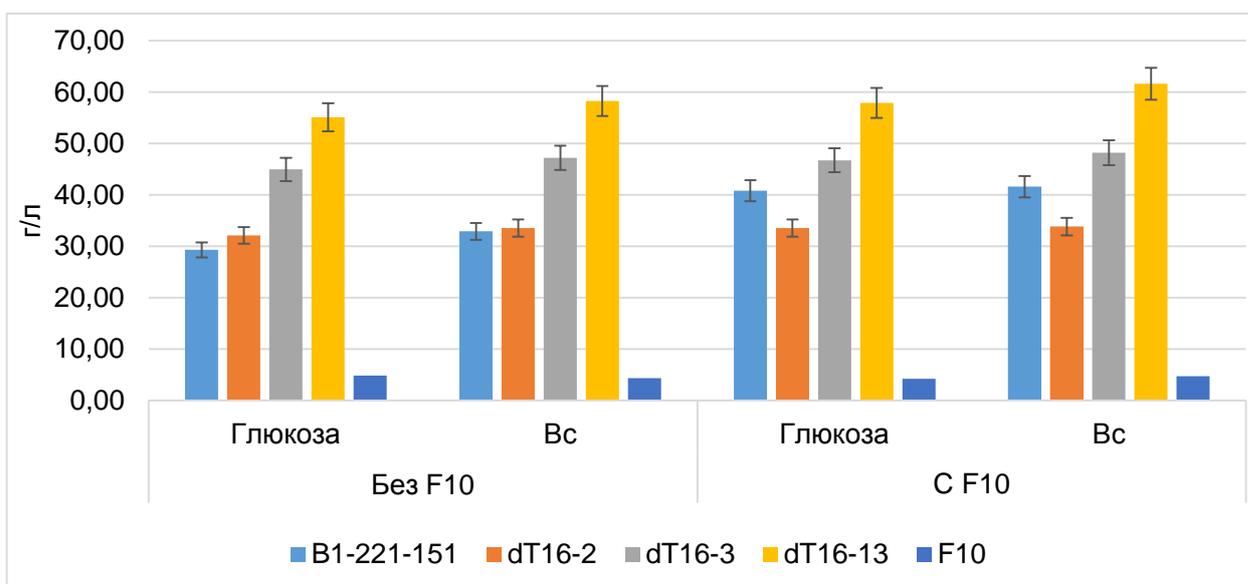


Рисунок 46 – соотношение компонентов в ФП dT16-2, dT16-3, dT16-13 и F10

В качестве субстратов для определения гидролитической способности ферментных препаратов dT16-2, dT16-3 и dT16-13 были использованы МКЦ и измельчённая осина; в качестве контроля применяли препараты F10 и B1-221-151. Данные, характеризующие выход продуктов гидролиза (глюкозы и ВС) через 48 часов приведены на Рисунке 47. Гидролиз МКЦ и измельчённой осины проводили как без дополнительного внесения в реакционную смесь препарата β -глюкозидазы F10, так и с его внесением (чтобы определить имеют ли препараты dT16-2, dT16-3 и dT16-13 достаточный уровень собственной β -глюкозидазной активности).



А

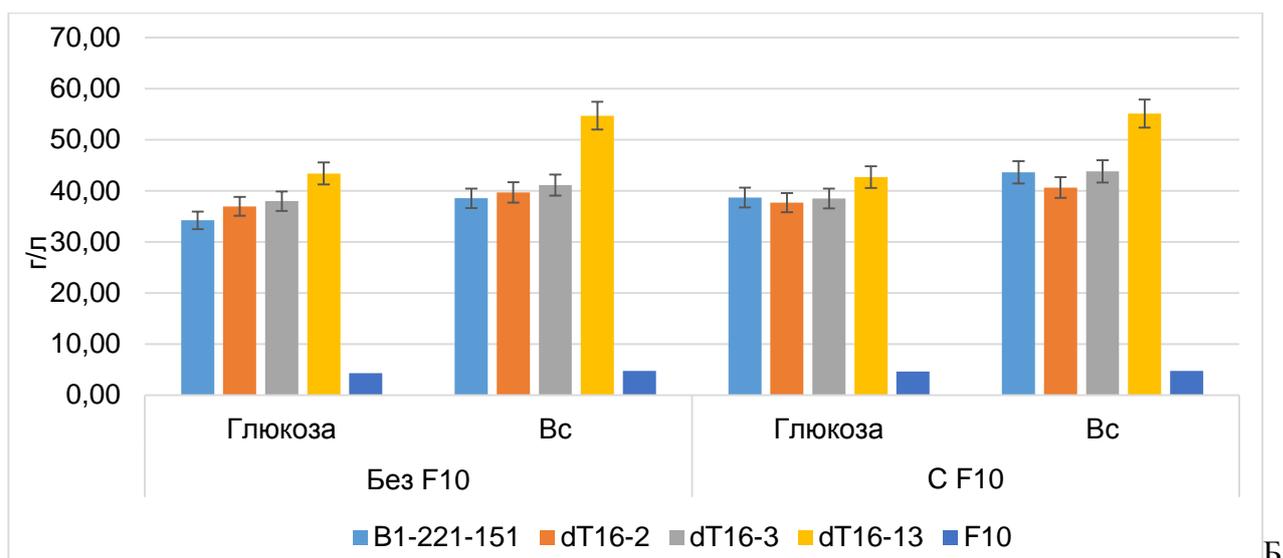


Рисунок 46 – Выход глюкозы и ВС через 48 часов при ферментативном гидролизе МКЦ (А) и измельчённой осины (Б) ФП серии dT16 (концентрация субстрата 100 г/л; pH 5,0; 50 °С)

В случае использования в качестве субстрата МКЦ, как мы и предполагали, ФП dT16-13, проявлял наибольшую гидролитическую способность – выход ВС при его применении оказался в 1,8 раза выше, чем у контрольного ФП B1-221-151. ФП dT16-2 показал самую низкую гидролитическую способность из новых ФП, но в 8 раза большую, чем ФП F10. Препарат dT16-3 обладал средней гидролитической активностью, которая в 1,4 раза была больше, чем у ФП B1-221-151, но в 1,2 раза меньше, чем ФП dT16-13. Нужно отметить, что при использовании всех ФП серии dT16 выход глюкозы в пределах погрешности равнялся выходу ВС.

Результаты, полученные при определении гидролитической способности исследуемых ФП по отношению к измельчённой осине, оказались аналогичными результатам полученным на МКЦ, хотя разница между препаратами оказалась не столь заметной. Общий выход ВС и доля глюкозы в них была меньше, чем при гидролизе МКЦ. Первое объясняется наличием лигнина и вследствие этого меньшей реакционной способностью субстрата, второе – наличием до 20% гемицеллюлозы [193].

Добавление препарата F10 в расчёте 40 ед. β -глюкозидазы на грамм субстрата не оказало значительного влияния на выход ВС и глюкозы из МКЦ и измельчённой у препаратов серии dT16, что свидетельствует о насыщающем содержании в этих ФП собственной БГЛ (у препарата dT16-2 её содержание, вероятно, даже избыточно).

Таким образом, испытание ФП серии dT16 показало, что штамм dT16-13 позволяет получить ФП, превосходящий по гидролитической способности ФП B1-221-151, который может использоваться для гидролиза целлюлозосодержащих субстратов без добавления в реакционную смесь ФП F10 как источника БГЛ. Результаты демонстрируют, что штамм *P. verruculosum* Δ tacA может использоваться как эффективный реципиент для экспрессии гетерологичных белков.

6 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе представлены результаты по изучению регуляции биосинтеза целлюлаз у гриба *P. verruculosum*. В начале работы была адаптирована методика геномного редактирования системой CRISPR-Cas9. С помощью адаптированной методики был проведён нокаут *cbh1* гена, кодирующего целлобиогидролазу 1 – основной компонент ферментативного комплекса мицелиального гриба *P. verruculosum*. В результате эксперимента была показана взаимосвязь в экспрессии компонентов целлюлолитического комплекса при нокауте *cbh1* гена, в частности, при отсутствии ЦБГ1 происходит перераспределение ферментов и усиливается экспрессия гомологичных ЦБГ2, β -глюкозидазы и ксиланазы.

Также в работе было исследовано влияние различных моно- и олигосахаридов на транскрипцию гена *cbh1*. Показано, что целлобиоза, гентиобиоза и ксилоза индуцируют экспрессию гена *cbh1* уже через 75 мин культивирования *P. verruculosum* в условиях отсутствия глюкозы. Лактоза и трегалоза не индуцируют транскрипцию гена *cbh1*. Смесь ксилоолигосахаридов КОС 3–5 (ксилотриоза, ксилотетраоза и ксилопентаоза), по-видимому, также не индуцирует экспрессию гена *cbh1*, однако продукты их гидролиза, такие как ксилоза и, возможно, ксилобиоза, работают как индукторы. Так же установлено, что дифференциация рекомбинантных штаммов, на «моно»- и «гетеро»-продуценты гетерологичных белков связана с различным числом копий гетерологичных генов под управлением *cbh1* промотора, а снижение концентрации белка в КЖ определяется титрованием транскрипционных факторов с позитивной регуляцией, действующих на *cbh1* промотор.

Далее в работе было проверено влияние транскрипционных факторов Clr1, Clr2, XlnR и TsaA на синтез карбогидраз путём нокаутов соответствующих генов и определения относительных уровней транскрипции основных целлюлаз на минимальной среде под действием индукторов. Позитивные факторы транскрипции, Clr1, Clr2 и XlnR, были конститутивно экспрессированы. Конститутивная экспрессия Clr1, Clr2 и XlnR привели к увеличению β -глюкозидазной активности. Авицелазная активность у штаммов с конститутивной экспрессией Clr2 и XlnR не изменилась, а у штамма с Clr1 снизилась.

Конститутивная экспрессия транскрипционного фактора XlnR привела к повышению эндоглюканазной и ксиланазной активности, не оказывая решающего влияния на экспрессию целлобиогидролаз. Стоит отметить, что из всех позитивных транскрипционных факторов только XlnR обеспечивал транскрипцию гена *cbh1* при индукции ксилосахаридами.

