

ФУНКЦИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА XlnR У МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *Penicillium verruculosum*

© 2022 г. В. Ю. Кислицин¹, А. М. Чулкин¹, И. Н. Зоров^{1, 2},
И. Г. Синельников¹, А. П. Сеницын^{1, 2}, А. М. Рожкова^{1, *}

¹Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

²Химический факультет, Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: amrojkova@yahoo.com

Поступила в редакцию 31.08.2022 г.

После доработки 18.10.2022 г.

Принята к публикации 21.10.2022 г.

Мицелиальный гриб *Penicillium verruculosum* является высокоактивным продуцентом ферментов целлюлолитического комплекса — целлюбогидролаз, эндоглюканаз и β -глюкозидаз. С помощью ранее адаптированной для *P. verruculosum* системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 был получен штамм с нокаутом гена *xlnR*, кодирующего XlnR — один из основных транскрипционных факторов мицелиальных грибов. Методом количественной ПЦР был определен уровень транскрипции генов целлюлолитического комплекса для штамма *P. verruculosum* В1-221-151 и нового штамма *P. verruculosum* Δ xlnR. Показано, что белок XlnR активирует транскрипцию генов *cbh1*, *egl2* и *bgl1*, кодирующих целлюбогидролазу 1, эндоглюканазу 2 и β -глюкозидазу, соответственно, при наличии в ростовой среде ксилоты и ксилоолигосахаридов. Установлено, что в активации транскрипции этих генов целлюбиозой, целлотриозой, софорозой и гентиобиозой участвуют и другие транскрипционные факторы, определяя их комплексный эффект в биосинтезе целлюлолитического комплекса ферментов, продуцируемых грибом *P. verruculosum*.

Ключевые слова: *Penicillium verruculosum*, XlnR, целлюбогидролаза 1, эндоглюканаза 2, β -глюкозидаза, транскрипция, CRISPR/Cas9

DOI: 10.56304/S0234275822060084

Технология CRISPR/Cas9 является популярным инструментом геномного редактирования прокариотических и эукариотических организмов, благодаря простоте адаптации, позволяющей быстро корректировать геномы и, соответственно, метаболические пути различных организмов [1]. Первые работы по применению CRISPR/Cas9 появились в 2013 году [2, 3], на сегодняшний момент, данная технология прочно вошла в арсенал современных методов молекулярной биологии и биотехнологии [4].

Впервые редактирование генома мицелиального гриба *Aspergillus aculeatus* было проведено в 2015 году [5]. В современной мировой практике технология геномного редактирования CRISPR/Cas9 повсеместно используется для улучшения технологических характеристик важных для промыш-

ленности мицелиальных грибов рода *Aspergillus* [6], *Penicillium* [7], *Talaromyces* [8] и *Trichoderma* (*Hypocrea*) [9].

Мицелиальный гриб *P. verruculosum* является высокоэффективным продуцентом целлюлаз, которые представлены тремя ключевыми ферментами: целлюбогидролазами 1 и 2, эндоглюканазами и β -глюкозидазой. Промышленный штамм *P. verruculosum* В1-221-151 способен секретировать до 60 г/л внеклеточных ферментов, доля целлюлаз в которых составляет 75–80% [10, 11]. Однако отсутствие знаний о транскрипционно-активаторном механизме, реализующимся при биосинтезе основного целлюлазного комплекса, ограничивает возможности оптимизации субстратной базы в процессе ферментации гриба.

Ранее нами была адаптирована методика CRISPR/Cas9 нокаутов однокопийных генов в грибе *P. verruculosum* В1-221-151. Для этого была выбрана схема редактирования с синтезом нуклеазы Cas9 и sgRNA непосредственно в грибной

Список сокращений: КОС — ксилоолигосахариды, МКЦ — микрокристаллическая целлюлоза, ЦБГ — целлюбогидролаза, ЦОС — целлюолигосахариды, ЭГ — эндоглюканаза, БГ — β -глюкозидаза, БИ — без индуктора.