Наиболее заметный эффект наблюдался при нокауте транскрипционного активатора TsaA. Определено, что TsaA в грибе *P. verruculosum* является репрессором целлюлаз, как и его гомолог-репрессор Ace1 в *T. reesei*, но не гомолог-активатор TsaA в *P. oxalicum*. Нокаут TsaA в

штамме *P. verruculosum* В1-221-151 привел к повышению авицеллазной активности на 96 ч в 5 раз, что позволяет сократить время ферментации штамма на 2-е суток.

Результаты изучения влияния ТФ Clr1, Clr2, XlnR и TacA в грибе *P. verruculosum* на экспрессию генов целлюлаз и ксиланаз схематически представлены на Рисунке 48.

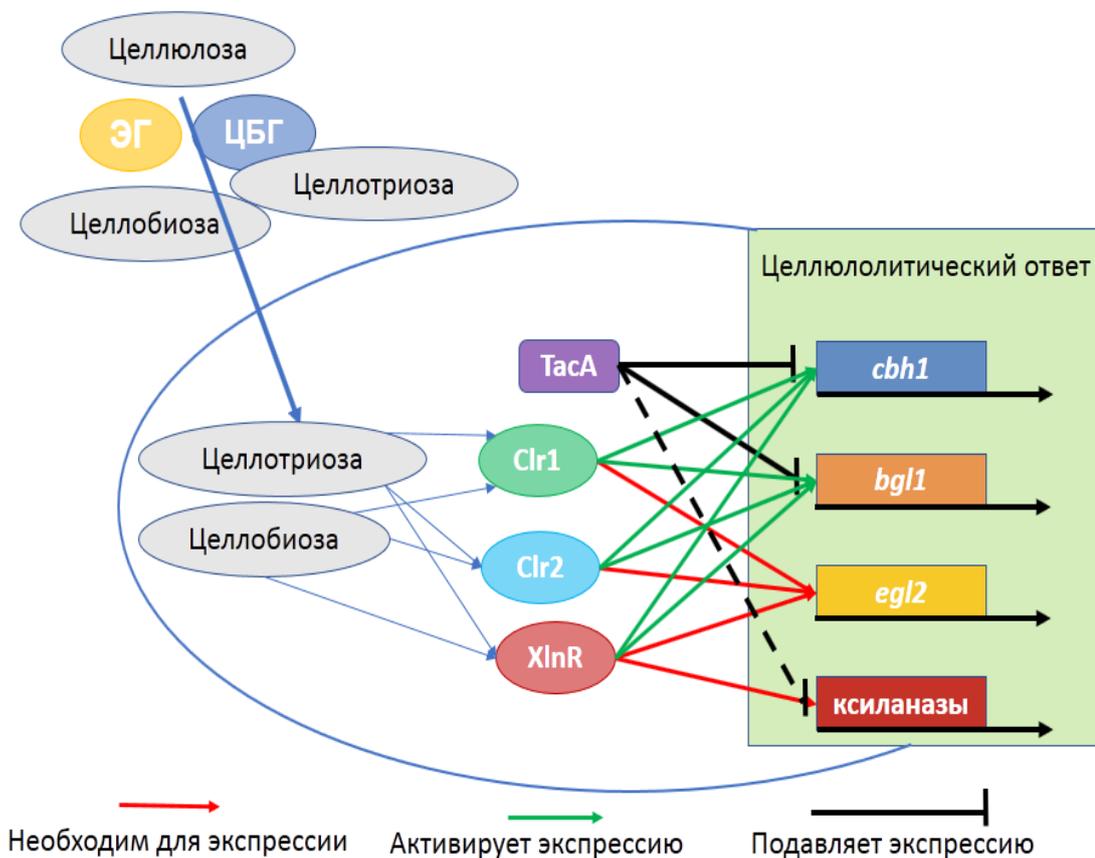


Рисунок 48 – Влияние ТФ Clr1, Clr2, XlnR и TacA в грибе *P. verruculosum* на транскрипцию генов целлюлаз и ксиланаз. TacA негативно влияет на транскрипцию генов *cbh1*, *bgl1* и вероятно генов ксиланаз. ТФ Clr1, Clr2, XlnR аддитивно активируют транскрипцию генов *cbh1* и *bgl1*, тогда как для транскрипции гена *egl2* необходимы все три ТФ

В завершении работы был получен новый штамм-реципиент *P. verruculosum* Δ*tacA*:Δ*niaD*, который был трансформирован плазмидой, несущей ген *bgl1*, кодирующий β-глюкозидазу *A.niger*. Продуктивность штамма *P. verruculosum* dT16-13 по секретируемому белку была выше на 30%, чем у штамма-аналога *P. verruculosum* F10, полученного при трансформации штамма-реципиента *P. verruculosum* В1-537 без нокаута транскрипционного фактора TacA. Был получен ФП dT16-13, который проявлял наиболее высокую гидролитическую способность – выход ВС при его использовании оказался в 1,5 раза выше, чем у контрольного ФП В1-221-151. Полученный эффект объясняется сбалансированностью ферментативных активностей гомологичной ЦБГ1 и гетерологичной β-глюкозидазы при гидролизе целлюлозосодержащих субстратов.

7 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 1,5 раза выше, чем у контрольного ферментного препарата B1-221-151.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Синицын А.П., Синицына О.А., Рожкова А.М. Получение промышленно важных ферментов на основе экспрессионной системы гриба *Penicillium verruculosum* // Биотехнология. – 2020. - Том36(6). - С.24–41.
2. Синицын А.П., Синицына О.А., Зоров И.Н. Рожкова А.М. Возможности экспрессионной системы гриба *Penicillium verruculosum* для получения продуцентов ферментов, обеспечивающих эффективную деструкцию возобновляемой растительной биомассы (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. Том56(6). – С.551–560.
3. Синицын А.П., Окунев О.Н., Черноглазов В.М., Синицына О.А., Попов В.О. Штамм мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* — продуцент комплекса целлюлаз, ксиланазы и ксилоглюканазы и способ получения ферментного препарата комплекса целлюлаз, ксиланазы и ксилоглюканазы для гидролиза целлюлозы и гемицеллюлозы. Патент РФ 2361918, приор. 26.02.2008, опубл. 20.07.2009
4. Синицын А.П., Рожкова А.М., Синицына О.А., Холмова М.А., Терентьев К.Ю., Казаков Я.В., Чухчин Д.Г., Новожилов Е.В. Получение биокатализатора на основе рекомбинантных целлюлолитических ферментных препаратов *Penicillium verruculosum* и его применение в бумажной промышленности // Катализ в промышленности. – 2015. – Том15(6). – С.84–89. doi: 10.18412/1816-0387-2015-6-84-89
5. Volkov P.V., Gusakov A.V., Rubtsova E.A., Rozhkova F.M. Properties of recombinant GH49 family dextranase heterologously expressed in two recipient strains of *Penicillium* species // Biochimie. – 2019. – Vol.57. – P.123–130. doi: 10.1016/j.biochi.2018.11.010
6. Kowalczyk J.E., Benoit I., de Vries R. P. Regulation of plant biomass utilization in *Aspergillus* // Advances in Applied Microbiology. – 2014. – Vol.88. – P.31-57.
7. 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. doi:10.21519/0234-2758-2019-35-5-51-57.
8. Bennett J. An overview of the genus *Aspergillus*. In M. Machida & K. Gomi (Eds.), *Aspergillus* molecular biology and genomics. – 2010. Portland, OR: Caister Academic Press.
9. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений. М. 1986., Том1. 387 с.
10. Klemm D., Heublein B., Fink H.P., Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material // Angew. Chem. Int. – 2005. – P. 3358.
11. Newman R., Davies L., Harris P. Solid-state 13-C nuclear magnetic resonance characterization of the cell walls of *Arabidopsis thaliana* leaves. Plant physiology. -1996. -Vol.111. – P.475-485.

12. Smith B., Harris P., Melton L., Newman R. Crystalline cellulose in hydrated primary cell walls of three monocotyledons and one dicotyledon. *Plant and Cell Physiology*. - 1998. - T. 39. -P.711–720.
13. Doherty W.O.S., Mousavion P., Fellows C.M. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Industrial Crops and Products*. – 2011. – Vol.22. – P.259-270.
14. Tye Y.Y, Lee K.T, Abdullah W.N.W., Leh C.P. The world availability of nonwood lignocellulosic biomass for the production of cellulosic ethanol and potential pretreatments for the enhancement of enzymatic saccharification // *Renew Sustain Energy*. - 2016. – Vol.60. – P.155–172.
15. Barcelos C.A., Rocha V.A., Groposo C., de Castro A.M., Pereira Jr N. Enzymes and accessory proteins involved in the hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production // *Mycology: Current and Future Developments*. – 2015. – Vol.1. – P. 23-56.
16. Andlar M., Rezi T., Mardetko N., Kracher D., Ludwig R., Santek B. Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation // *Eng. Life Sci*. – 2018. – Vol.0. – P.1–11.
17. de Vries, R. P. Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide degrading enzymes; relevance for industrial production // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2003.Vol. 61. – P.10–20.
18. Ruijter G.J.G., Visser J. Carbon repression in *Aspergilli* // *FEMS Microbiology Letters*. – 1997. – Vol.151. – P.103-114.
19. de Graaff L.H., van den Broeck H.C., van Ooijen A.J.J., Visser J. Regulation of the xylanase-encoding *xlnA* gene of *Aspergillus tubingensis* // *Mol. Microbiol*. – 1994. – Vol.12. – P.479–490.
20. Liu G., Qin Y., Li Z., Qu Y. Improving lignocellulolytic enzyme production with *Penicillium*: from strain screening to systems biology // *Biofuels*. – 2013. – Vol.4(5). – P.12.
21. Boase N.A., Kelly, J.M. A role for creD, a carbon catabolite repression gene from *Aspergillus nidulans*, in ubiquitination // *Mol. Microbiol*. – 2004. – Vol.53. – P.929–940.
22. Welkenhuysen N., Borgqvist J., Backman M., Bendrioua, L., Goksör, M., Adiels C.B., Cvijovic M., Hohmann S. Single-cell study links metabolism with nutrient signaling and reveals sources of variability // *BMC Syst. Biol*. – 2017. – Vol.11. – P.59.
23. Alam M.A., Kamlangdee N., Kelly J.M. The CreB deubiquitinating enzyme does not directly target the CreA repressor protein in *Aspergillus nidulans* // *Curr. Genet*. – 2017. Vol.63. – P.647–667.
24. Nehlin J.O., Carlberg M., Ronne H. Control of yeast *GAL* genes by MIG1 repressor: A transcriptional cascade in the glucose response // *EMBO J*. – 1991. Vol.10. – P.3373–3377.
25. Dowzer C.E., Kelly J.M. Cloning of the *creA* gene from *Aspergillus nidulans*: A gene involved in carbon catabolite repression // *Curr. Genet*. – 1991. Vol.15. – P.457–459.

26. Dowzer C.E., Kelly J.M. Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans* // Mol. Cell. Biol. – 1991. – Vol.11. – P.5701–5709.
27. Strauss J., Mach R.L., Zeilinger S., Hartler G., Stuffer G., Wolschek M., Kubicek C. P. Cre1, the carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei* // FEBS Lett. – 1995. – Vol.376. – P.103– 107.
28. Ilmen M., Thrane C., Penttila M. The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: Isolation and expression of a full length and a truncated mutant form // Mol. Gen. Genet. – 1996. – Vol.251. – P.451–460.
29. Drysdale M.R., Kolze S.E., Kelly J.M. 1993. The *Aspergillus niger* carbon catabolite repressor encoding gene *creA* // Gene. – 1993. – Vol.130. – P.241–245.
30. Vautard G., Cotton P., Fèvre M. The glucose repressor CRE1 from *Sclerotinia sclerotiorum* is functionally related to CREA from *Aspergillus nidulans* but not to the Mig proteins from *Saccharomyces cerevisiae* // FEBS Lett. – 1999. – Vol.453. – P.54–58.
31. Tudzynski B., Liu S., Kelly J.M. Carbon catabolite repression in plant pathogenic fungi: Isolation and characterization of the *Gibberella fujikuroi* and *Botrytis cinerea creA* genes // FEMS Microbiol. Lett. – 2000. – Vol.184. – P.9–15.
32. Takashima S., Nakamura A., Hidaka M., Masaki H., Uozumi T. Isolation of the *creA* gene from the cellulolytic fungus *Humicola grisea* and analysis of CreA binding sites upstream from the cellulase genes // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1998. – Vol.62. – P.2364–2370.
33. de la Serna I., Ng D., Tyler B.M. Carbon regulation of ribosomal genes in *Neurospora crassa* occurs by a mechanism which does not require Cre1, the homologue of the *Aspergillus* carbon catabolite repressor, CreA // Fungal Genet. Biol. – 1999. – Vol.26. – P.253–269.
34. Chulkin A.M., Vavilova E.A., Benevolenskij S.V. Transcriptional regulator of carbon catabolite repression CreA of filamentous fungus *Penicillium canescens* // Molecular Biology. – 2010. – Vol. 44(4). – P.596–605.
35. Cubero B., Scazzocchio C. Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans* // EMBO J. – 1994. – Vol.13. – P.407–415.
36. Panozzo C., Cornillot E., Felenbok B. The CreA repressor is the sole DNA-binding protein responsible for carbon catabolite repression of the *alcA* gene in *Aspergillus nidulans* via its binding to a couple of specific sites // J. Mol. Evol. – 1998. - Vol.273. – P.6367–6372.
37. Mathieu M., Fillinger S., Felenbok B. In vivo studies of upstream regulatory *cis*-acting elements of the *alcR* gene encoding the transactivator of the ethanol regulon in *Aspergillus nidulans* // Mol. Microbiol. – 2000. – Vol.36. – P.123-131.

38. Jekosch K., Kuck U. Glucose dependent transcriptional expression of the *cre1* gene in *Acremonium chrysogenum* strains showing different levels of cephalosporin C production // *Curr. Genet.* – 2000. – Vol.37. – P.388–395.
39. Arst H.N.Jr., Tollervey D., Dowzer C.E., Kelly J.M. An inversion truncating the *creA* gene of *Aspergillus nidulans* results in carbon catabolite derepression // *Mol. Microbiol.* – 1990. – Vol.4. – P.851–854.
40. Ries L.N., Beattie S.R., Espeso E.A., Cramer R.A., Goldman, G.H. Diverse regulation of the CreA carbon catabolite repressor in *Aspergillus nidulans* // *Genet.* – 2016. – Vol.203. – P.335–352.
41. Lockington R.A.; Kelly J.M. Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans* involves deubiquitination // *Mol. Microbiol.* – 2001. – Vol.40. – P.1311–1321.
42. Lockington R.A., Kelly J.M. The WD40-repeat protein CreC interacts with and stabilizes the deubiquitinating enzyme CreB in vivo in *Aspergillus nidulans* // *Mol. Microbiol.* – 2002. – Vol.43. – P.1173–1182.
43. Matar K.A.O., Chen X., Chen D., Anjago W.M., Norvienyeku J., Lin Y., Chen M., Wang Z., Ebbole, D.J., Lu G. WD40-repeat protein MoCreC is essential for carbon repression and is involved in conidiation, growth and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae* // *Curr. Genet.* – 2017. – Vol.63. – P.685–696.
44. Todd R., Lockington R., Kelly J. The *Aspergillus nidulans creC* gene involved in carbon catabolite repression encodes a WD40 repeat protein // *Mol. Gen. Genet.* – 2000. – Vol.263. – P.561–570.
45. Neer E.J., Schmidt C.J., Nambudripad R., Smith T.F. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins // *Nature.* – 1994. Vol.371. – P.297–300.
46. Hunter A., Morris T., Jin B., Saint C.P., Kelly J. Deletion of *creB* in *Aspergillus oryzae* increases secreted hydrolytic enzyme activity // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2013. – Vol.79. – P.5480–5487.
47. Denton J.A., Kelly J.M. Disruption of *Trichoderma reesei Cre2*, encoding an ubiquitin C-terminal hydrolase, results in increased cellulase activity // *BMC Biotechnol.* – 2011. – Vol.11. – P.103.
48. Hynes M., Kelly J.M., Pleiotropic mutants of *Aspergillus nidulans* altered in carbon metabolism // *Mol. Gen. Genet.* – 1977. – Vol.150. – P.193–204.
49. Chen H.I., Einbond A., Kwak S.J., Linn H., Koepf E., Peterson S., Kelly J.W., Sudol M. Characterization of the WW domain of human yes-associated protein and its polyproline-containing ligands // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol.272. – P.17070–17077.
50. Kiekhäfer C.M., Boyer M.E., Johnson K.D., Bresnick E.H. A WW domain-binding motif within the activation domain of the hematopoietic transcription factor NF-E2 is essential for establishment of a tissue-specific histone modification pattern // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol.279. – P.7456–7461.

51. Gupta R., Kus B., Fladd C., Wasmuth J., Tonikian R., Sidhu S., Krogan, N.J., Parkinson J., Rotin D. Ubiquitination screen using protein microarrays for comprehensive identification of Rsp5 substrates in yeast // *Mol. Syst. Biol.* – 2007. – Vol.3. – P.116.
52. Carlson M., Osmond B.C., Botstein D. Mutants of yeast defective in sucrose utilization // *Genetics.* – 1981. – Vol.98. – P.25–40.
53. Hardie D.G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: Conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. // Mol.Cell Biol.* – 2007. – Vol.8. – P.774–785.
54. Hardie D.G., Carling D., Carlson M. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: Metabolic sensors of the eukaryotic cell // *Annu. Rev.* – 1998. - Vol.67. – P.821–855.
55. Kayikci Ö., Nielsen J. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* // *FEMS Yeast Res.* – 2015. – Vol.15. – P.fov068.
56. Busti S., Coccetti P., Alberghina L., Vanoni M. Glucose signaling-mediated coordination of cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae* // *Sensors.* - 2010. - Vol.10. – P.6195–6240.
57. García-Salcedo R., Lubitz T., Beltran G., Elbing K., Tian Y. Frey, S., Wolkenhauer O., Krantz M., Klipp E., Hohmann S. Glucose de-repression by yeast AMP-activated protein kinase SNF1 is controlled via at least two independent steps // *FEBS J.* – 2014. – Vol.281. – P.1901–1917.
58. Adnan M., Zheng W., Islam W., Arif M., Abubakar Y. S., Wang Z., Lu G. Carbon Catabolite Repression in Filamentous Fungi // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol.19. – P.48.
59. de Vries RP. Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2003. Vol.61. – P.10–20. doi:10.1007/s00253-002-1171-9
60. Raulo R., Kokolski M., Archer D. B. The roles of the zinc finger transcription factors XlnR, ClrA and ClrB in the breakdown of lignocellulose by *Aspergillus niger* // *AMB Express.* – 2016. – Vol.6. – P.5.
61. Gruben B.S., Zhou M., de Vries R. P. GalX regulates the D-galactose oxido-reductive pathway in *Aspergillus niger* // *FEBS Lett.* - 2012. - Vol.586. - P.3980–3985. doi: 10.1016/j.febslet.2012.09.029
62. Alazi E, Niu J., Kowalczyk J.E., Peng M., Aguilar M.V., Pontes van Kan J.A.L., Visser J. de Vries R.P., Ram A.F.J. The transcriptional activator GaaR of *Aspergillus niger* is required for release and utilization of D-galacturonic acid from pectin // *FEBS Lett.* – 2016. – Vol.590. – P.1804–1815. doi:10.1002/1873-3468.12211
63. Ogawa M., Kobayashi T., Koyama Y. ManR, a transcriptional regulator of the β -mannan utilization system, controls the cellulose utilization system in *Aspergillus oryzae* // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2013. – Vol.77. – P.426–429. doi:10.1271/bbb.120795