клетке. Для транскрипции гена *cas9* был выбран конститутивный промотор гомологичного гена *gpdA*, а для транскрипции *sg*РНК – промотор 5S рРНК. В результате экспериментов был получен штамм с нокаутами генов нитратредуктазы (*niaD*), как маркерного гена, и целлюлозгидролазы 1 (*cbh1*), что привело к изменению состава целлюлолитического комплекса и повышению экспрессии целлюлозгидролазы 2 [12].

Из литературных данных известно, что в транскрипции целлюлолитических генов участвуют несколько транскрипционных факторов: XlnR (Xyr-1), ClrA (CLR 1), ClrB (CLR 2), TacA [13–15], однако транскрипционный фактор XlnR играет наиболее важную роль в активации транскрипции, контролируя экспрессию генов, кодирующих ферменты, которые гидролизуют ксилан и ксиллоглюкан, а также целлюлозу [16, 17]. Было показано, что ген *xlnR* присутствует почти во всех мицелиальных грибах [13, 18]. Белок Xyr1/XlnR у *Neurospora crassa* и *A. nidulans* регулирует транскрипцию только генов гемичеселлюлаз, а у *T. reesei*, *A. niger* и *P. oxalicum* активирует транскрипцию, в том числе, и целлюлолитических генов [19].

Целью настоящей работы являлось определение функции транскрипционного фактора XlnR, являющегося одним из основных регуляторов транскрипции карбогидраз у мицелиальных грибов [13], что необходимо для понимания механизмов регуляции транскрипции генов основных целлюлаз в мицелиальном грибе *P. verrucosum*: целлюлозгидролазы 1 (*cbh1*, ЦБГ1), эндоглюканазы (*egl2*, ЭГ2) и β-глюкозидазы (*bgl1*, БГ). В практическом смысле полученные знания помогут улучшить систему биосинтеза карбогидраз в грибе *P. verrucosum*.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штаммы и среды

Штамм *Escherichia coli* XL1-Blue (F':*Tn10 proA*⁺*B*⁺*lacP*^Δ(*lacZ*)*M15/recA1 endA1 gyrA96* (Nal^R) *thi hsdR17* (*rK*⁻ *mK*⁺) *glnV44 relA1 lac*) был использован для молекулярного клонирования. Для наработки плазмидной ДНК штамм *E. coli* XL1-Blue был культивирован при 37°C и 250 об/мин на среде Лурия-Бертрани, содержащей (г/л): триптона – 10, дрожжевого экстракта – 5, NaCl – 5 (pH 7.2–7.5).

Также в работе был использован штамм *P. verrucosum* ВКМ F-3972D. Для получения споровой суспензии споры штамма высевали уколом на агаризованную (2% агара) минимальную среду MM [20] с 10 mM NaNO₃ в качестве источника азота, инкубировали 14 сут при 32°C, после чего споры смывали стерильным раствором 0.02%-ного Tween-80. Суспензию фильтровали через стеклянный фильтр (200 мкм), и производили подсчет концентрации спор в камере Горяева.

Для наращивания биомассы мицелия в жидкой среде споровой суспензией засеивали 750-миллилитровые колбы со 100 мл среды и инкубировали на орбитальной качалке (220 об/мин) при температуре 32°C.

Клонирование гена *xlnR* *P. verrucosum*

Проведен анализ аминокислотной последовательности белка XlnR гриба *N. crassa* OR74A (AN: XP_962611.1) программой “Blastp” с использованием последовательностей белков для грибов из родов *Talaromyces* и *Penicillium* из базы NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). Сравнение показало, что максимальная гомология XlnR *N. crassa* наблюдалась для транскрипционного фактора С6 штамма *T. marneffe* ATCC 18224 (AN: XP_002145389.1). Соответствующая кодирующая нуклеотидная последовательность (AN: NW_002196661.1) была соотнесена с 8 ближайшими гомологами с использованием для поиска коллекции “whole genome shotgun contigs”. На консервативные участки были выбраны вырожденные праймеры:

XLNRD1 gcaaacaccatttac(t/c)gg(c/a)ctcac;

XLNRR2 ggtt(a/t)cgcgcatgattca(a/g)atcgac.

С помощью этих праймеров и ДНК *P. verrucosum* в качестве матрицы, был амплифицирован фрагмент ДНК, соответствующий последовательности внутреннего фрагмента гена *xlnR* *P. verrucosum*.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием полимеразы Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fischer Scientific, США), согласно рекомендациям производителя.