64. Battaglia E., Visser L., Nijssen A., van Veluw G.J., Wöster H.A.B., de Vries R.P. Analysis of regulation of pentose utilisation in *Aspergillus niger* reveals evolutionary adaptations in Eurotiales // *Stud Mycol.* – 2011. – Vol.69. – P.31–38. doi:10.3114/sim.2011.69.03
65. de Vries R.P., van den Broeck H.C., Dekkers E., Manzanares P., de Graaff L. H., Visser J. Differential expression of three α -galactosidase genes and a single β -galactosidase gene from *Aspergillus niger* // *Appl Environ Microbiol.* – 1999. – Vol.65. – P.2453–2460.
66. Klaubauf S., Narang H. M., Post H., Zhou M., Brunner K., Mach-Aigner A. R., Mach R.L., Heck A.J R., Altelaar A.F.M., de Vries R.P. Similar is not the same: differences in the function of the (hemi-)cellulolytic regulator XlnR (Xlr1/Xyr1) in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol.* – 2014. – Vol.72. – P.73-81. doi:10.1016/j.fgb.2014.07.007.
67. Coradetti S.T., Craig J.P., Xiong Y., Shock T., Tian C., Glass N.L. Conserved and essential transcription factors for cellulase gene expression in ascomycete fungi // *PNAS USA.* – 2012. – Vol.109. – P.7397–7402. doi:10.1073/pnas.1200785109
68. Huberman L.B Liu J., Qin L., Glass N. L. Regulation of the lignocellulolytic response in filamentous fungi // *Fungal Biology Reviews.* – 2016. – Vol.30 (3). – P.101-111. doi.org/10.1016/j.fbr.2016.06.001
69. Coradetti S.T., Xiong Y., Glass N. L., Analysis of a conserved cellulase transcriptional regulator reveals inducer independent production of cellulolytic enzymes in *Neurospora crassa* // *Microbiology open.* - 2013. – Vol.2 – P.595-609/ doi:10.1002/mbo3.94
70. Craig J.P., Coradetti S. T., Starr T. L., Glass N. L. Direct target network of the *Neurospora crassa* plant cell wall deconstruction regulators CLR-1, CLR-2, and XLR-1 // *MBio.* – 2015. – Vol.6(5). – P.e01452-15. doi:10.1128/mBio.01452-15.
71. Xiong Y., Sun J., Glass N. L. VIB1, a Link between Glucose Signaling and Carbon Catabolite Repression, Is Essential for Plant Cell Wall Degradation by *Neurospora crassa* // *PLoS Genet.* – 2014. – Vol. 10(8). – P. e1004500.
72. Aro N., Ilmen M., Saloheimo, A., Penttilä M. ACEI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression// *Appl. and Environmental Microbiology.* – 2003. – Vol. 69. – P. 56–65.
73. Meng Q.S., Liu C.G., Zhao X.Q., Bai F.W. Engineering *Trichoderma reesei* Rut-C30 with the overexpression of *eglI* at the *aceI* locus to relieve repression on cellulase production and to adjust the ratio of cellulolytic enzymes for more efficient hydrolysis of lignocellulosic biomass // *Journal of Biotechnology.* – 2018. – Vol.285. – P.56–63.
74. Fujii T., Inoue H., Ishikawa K. Decreased cellulase and xylanase production in the fungus *Talaromyces cellulolyticus* by disruption of *tacA* and *tctA* genes, encoding putative zinc finger

- transcriptional factors // Appl Biochem Biotechnol. – 2015. – Published online. DOI 10.1007/s12010-015-1497-2
75. Gusakov A.V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production // Trends Biotechnol. – 2011. – Vol.29. – P.419–425.
 76. Zhang T., Liu H., Lv B., Li C. Regulating strategies for producing carbohydrate active enzymes by filamentous fungal cell factories // Front. Bioeng. Biotechnol. -2020. – Vol.8. – P.691. doi: 10.3389/fbioe.2020.00691
 77. Su X., Schmitz G., Zhang, M., Mackie, R., Cann I. Heterologous gene expression in filamentous fungi // Adv. Appl. Microbiol. – 2012. – Vol.81. - P.1–61. doi: 10.1016/B978-0-12-394382-8.00001-0
 78. Weinhandl K., Winkler M., Glieder A., Camattari A. Carbon source dependent promoters in yeasts // Microb. Cell Fact. – 2014. – Vol.13. – P.5. doi: 10.1186/1475-2859-13-5
 79. Zhang J., Zhong Y., Zhao X., Wang, T. Development of the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* strain with enhanced β -glucosidase and filter paper activity using strong artificial cellobiohydrolase 1 promoter // Bioresour Technol. – 2010. – Vol.101. -P. 9815–9818.
 80. Zou G., Shi S., Jiang Y., Brink J., de Vries R.P., Chen L., Zhang J., Ma L., Wang C., Zhou Z. Construction of a cellulase hyper-expression system in *Trichoderma reesei* by promoter and enzyme engineering // Microb Cell Factories. – 2012. – Vol.11 – P.21. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-21>
 81. Chen M., Qin Y., Cao Q., Liu G., Li J., Li Z., Zhao J., Qu Y. Promotion of extracellular lignocellulolytic enzymes production by restraining the intracellular β -glucosidase in *Penicillium decumbens* // Bioresource Technology. – 2013. – Vol.137. – P.33–40.
 82. Li Z., Yao G., Wu R., Gao L., Kan Q., Liu M., Yang P., Liu G., Qin Y., Song X., Zhong Y., Fang X., Qu Y. Synergistic and dose-controlled regulation of cellulase gene expression in *Penicillium oxalicum* // PLoS Genet. – 2015. – Vol.11(9). – P.e1005509. doi:10.1371/journal.pgen.1005509
 83. Derntl C., Gudynaite-Savitch L., Calixte S., White T., Mach R.L., Mach-Aigner A.R. Mutation of the Xylanase regulator 1 causes a glucose blind hydrolase expressing phenotype in industrially used *Trichoderma* strains // Biotechnology for Biofuels. – 2013. – Vol.6. – P.62.
 84. Seiboth B., Karimi R.A., Phatale P.A., Linke R., Hartl L., Sauer D.G., Smith K.M., Baker S.E., Freitag M., Kubicek C.P. The putative protein methyltransferase LAE1 controls cellulase gene expression in *Trichoderma reesei* // Molecular Microbiology -2012. – Vol.84(6). – P.1150–1164.
 85. Gao J. Production of the versatile cellulase for cellulose bioconversion and cellulase inducer synthesis by genetic improvement of *Trichoderma reesei* // Biotechnol. Biofuels. – 2017. - Vol.10. – P.272.

86. Yao G., Wu R., Kan Q., Gao L., Liu M., Yang P., Du J., Li Z., Qu Y. Production of a high-efficiency cellulase complex via b-glucosidase engineering in *Penicillium oxalicum* // *Biotechnol. Biofuels.* – 2016. – Vol.9. – P.78. doi: 10.1186/s13068-016-0491-4
87. Tanaka M., Tokuoka M., Gomi K. Effects of codon optimization on the mRNA levels of heterologous genes in filamentous fungi // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2014. – Vol.98. – P. 3859–3867. doi: 10.1007/s00253-014-5609-7
88. Archer D., Jeenes D., MacKenzie D. Strategies for improving heterologous protein production from filamentous fungi // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 1994. – Vol. 65. – P.245–250. doi: 10.1007/BF00871952
89. Gustavsson M., Lehtiö J., Denman S., Teeri T., Hult K., Martinelle M. Stable linker peptides for a cellulose-binding domain-lipase fusion protein expressed in *Pichia pastoris* // *Protein Eng.* – 2001. – Vol.14. – Vol.711–715. doi: 10.1093/protein/14.9.711
90. Ward, O. Production of recombinant proteins by filamentous fungi // *Biotechnol. Adv.* – 2011. – Vol.30. – P.1119–1139. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.012
91. Havlik D., Brandt U., Bohle K., Fleißner, A. Establishment of *Neurospora crassa* as a host for heterologous protein production using a human antibody fragment as a model product // *Microb. Cell Fact.* – 2017. – Vol.16. – P.128.
92. Gobet C., Naef F. Ribosome profiling and dynamic regulation of translation in mammals // *Current Opinion in Genetics & Development.* – 2017. – Vol.43, – P.120-127. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.03.005>
93. Merchante C., Stepanova A.N., Alonso J.M. Translation regulation in plants: an interesting past, an exciting present and a promising future // *The Plant Journal.* – 2017. – Vol. 90. – P.628–653. doi: 10.1111/tpj.13520
94. Akbergenov R., Zhanybekova S., Kryldakov R., Zhigailov A., Polimbetova N., Hohn T., Iskakov B. ARC-1, a sequence element complementary to an internal 18S rRNA segment, enhances translation efficiency in plants when present in the leader or intergenic region of mRNAs // *Nucleic Acids Res.*, - 2004. – Vol.32. – P.239-247.
95. Pfeiffer B.D., Truman J.W., Rubi G.M. Using translational enhancers to increase transgene expression in *Drosophila* // *PNAS.* – 2012. – Vol.109(17). – P.6626–6631. doi/10.1073/pnas.1204520109
96. Koda A., Minetoki T., Ozeki K., Hirotsune M. Translation efficiency mediated by the 5'untranslated region greatly affects protein production in *Aspergillus oryzae* // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2004. – Vol.66. – P.291–296. DOI 10.1007/s00253-004-1681-8

97. Goedegebuur F., Neef-Kruihof P., Pucci J.P., Ward M. Over expression of foldases and chaperones improves protein production. – 2014. U.S. Patent No 6,090,051. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. doi: 10.1074/jbc.ra119.010863
98. Nevalainen H., Peterson R. Making recombinant proteins in filamentous fungi - Are we expecting too much? // *Front. Microbiol.* – 2014. – Vol.5. – P.75. doi:10.3389/fmicb.2014.00075
99. Madhavan A., Pandey A., Sukumaran R. Expression system for heterologous protein expression in the filamentous fungus *Aspergillus unguis* // *Bioresour. Technol.* – 2017. – Vol.245. – P.1334–1342. doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.140
100. An S.J., Yim, S.S., Jeong K.J. Development of a secretion system for the production of heterologous proteins in *Corynebacterium glutamicum* using the Porin B signal peptide. *Protein Expr. Purif.* – 2013. – Vol.89. – P.251–257. doi: 10.1016/j.pep.2013.04.003
101. Zoglowek M., Lübeck P. S., Ahring B., Lübeck M. Heterologous expression of cellobiohydrolases in filamentous fungi – An update on the current challenges, achievements and perspectives. *Process Biochem.* – 2014. – Vol.50. – P.211–220. doi: 10.1016/j.procbio.2014.12.018
102. Chung H.J., Park, S.M., Kim D.H. Characterization of *Aspergillus niger* mutants deficient of a protease // *Mycobiology.* – 2002. – Vol.30. – P.160–165. doi: 10.4489/MYCO.2002.30.3.160
103. Li X., Liu Q., Sun W., He Q., Tian C. Improving cellulases production by *Myceliophthora thermophila* through disruption of protease genes // *Biotechnol. Lett.* – 2019. – Vol.42. – P. 219–229. doi: 10.1007/s10529-019-02777-0
104. Wang L., Ridgway D., Gu T., Moo-Young M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations // *Biotechnol. Adv.* – 2005. – Vol.23. – P. 115–129. doi: 10.1016/j.biotechadv.2004.11.001
105. Rojas-Sánchez U., López-Calleja A.C., Millán-Chiu B.E., Achim F.F., Loske M., Gómez-Lim M.A. Enhancing the yield of human erythropoietin in *Aspergillus niger* by introns and CRISPR-Cas9 // *Protein Expression and Purification.* – 2020. – Vol. 168. – P.105570
106. Wiebe M. Stable production of recombinant proteins in filamentous fungi - Problems and improvements // *Mycologist.* – 2003. – Vol.17. – P.140–144. doi: 10.1017/S0269915X03003033
107. Capecchi M. Altering the genome by homologous recombination // *Science.* – 1989. – Vol. 244. – P. 1288–1292.
108. Meyer V. Genetic engineering of filamentous fungi — Progress, obstacles and future trends // *Biotechnology Advances.* – 2008. -Vol.26. – Vol.177–185.
109. Hua S.B, Qiu M, Chan E, Zhu L, Luo Y. Minimum length of sequence homology required for in vivo cloning by homologous recombination in yeast // *Plasmid.* – 1997. – Vol.38. – P.91–96.
110. Chevalet L, Tiraby G, Cabane B, Loison G. Transformation of *Aspergillus flavus*: construction of urate oxidase-deficient mutants by gene disruption // *Curr Genet* – 1992. – Vol.21. – P.447–453.

111. Wu TS, Linz JE. Recombinational inactivation of the gene encoding nitrate reductase in *Aspergillus parasiticus* // Appl Environ Microbiol. – 1993. – Vol.59. – P.2998–3002.
112. Bird D, Bradshaw R. Gene targeting is locus dependent in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* // Mol Gen Genet. – 1997. – Vol.255. – P.219–225.
113. Meyer V., Arentshorst M., El-Ghezal A., Drews A.C., Kooistra R., van den Hondel C.A., Ram A.F.J. Highly efficient gene targeting in the *Aspergillus niger* kusA mutant // J Biotechnol. – 2007. – Vol.128. – P.770–775.
114. Dudasova Z., Dudas A., Chovanec M. Non-homologous end-joining factors of *Saccharomyces cerevisiae* // FEMS Microbiol Rev. – 2004. – Vol. 28. – P. 581–601.
115. Haber J.E. DNA repair. Gatekeepers of recombination // Nature. – 1999. – Vol.398. – P.665–667.
116. Nayak T., Szewczyk E., Oakley C.E., Osmani A., Ukil L., Murray S.L., Hynes M.J., Osmani S.A., Oakley B.R. A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans* // Genetics. – 2006. – Vol.172. – P.1557–1566.
117. Krappmann S., Sasse C., Braus G.H. Gene targeting in *Aspergillus fumigatus* by homologous recombination is facilitated in a nonhomologous end-joining deficient genetic background // Eukaryot Cell. – 2006. – Vol.5. – P.212–215.
118. Haarmann T., Lorenz N., Tudzynski P. Use of a nonhomologous end joining deficient strain (Δ ku70) of the ergot fungus *Claviceps purpurea* for identification of a nonribosomal peptide synthetase gene involved in ergotamine biosynthesis // Fungal Genet Biol. – 2008. – Vol.45. – P.35–44.
119. Villalba F., Collemare J., Landraud P., Lambou K., Brozek V., Cirer B., Morin D., Bruel C., Beffa R., Lebrun M.H. Improved gene targeting in *Magnaporthe grisea* by inactivation of MgKU80 required for non-homologous end joining // Fungal Genet Biol. – 2008. – Vol.45. – P.68–75.
120. Bailey S.M, Meyne J., Chen D.J., Kurimasa A, Li G.C., Lehnert B.E., Goodwin E.H. DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes // PNAS USA. – 1999. – Vol.96. – P.14899–14904.
121. Bundock P., van Attikum H., Hooykaas P. Increased telomere length and hypersensitivity to DNA damaging agents in an Arabidopsis KU70 mutant // Nucleic Acids Res. – 2002. – Vol.30. – P.3395–3400.
122. Ninomiya Y, Suzuki K, Ishii C, Inoue H. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining // PNAS USA. – 2004. – Vol.101. – P.12248–12253.
123. da Silva Ferreira M.E., Kress M.R., Savoldi M., Goldman M.H., Hartl A., Heinekamp TA, Brakhage A., Goldman G.H. The akuB (KU80) mutant deficient for nonhomologous end joining is a powerful tool for analyzing pathogenicity in *Aspergillus fumigatus* // Eukaryot Cell. – 2006. – Vol.5. - P.207–211.

124. Nielsen J.B., Nielsen M.L., Mortensen U.H. Transient disruption of nonhomologous end-joining facilitates targeted genome manipulations in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* // Fungal Genet Biol. – 2008. – Vol.45(3), - P.165-170 doi:10.1016/j.fgb.2007.07.003.
125. Harikumar K.B., Aggarwal B.B. Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases // Cell Cycle. - 2008. - Vol.7. - P.1020—1035.
126. Li G., Zhang X., Zhong C., Mo J., Quan R., Yang J., Liu D., Li Z., Yang H., Wu Z. Small molecules enhance CRISPR/Cas9-mediated homology-directed genome editing in primary cells // Sci Rep. - 2017. - Vol. 7. - P.8943.
127. Delmas S., Llanos A., Parrou J. L., Kokolski M., Pullan S. T., Shunburne L., Archer D. B. Development of an unmarked gene deletion system for the filamentous fungi *Aspergillus niger* and *Talaromyces versatilis* // Applied and Environmental Microbiology - 2014., - Vol.80(11) - P.3484–3487.
128. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase conversation in *Escherichia coli*, and identification of the gene product // J. Bacteriol. - 1987. - Vol.169. - P.5429 – 5433.
129. Mojico F.J., Diez-Villasenor C., Soria E., Juez G. Biological significans of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria // Mol. Microbiol. - 2000. - Vol.36. - P.244–246.
130. Jansen R., van Embden J. D. A., Gaastra W., Schlous L. M., Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes // Mol. Microbiol. - 2002. - Vol. 43. - P. 1565–1575.
131. Barrangou R., Fremax C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D. A., Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes // Science. - 2007. - Vol.315. - P.1709–1712.
132. Редактирование генов и геномов: Том 1 / отв. ред. С. М. Закиян, С. П. Медведев, Е. В. Дементьева, Е. А. Покушалов, В. В. Власов; Рос. акад. наук, Сиб. отделение, ФИЦ Ин-т цитологии и генетики [и др.] – 2-е изд., расширенное и дополненное. – Новосибирск: Издательство СО РАН, 2018. – 369 с.
133. Makarova K.S., Wolf Y.I., Koonin E.V. The basic building blocks and evolution of CRISPR-CAS systems // Biochem. Soc. Trans. - 2013. - Vol.41. - P.1392-1400.
134. Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA ckeavage for adaptive immunity in bacteria // PNAS. – 2012. – Vol. 109. – P. E2579-E2585.
135. Jiang F., Zhou K., Ma L., Gressel S., Doudna J. A. A Cas9-guide RNA complex preorganaized for target DNA recognition // Science. - 2015. - Vol.348. - P.1477–1481.

136. Stenberg S. H., Redding S., Jinek M., Greene E. C., Doudna J. A. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9 // *Nature*. - 2014. - Vol.507. - P.62–67.
137. Lee C.M., Cradick T.J., Bao G. The *Neisseria meningitidis* CRISPR-Cas System enables specific genome editing in mammalian cells // *Mol. Ther.* - 2016. - Vol.24. - P.645 – 654.
138. Sontheimer E. J., Barrangou R. The bacterial origins of the CRISPR genome-editing revolution // *Human gene therapy* - 2015. - Vol. 26(7). DOI: 10.1089/hum.2015.091
139. Essletzbichler P., Konopka T., Santoro F., Chen D., Gapp B.V., Kralovics R., Brummelkamp T.R., Nijman S.M.B., Bürckstümmer T. Megabase-scale deletion using CRISPR/Cas9 to generate a fully haploid human cell line // *Genome Res.* – 2014. – Vol. 24. – P.2059–2065.
140. Maddalo D., Manchado E., Concepcion C., Bonetti C., Vidigal J.A., Han Y.C., Ogradowski P., Crippa A., Rekhtman N., de Stanchina E., Scott W. Ventura L., Ventura A. In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system // *Nature*. – 2014. – Vol.516. – P.423–427.
141. Cong L., Ran F. A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P. D., Wu X., Jiang W., Marraffini L. A., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems // *Science*. - 2013. - Vol.339. - P.819—823.
142. Epinat J., Arnould S., Chames P., Rochaix P., Desfontaines D., Puzin C., Patin A., Zanghellini A., Pâques F. A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells // *Nucleic Acids Res.* - 2003. - Vol.31. - P.2952—2962.
143. Bibikova M., Golic M., Golic K.G., Carroll D. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases // *Genetics*. - 2002. - Vol.161. - P.1169—1175.
144. Cermak T., Doyle E., Christian M., Wang L., Zhang Y., Schmidt C., Baller J., Somia N., Bogdanove A. J., Voytas D. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting // *Nucleic Acids Res.* - 2011. - Vol.39(12). - P.e82.
145. Рожкова А. М., Кислицин В. Ю. Редактирование геномов мицелиальных грибов: применение системы CRISPR/Cas // *Успехи биологической химии*. – 2021. – Том LXI, - С.253-294.
146. Cui Y., Xu J., Cheng M., Liao X., Peng S. Review of CRISPR/Cas9 sgRNA Design Tools // *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*. - 2018. - Vol.10(2). - P. 455–465.
147. Song R., Zhai Q., Sun L., Huang E., Zhang Y., Zhu Y., Guo Q., Tian Y., Zhao B., Lu H. CRISPR/Cas9 genome editing technology in filamentous fungi: progress and perspective // *Applied Microbiology and Biotechnology*. - 2019. - Vol.103 - P.6919–6932.
148. Nielsen M.L., Isbrandt T., Rasmussen K.B., Thrane U., Hoof J.B., Larsen T.O., Mortensen U. H. Genes linked to production of secondary metabolites in *Talaromyces atrovirens* revealed using