Клонирование фланкирующих 5'-и 3'- областей гена было осуществлено с использованием метода “прогулки по неклонированной геномной ДНК” [21], для чего на секвенированную последовательность ПЦР-фрагмента были выбраны праймеры:

XLNRRCR1 tgcattgtgctgaggtgtgtttgatgtagga;

XLNRRCR2 gcggatgtgctggcaagtaaatcaaga;

XLNRCD1 ctaccggagcagtcgatgatgttgccacat;

XLNRCD2 aaagccatgaccgatggcaatgtcgaga.

Конструирование плазмид

ПЦР проводили с использованием ДНК-полимеразы Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc.) в соответствии с рекомендациями производителя. Все праймеры были разработаны с помощью программного обеспечения SnapGene v. 3.2.1.

Последовательность протоспейсера для нокаута гена *xlnR* (5'-gcatttctgctgatacgggtg-3') была подобрана в программе ChopChop (<https://chop->

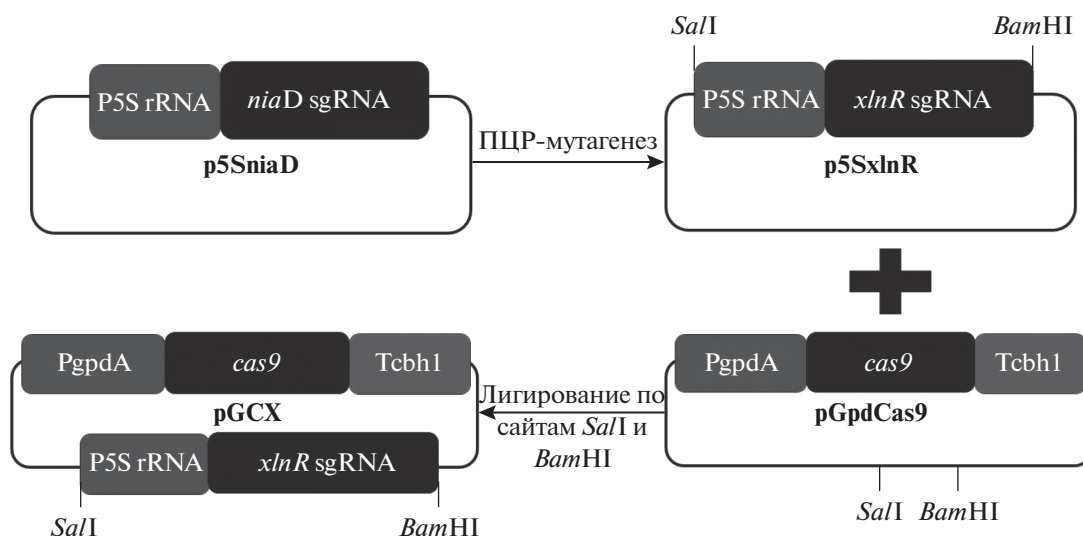


Рис. 1. Схема получения плазмиды pGCX использованной для трансформации *P. verruculosum*.
Fig. 1. Scheme for obtaining the pGCX plasmid used to transform *P. verruculosum*.

chop.cbu.uib.no/). Плазмида pGCX (рис. 1) была получена путем лигирования по рестриционным сайтам *Bam*HI и *Sal*I в плазмиду pGpdCas9 [12] фрагмента ДНК, кодирующего sgРНК для гена *xlnR* из предварительно полученной плазмиды p5SxlnR. Плазмида p5SxlnR была получена из плазмиды p5SniaD [12] в результате замены последовательности sgРНК с помощью ПЦР-мутагенеза с использованием праймеров:

SgRxlnRF gcattctgctgatacgggtggttttagactagaata-gsaag

SgRxlnRR caaccgtatcagcagaatgcctattctcctttcata-caacag.

Трансформация P. verruculosum B1-221-151 и отбор рекомбинантных штаммов P. verruculosum ΔniaDΔxlnR

Для нокаута генов *niaD* и *xlnR* проводили трансформацию штамма *P. verruculosum* B1-221-151 плазмидами p5SniaD и pGCX, как описано ранее [12, 22].