- CRISPR-Cas9 // PLoS ONE. - 2017. - Vol. 12(1). - P.e0169712. doi:10.1371/journal.pone.0169712
149. Wu. C., Chen Y., Qiu Y., Niu X., Zhu. N., Chen J., Yaq H., Wang W., Ma. Y. A simple approach to mediate genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* by CRISPR/Cas9-coupled in vivo gRNA transcription // Biotechnology Letters. - Vol.42. - P.1203-1210.
150. Liu R., Chen L., Jiang Y., Zhou Z., Zou G. Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas system // Cell Discovery. - 2015. - Vol.1 – P.15007.
151. Rantasalo A., Vitikainen M., Paasikallio T., Jäntti J., Landowski C. P., Mojzita D. Novel genetic tools that enable highly pure protein production in *Trichoderma reesei* // Scientific reports. - 2019. – Vol.9. – P.5032. doi.org/10.1038/s41598-019-41573-8.
152. Nødvig C. S., Nielsen J. B., Kogle M. E., Mortensen U. H. A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi // PLOS One. - 2015. – Vol.10(7). – P.e0133085. doi:10.1371/journal.pone.0133085.
153. Kuivanen J., Wang Y.-M. J. Richard P. Engineering *Aspergillus niger* for galactaric acid production: elimination of galactaric acid catabolism by using RNA sequencing and CRISPR/Cas9 // Microb Cell Fact. - 2016. - Vol.5. – P.210. DOI 10.1186/s12934-016-0613-5
154. Zheng X., Zheng P., Zhang K., Cairns T. C., Meyer V., Sun J., Ma Y. 5S rRNA promoter for guide RNA expression enabled highly efficient CRISPR/Cas9 genome editing in *Aspergillus niger* // ACS Synth. Biol. - 2018. - Vol.8,7. - P.1568-1574.
155. Pohl C., Kiel J. A. K. W., Driessen A. J. M., Bovenberg R. A. L., Nygard Y. CRISPR/Cas9 based genome editing of *Penicillium chrysogenum* // ACS Synth. Biol. - 2016. - Vol.5. - P.754–764.
156. Nielsen M.L., Isbrandt T., Rasmussen K.B., Thrane U., Hoof J.B., Larsen T.O., Mortensen U. H. Genes linked to production of secondary metabolites in *Talaromyces atrovirens* revealed using CRISPR-Cas9 // PLoS ONE. - 2017. - Vol.12(1). – P.e0169712. doi:10.1371/journal.pone.0169712
157. XL1-Blue Competent Cells 200249-11 Manual // <https://www.chem-agilent.com/pdf/strata/200249.pdf>
158. Aleksenko A., Makarova N., Nikolaev I., Clutterbuck A. Integrative and replicative transformation of *Penicillium canescens* with a heterologous nitrate-reductase gene // Current Genetics. - 1995. - V.28. - P. 474-478.
159. Кислицин В.Ю., Чулкин А.М., Синельников И.Г., Сеницын 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. – Том.61. - №4. - С. 47 – 54.

160. Aslanidis C., de Jong P.J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR) // *Nucleic Acids Res.* – 1990. – Vol.18. – P.6069–6074.
161. Патент №2378372 РФ от 10.01.2010. Синицын А.П., Рожкова А.М., Синицына О. А. Федорова Е.А., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Соколова Л.М, Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Винецкий Ю.П., Черноглазов В.М., Зоров И.Н. Генетическая конструкция для обеспечения экспрессии целевых гомологичных и гетерологичных генов в клетках мицелиального гриба *Penicillium verruculosum*, используемого в качестве хозяина. 2010.
162. Froger A., Hall J.E. Transformation of Plasmid DNA into E. coli Using the Heat Shock Method // *Journal of Visualized Experiments : JoVE*. MyJoVE Corporation, 2007. Vol. 6, № 6.
163. Кислицин В.Ю., Чулкин А.М., Зоров И.Н., Шашков И.А., Сатрутдинов А.Д., Синицын А.П., Рожкова А.М. Влияние моно- и олиго сахаридов на транскрипцию гена *cbh1* в мицелиальном грибе *Penicillium verruculosum* // *Биотехнология.* – 2021. - Том.37. - №1. - С. 45-53.
164. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol.193(1). – P.265–275.
165. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. - Vol.227. - P.680-685.
166. Smith BE. Protein sequencing protocols. Totowa: Humana Press. - 1997.
167. Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of sugars // *J Biol Chem.* – 1944. – Vol.153. – P.375–379.
168. Gusakov A.V., Kondratyeva E.G., Sinitsyn A.P.. Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities // *International Journal of Analytical Chemistry.* – 2011. Article ID 283658. doi.org/10.1155/2011/283658
169. Volkov P.V., Rozhkova A.M., Zorov I.N., Sinitsyn A.P., Cloning, purification and study of recombinant GH3 family β -glucosidase from *Penicillium verruculosum*. -*Biochimie.* – 2020. – Vol.168. – P. 231-240.
170. Bergmeyer H.U., Gawehn K., Grassl M. *Methods of Enzymatic Analysis*. 2nd ed. New York: Academic Press Inc: 1974.
171. Siebert P.D., Chenchik A., Kellogg D.E., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA // *Nucleic Acids Res.* - 1995. - Vol.23(6). - P.1087.
172. 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.

173. Dingwall C., Robbins J., Dilworth S.M., Roberts B., Richardson W.D. The nucleoplasmin nuclear location sequence is larger and more complex than that of SV-40 large T antigen. // J. Cell Biology. - 1988. - Vol.107(3). - P.841.
174. Katayama T., Nakamura H., Zhang Y., Pascal A., Fujii W., Maruyama J.I. Forced recycling of an AMA1-based genome-editing plasmid allows for efficient multiple gene deletion/integration in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae* // Appl Envir Microbiol. - 2019. - Vol. 85(3). - P.e01896–e01818. Doi:10.1128/AEM.01896-18
175. Huang L, Dong H, Zheng J, Wang B, Pan L. Highly efficient single base editing in *Aspergillus niger* with CRISPR/Cas9 cytidine deaminase fusion // Microbiol Res. - 2019. - Vol. 223. - P.44–50. doi:10.1016/j.micres.2019.03.007.
176. Fuller K.K., Chen S., Loros J.J., Dunlap J.C. Development of the CRISPR/Cas9 system for targeted gene disruption in *Aspergillus fumigatus* // Eukaryotic Cell. - 2015. - Vol.14(11). - P.1073–1080. doi:10.1128/EC.00107-15.
177. Cove D.J. Chlorate Toxicity in *Aspergillus nidulans*. Studies of Mutants Altered in Nitrate Assimilation // Molec. gen. Genet. - 1976. - Vol.146. - P.147-159.
178. Katayama T., Tanaka Y., Okabe T., Nakamura H., Fujii W., Kitamoto K., Maruyama J. Development of a genome editing technique using the CRISPR/Cas9 system in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae* // Biotechnol Lett. - 2016. - Vol.38. - P.637–642. doi:10.1007/s10529-015-2015-x
179. Salazar-Cerezo S., Kun R.S., de Vries R.P., Garrigues S. CRISPR/Cas9 technology enables the development of the filamentous ascomycete fungus *Penicillium subrubescens* as a new industrial enzyme producer // Enzyme and Microbial Technology. - 2020. - Vol.133. - P.109463.
180. Wong C.M., Wong K.H., Chen X.D. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications // Appl Microbiol Biotechnol. - 2008. - Vol. 78. - P. 927–938.
181. Болотова К.С., Новожилов Е.В. Применение ферментных технологий для повышения экологической безопасности целлюлозно-бумажного производства // Химия растительного сырья. - 2015. - №3. - С.5-23.
182. Suominen P.L., Mantyla A.L., Karhunen T., Hakola S., Nevalainen H. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei* II. Effects of deletions of individual cellulase genes // Mol Gen Genet - 1993. - Vol.241. - P.523-530.
183. Ren M., Wang Y., Liu G., Zuo B., Zhang Y., Wang Y., Liu W., Liu X., Zhong Y. The effects of deletion of cellobiohydrolase genes on carbon source-dependent growth and enzymatic lignocellulose hydrolysis in *Trichoderma reesei*. // Journal of Microbiology. - 2020. - Vol. 58(8). - P. 687–695. DOI 10.1007/s12275-020-9630-5

184. Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R. M., Pravilnikov A.G., Osipov D.O., Sinitsyn A.P. Cellulase complex of the fungus *Penicillium verruculosum*: properties of major endoglucanases and cellobiohydrolases // *Biotechnol. J.* – 2010. – Vol. 5(8), - P. 871–880.
185. Dotsenko G.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Korotkova O.G., Sinitsyn A.P. Heterologous β -glucosidase in a fungal cellulase system: comparison of different methods for development of multienzyme cocktails. *Process Biochem.* – 2015. – Vol. 50. – P. 1258–1263
186. Peij van N.M.E., Visser J., de Graaf Leo H. Isolation and analysis of XlnR, encoding a transcriptional activator co-ordinating xylanolytic expression in *Aspergillus niger*. *Mol. Microbiol.*, 1998, 27, 131–142. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00666.x
187. Mach-Aigner A.R., Omony J., Jovanovic B., van Boxtel A.J., de Graaff L.H. D-xylose concentration-dependent hydrolase expression profiles and the function of CreA and XlnR in *Aspergillus niger* // *Appl. Environ. Microbiol.*, - 2012. Vol.78(9). – P.3145–3155. doi: 10.1128/AEM.07772-11
188. Kurasawa T., Yachi M., Suto M., Kamagata Y., Takao S., Tomita F. Induction of cellulase by gentiobiose and its sulfur-containing analog in *Penicillium purpurogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.* – 1992. – Vol.58(1). – P.106–110. doi: 10.1128/AEM.58.1.106-110.1992
189. Sternberg D., Mandels G.R. Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. *J. Bacteriol.* – 1979. – Vol.139(3). – P.761–769. doi: 10.1128/JB.139.3.761-769.1979
190. Texier H., Dumon C., Neugnot-Roux V., Maestracci M., O'Donohue M.J. Redefining XynA from *Penicillium funiculosum* IMI 378536 as a GH7 cellobiohydrolase // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2012. – Vol.39(11). – P.1569–1576. doi: 10.1007/s10295-012-1166-1
191. Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R.M., Pravilnikov A.G., Osipov D.O., Sinitsyn A.P. Cellulases of *Penicillium verruculosum* // *Biotechnol. J.* – 2010. – Vol.5(8). – P.871–880. doi: 10.1002/biot.201000050
192. Кислицин В.Ю., Чулкин А. М., Зоров И.Н., Синельников И.Г., Сеницын А.П., Рожкова А.М. Функция транскрипционного фактора XlnR у мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* // *Биотехнология.* – 2022. – Том38. - №6. – С.29–39.
193. Vassilev, S.V., Baxter, D., Andersen, L.K., Vassileva, C.G., Morgan, T.J. An overview of the organic and anorganic phase composition of biomass // *Fuel.* – 2012. – Vol.94. – P.1–33. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.09.030>.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности Clr1 (желтым цветом выделены последовательности домена «Цинковые пальцы»)

atgagcaagcgtcctcacgaagattctgtcttctcaaagactgccaaacttctggaacgatctgcttcgacgcc
 ggaatagtatctctatcaacgagctgctatccaattccgaggagccagacgcagatcagtcgagattcatact
 cgcaagccaagaaactatatcgcttctgtggtatgtacttcttccttccctaatacataaaaagtgatgaataggcc
 tagtaactgatgaccaaaaaggca**tgcgaaaattgtcgggttaaaaaagacaagatgtgatgaatcacgccaaga**
tgcgggctctgcaaagccctgaaacttgggaatgcggtacagtgagcgcaaaactgtccaaaaaggatcagtcctac
 ggcgatgataagcacattgcatcgcattgagacgaagctagaaaatcttccgctctgtgatttctaacgatatt
 cgacctatcacgggcatgtcttgaggcgggtggaagccattcaagcatctgcatcaactaccagggctgggacg
 ccaagtgcgaggacgctcgtcgcataagttctcattatcacagaatacctcgccggctgccactggctcgtggtgag
 gtggaacgcaggggtcccaccgatggcagagaggtcatctcgttcagccagcatggagtcgtggtatggccggga
 atggccgaccatctgccggagaaaattctgggaagtctatgatcaaactcgggaaggaactatgtcctcgacgctcga
 ttggagcgaccgcctcttccgatgtgggtgaaactcaccattcggattaccgaatacaggcaactggctagaagag
 ttgccccttgcgcttggtgaaagggctatgcgaggcgttcttctcgttggtttcacccttttactccattcatggac
 aaacatttcttcttctcgcttactctcggaactgtcatcaaacatgggttttccaccacgatcgagacatgtctg
 gtgttgatgtgatggcgttaggctgcttagccgtgcgtgcatacgaagaagcagactttcccttaccggggacg
 attggtgatcacttgaacgacctgcctggnncgaagcggattggaagatcctcctggattgtctttttcaat
 gaagcccggaacggatgggcttctcatggagaagaacagcctgtctagttgtcaatactacttttatcagcg
 tatggtgatctccgtgctcctaataagactaaaataggctcgtttgctaacactacgtttaataggatgtattatag
 catataattcgtccacttgattccggcgcaatgcttaatagagctgctgcttgcttatgtttatggttagcgaat
 cgtgatatacaactacaatgaatgggaagggcagatagaagtccaggtatgaagatcagaccgacccttcgaagagt
 tagctgacacgctccacagagtttctggaacacagtgatgtacgagacgattctcgtgcaggagctagatctac
 ctccaagtggctcgttgctcttgaagacaacggtcccatcccaaaatcctcctcgttcaaaactgtcctcagaga
 tcacaccaatgcccgatccagatgactcgtactatcaccaatgtcatttctcgcacagattgccaatcggatca
 tactcactcgaatccgacatagcttcttacttattctgtaagcacaaaatcttcggcaaacctcgttagatcgca
 tactgatataacagccgaatccggaaccctccctcggccagcctcagcatagaactccacaacaagtccaag
 aatggcgcagaaacctcccctcagcaatccaattctccgaaaccaattcagacaccacattaaacgatgaccgct
 cgccttctataaccggcacaccacgaacctcaactcgcctggcagtgcttagtcgccgactcgatgcttcgcgcc
 gctatcgaatctgcaagtttcacattggctcggccgtacctgtacaaagcgtgagaacaccggctctcttgacgg
 atgaagactttgagcagatccgtagcggactcaggttcgctatggattggcctatgattagggggcgtcttccggc
 tgatgaggagttgcatccctatcagatttgcgctttggttcgcagtatgcctttccccttgtttatttcaatgcc
 gaaactaatgcatgacagattcttcggccaactactcattttccacgcaatatcaaagtccggacgtcccacgat
 tgcgtgcgactttaccccagggttgggaaagatggtatgacgagatgggtggaatttctagattattgtgccgcgt
 acagtcggcgattagtcgggatatggaccttggtcggctggtatag

MSKRPHEDSVFSKTNFLERSASTPGNSISINELLSNSEEPDADQSEIHKTRKPRNYIASVA**CENCRLKKTRCDES**
RPRCGLCKALNLECVYSERKLSKDKDSIGMIISTLHRIETKLENLPSVISNDIRPITGHVQLQAVEAIQASASTTT
 AGTPSARTSSHKFSLSQNTSPAATGLVEVETQGPTDGREVISFSQHGTVVWPGMADHLPEKFWVEVDQIGRNYVL
 DVELERPPLPMWVNSPFGLPNTGNWLEELPFALVKGLCEAFFSLFHPFPTPFMDKHFFFSLTLGTVIKHFSTTIE
 TCLVLNVMALGCLAVRAYEEADFLPGTIGDHFERPAW?EAVLEDPPGLSFFNEARKRMGFLMEKNSLSSCQYYL
 LSAMYTHIIRPLDSGAMLNRAAACLCFMLANRDINYNEWEGDMKSRVFWNTVMYETILVQELDLPPSGLLSLED
 NVPKIPKFIKLSSEITPMPDPDDSYHQCHFLAQIANRIILTRIRHSLYLFSESGTLPRPAVSIELHKQVEEWR
 RNLPSAIQFSETNSDTTLNDDRSPSITGTPRTSTSLAVLVADSMRLRARIKFKHIGRPYLYKALRTPALLTDED
 FEQIRSGRLRFAMDWPMIRGVFRLMRSCIPIRFAFCSQFFGQLLIFHAISKSDVPRLRATLPQGWERYDEMVEFL
 DYCAAYSPAISRDMDLVRL*

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности C1r2 (желтым цветом выделены последовательности домена «Цинковые пальцы»)

atgtttctcacattcgagtcctccaacccagcaacaaaaacggccttcgcaaccctaacaactacaacaaga
 cgaagcagcggctcaaccgacgacgccgctccacgccgcgagca**tgtaacttcatgccgtcaacggaaaattaga**
tgcgatggcgagaagccctgtgaagcttgtcggtggtacaagaaggctgagcaatgtagctaccgggaacgggag
 agagagag**gtaagtcataaaaatcggggggacgaccaaaaggaaagagatatgaactcaacgatatag**tcaactcaga
 agagacatcatcattaccggattatcgagcagcgttagaacggctatttcccagacagcgcctgagaatatcgt
 gaacctatcgagggagagattgctagctttgatatacaagcctacggatggatctcattactctgctcagtccca
 acatcaagattcattgacaatcgccacatccgcgtctgtagaacacatgtctccgcattgtcaatggaaaggcc
 aggtctggagtctctgcatgcgataccaggagaacaagaacaactcgatgaaaccagtgctagcgcgtctga
 agagtcagaagagcatatatcagacgacgtcaatgcggtgtctctaccagctcggaatcttacttcataatctggg
 cgtatcgtctatccaggctgcgctcaaagtcattgcggtggctccatccggaattgaatgcacatcttagttctcc
 caaagatcagcgtcatcatcaccatcgttcttcaatttcagctggctaccacctacagaactacaattgctaga
 tgcgtattttgacaactttcaacctttctcaccactactagatgaagaaatctgtcgcgtcaacttttctatccgg
 ccgcagaaaggacgatcgctggtagccctactcaatataatccttgactaggaagcatcaccgccgcaggcgt
 ggataaccacaaccaccgggcatactttgagcgttcaatgagctttctcaatctcaaaacctcgggaacccccag
 tctcgaagtcgtccagactctggggctcatgggaggctggtagtgcactacatcagccagcccaatctcggata
 cgcactcatgggcgctcgttgcgtatggcggttacttaggtctgcagcgagaacccccggttgatagtcattc
 gttgggtggcaatactgctagatcagggatcaggaattcaaacggagg**gtttgggtggcgtttgttgtctgga**
gacatggggccacgagacactgggaaggccgagtatggatttctttgggccgagtattacgggtcaagtttctca
cttacttgataaggtcccttccccctttccaaaagctccgaattgaatattaatgggtaatagggagaattacatc
 aaagccctccctctaatacgaacgtaacaattcatcaaaatcgctccaagatccaggaatctctcgccgcactc
 ccgaccctaacacacacggaactgctcaatctagattcccacttcttcaatgggtggaataaccttccaccagtc
 ctgaaggactactcccccttgccctgacgctctgtacgccccgcgaacagtaatgcgcttggcgcttctacaatcag
 cgcatgctcctctaccgccctcgcttgcgtgaattatgcaatgcgccgcacatcccttgatagcaatcaagacgaa
 gaacgcaccgcagttcaacgatgtcgcaaatgacacaggtcgcgattgaggatatttctccactacagcgatg
 aatatgaatcaaatgattgcggtggaatgcggtgtggttgggtgttccaggctaccatgggtgccgttgatatact
 tctgctgcagcagtggttaactgataaggatgatggcagtgccgaggtcgaagcgtgtaaagcgcaagtccaaact
 gcgatagcagcgtggatcgtatgagggcgtatggacatacggctgagcggctcgctggggatgatctcaagtatt
 cttgagactatttgcatacgcctgacactagattgacgacaaatgcctcggcagcgaatgactatgagaatacg
 gaaaccagaattatcctcctattccgacggattatcaaccatcacccgagaagggttttgattggaccgct
 actaccgctgcgactaccggcgccaccaatacgtcttttgagaattattcgtcccagcatatgtgggagtatctg
 agctggggcgagaataatgatatctgggctgagctgtatactagtttgaatcctcaagagggggcaaatctctc
 gatgctaggatccagtga

MFLTFESSQPSNKNGLRNPKQTTTRRSERLNRNRRRSTPRA**CTSCRQRKIRCDGEKPCEACRWYKKAEQCS**YPERE
 RESHSEETSSLPDYRAALERLFPETAPENIVNLSRERLLALISKPTDGSHYSAQSQHQDSLTIATSASVETHVSA
 LSMERPGLESLHAIPGEQEQLDETQCASASEESEEHISDDVNALSPLARNLTSYLGVSSIQAALKVIAWLHPELN
 AHLSSPKDQRHHHRSSISAGLPPTTELQLLDAYFDNFQPFSPLLDEEICRSTFLSGRRKDDRWLALLNII LALGS
 ITAAGVDNHNHRA YFERSMSFLNLKTLGNPSLEVVTGLGLMGGWYCHYISQPNLGYALMGASLRMAVTLGLQREP
 PFDSHSLGGNTARSGYQEFKRRENYIKALPLIENVQFIKIASKIQESLALPTLTHTELLNLDSQLLQWNNLPP
 VLKDYSPCPDALYAPRTVMRWRWFYNQRMLLYRPLLNYAMRRIPLIAIKDEERTAVQRCREIAQVAIEDISSTTA
 MNMNQMIAWNAVWL V FQATMVPLIYLSAAAVVTDKDDGDGEVEACKAQVQTAIATLDRMRRYGH TAERSLGMISS
 ILETILHTPDTRLTTNASAANDYENTETQNYPP IPTDYQPI TRERVL DWTATTAATTGATNTSFENYSSQHMWEY
 LSWGNNDIWAELYTSLNPQEGANFFDARIQ*

GDFANAGYRRAGPSFECTGHGMFGYFLPLMTILGEIVDLNHARNHPRFGIHFRTSGEWDSTVEITRQLDVYEQ?
LREFETRH?ASLGIGSEGAADAGFNAAAPTGIDHVSPSARSSSTVGSRVNESLMQTKMVAAYGTLYMHVLHILLV
GKWDPISLLDDNDLWISSEAFITAMGHAVKAAEAASDILEYDPDLSFMPFFFGIYLLQGSFLLLLLTADKLQGDAD
PSVVRACETI?RAHEACVVTLNTEYQRNFRKVMRSALAQVRGRVPDDFGEQQRRREVLALYRWTGDGSGLAL*

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности ТасА (желтым цветом выделены последовательности домена «Цинковые пальцы»)

atgggttttccgattaattacctgctgcaacttttacagtcggtcacgtaccacttccttcccgttcatggaccg
 gaaggaaagtgtaccttccctattgtcctcttcaaagtctgccagaagcaacagcaacagtccttgaaacctgcc
 gacaataccaacaagaacacttccatggacaacaacggcaacacccacaccacgtatgtctttcccttgtccttc
 ggttttctctctctgactgaattaggatggaatctccctccactcttctccaaaacctcaaccttgacggggct
 ctgaaaagactctgcctgccatcatgctctctcctctcgattcccgtccattgatgtaccccgccgtgctctatg
 agacacgaaagaatcctgccgttatgaagcactcgctggctgaggccaacggcgaagcagatgccgaagacgatg
 tgcagcgtccatggctaggaggaaaaagaacgagccgcccattggacatcacaagaagtgcagccactgcgaca
 aagtcttcaagcgtccttgcgacttcaccaagcagaaaagacacactctcgtccttgggaagtgtcccatcgaag
 actgcaaataccaccacgtcggatggccgaccgagaaggagcgtgaccgtcatgtcaacgaccgtcattcagaca
 acccactgcttacaactgcatgtttaatccatgtacatacacctccaagcgagagagcaatctcaagcaacaca
 tggaaaaggctcacggctggaagtacgttcgatcaaagaagaacggcaagcgtggacagaccccgtctgctccg
 agggctctcctaaccagactactcctcccactccttctatgcccttgactcccgccatgtctactcccgtctcta
 gtcttagcactgagcttccgtctccgtccagcggtcacatgccttctccttattcccagaccatgtcagccaatg
 agcctgttatctacaacggctcttacgtcgatggctacaccaacatggctaattggccagacggttcaactttgccg
 atccacccatgatgtctgggttatgattactcagactttcaactcttcccgtctgccgatctcgacaacatcagtc
 tggatcctgttccctcattcgcagaccgaagacttcaccaggtctcttgaggccggcaactctcacgatttaatat
 cgcagccgccaagtgccgacatgactttggatcagttgggtcaagaccacctcaaccgactgctttgatagtg
 aattctacaactaccagtcaaatggaatggccgacttccagtccaatgggatgtctgactttcaaccgaccaacg
 ggatgccggaatttcaccacaacgggatgcccagtttta

MGFPINYLQLLQSVTYHFLPVHGPEGKCTFPIVLKFVCQKQQQSLKPADNTNKNTSMDNNGNTHTTMES PSTL
 LQNLNLDGVSEKTLPAIMLSPLDSRPLMYPVLYE'TRKNPAVMKHSLEVEANGEADAEDDVQRSMARRKKNEPPMD
 INKKCSHC DKVFKR PCDFTKHEKTHSRPWKCP IEDCKYHHVGPTEKERDRHVNDRHSDNPPAYNCMFN PCTYTS
 KRESNLKQHMEKAHGWKYVRSKKNKGRGQTPSASEGSPNQTPPTPSMPLTPAMSTPVSSSLSTELPSPSSGHMPS
 PYSQTMSANEPVIYNGSYVDGYTNMANGQTFNFADPPMMSGYDYSDFQLFPSADLDNISLDPVPHSQTEDFTRSL
 EAGNSHDLISQPPSADMTLDQLGQDHLNPHYCFDSEFYNYQSNGMADFQSNGMSDFQPTNGMPEFHNGMPEF*

Рекомендуемые условия культивированию штамма *P. verruculosum* ΔtacA для получения гидролитического ферментного препарата:

Среда для наращивания инокулята для засева ферментёров (г/л): патока – 21, дрожжевой экстракт – 10, пшеничные отруби – 10, KH_2PO_4 –15; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ –0,3; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ –5.

Состав среды СФС для культивирования в ферментёрах (г/л): МКЦ – 40; кукурузный экстракт – 30, пшеничные отруби – 10; KH_2PO_4 –14; CaCl_2 –0,6; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ –10; мочевины – 2,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,6.

Состав подпитки при культивировании в ферментёре (г/л): глюкоза - 37,5; МКЦ – 10.

Температура ферментации 32°C, pH 4,75±0,25, парциальное давление кислорода ($p\text{O}_2$) на уровне 30% от насыщения, расход воздуха 0,5 л/мин.

Инокулят выращивать в колбах Эрленмейера объемом 750 мл в 100-200 мл среды для инокулята в течение 48 часов при 30 °C и перемешивании со скоростью 220 об/мин. Полученным инокулятом засеивать ферментёр со средой СФС. Культивирование проводить в течение 96 часов. В процессе культивирования в ферментёр вносить подпитку на 48 и 72 часа.

После окончания ферментации КЖ осадить центрифугированием при 6000 об/мин в течение 20 мин. Проверить активность полученных супернатантов по МКЦ, КМЦ, ксилану и пНФГ, и высушить распылительной сушкой.

Рекомендуемые условия культивированию штамма *P. verruculosum* dT16-13 для получения гидролитического ферментного препарата, обогащённого β -глюкозидазой *A. niger*:

Среда для наращивания инокулята для засева ферментёров (г/л): патока – 21, дрожжевой экстракт – 10, пшеничные отруби – 10, KH_2PO_4 –15; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ –0,3; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ –5.

Состав среды СФС для культивирования в ферментёрах (г/л): МКЦ – 40; кукурузный экстракт – 30, пшеничные отруби – 10; KH_2PO_4 –14; CaCl_2 –0,6; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ –10; мочевины – 2,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,6.

Состав подпитки при культивировании в ферментёре (г/л): глюкоза - 37,5; МКЦ – 10.

Температура ферментации 32 °С, рН 4,75±0,25, парциальное давление кислорода ($p\text{O}_2$) на уровне 30% от насыщения, расход воздуха 0,5 л/мин.

Инокулят выращивать в колбах Эрленмейера объемом 750 мл в 100-200 мл среды для инокулята в течение 48 часов при 30 °С и перемешивании со скоростью 220 об/мин. Полученным инокулятом засеивать ферментёр со средой СФС. Культивирование проводить в течение 144 часов. В процессе культивирования в ферментёр раз в сутки вносить подпитку начиная с 48 часа и до 120 часов.

После окончания ферментации КЖ осадить центрифугированием при 6000 об/мин в течение 20 мин. Проверить активность полученных супернатантов по МКЦ и пНФГ, и высушить распылительной сушкой.