Трансформанты с генотипом *P. verruculosum niaD* отбирали на минимальной среде MM с добавлением 10 мМ NH₄Cl в качестве источника азота и 0.7 М NaClO₃ в качестве селективного агента. Колонии, выросшие на данной среде, пересевали на минимальную среду MM с NH₄Cl или NaNO₃ в качестве источника азота. Клоны, способные расти на NaNO₃, исключали из дальнейшего анализа.

Из отобранных на селективной среде клонов выделяли геномную ДНК набором DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, США). Выделенную ДНК использовали для амплификации фрагментов гена *xlnR* с помощью праймеров:

XlnRF1 ctttctgtcgcacgaccgac

XlnSR1 ccttcgacgactcttcaaat
 Полученные фрагменты ДНК использовали для секвенирования и поиска мутаций.

Определение влияния индукторов на транскрипцию генов cbh1, bgl1 и egl2 методом количественной ПЦР

Выращивание биомассы штаммов *P. verruculosum* ΔniaΔxlnR и *P. verruculosum* B1-221-151 для выделения РНК в условиях индукции проводили как было описано ранее [23], за исключением использования для штамма с генотипом ΔniaΔxlnR в качестве источника азота хлорида аммония в концентрации 10 мМ.

В качестве индукторов использовались: 2 мМ ксилозы, 1 мМ ксилобиозы, 2 мМ целлобиозы, 2 мМ целлотриозы, 2 мМ гентиобиозы, 2 мМ целлолигосахаридов (ЦОС) со степенью полимеризации 2–3 и 2 мМ ксилолигосахаридов (КОС) со степенью полимеризации 3–5. ЦОС и КОС были получены путем ограниченного ферментативного гидролиза МКЦ и ксилана березы как описано ранее [23]. Пробы мицелия отбирались через 1, 2 и 4 ч. Выделение РНК проводили как описано в работе [23].

Количественную ПЦР проводили как описано ранее [23] со следующими модификациями. На последовательности референсных генов актина (*actA*), бета-тубулина (*tub2*), глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы *gpdA* и целевого гена *cbh1*, были синтезированы 5'-флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды с соответствующими гасителями флуоресценции (табл. 1).

Проба для ПЦР в реальном времени содержала по 10 пмоль прямого и обратного праймеров на ге-

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР в реальном времени
Table 1. Primers for real-time PCR

Название	Нуклеотидная последовательность (5'–3')	Референсный/Целевой Ген
PVACTQD1	acaagaaatccagaccgcttccc	<i>actA</i>
PVACTQR1	tttcgagaccgatgacggaagg	<i>actA</i>
PVCBHQD2	caacatggcgctgctctcaaa	<i>cbh1</i>
PVCBHR2	gaagttgtaggcgaggaaccacga	<i>cbh1</i>
PVGPDQD2	aacggcaagcgcgtaagtct	<i>gpdA</i>
PVGPDQR2	acccttcaagtgagcagaggcctt	<i>gpdA</i>
PVTUBQD1	gcttcggcaacaatatgtccc	<i>tub2</i>
PVTUBQR1	ccggactgaccgaaaacaagtgtg	<i>tub2</i>
PVACTFM	FAM-cccgacggacaggtcatcaccattg-BHQ1	TaqMan <i>actA</i>
PVBENRG	R6G-ctcgtcgactggagcccggtagca-BHQ1	TaqMan <i>tub2</i>
PVGPDRX	ROX-ccccaacatcaagtggtagcagac-BHQ2	TaqMan <i>gpdA</i>
PVCBHC5	Cy5-cgacagcacttaccacacaacgcaa-BHQ2	TaqMan <i>cbh1</i>
PVEG2QD1	cgcttgactggacaacttacaac	<i>egl2</i>
PVEG2QR1	gcttaccgattggtctgatgtgc	<i>egl2</i>
PVBGLQD2	tagcgttaccactggcccaactactg	<i>bgl1</i>
PVBGLQR2	tgagcaacctccgaacctgtaacg	<i>bgl1</i>

ны *cbh1*, *actA*, *tub2* и *gpdA P. verruculosum*, по 10 пмоль флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов, 8 мкл 2.5× реакционной смеси для ПЦР в реальном времени (“Синтол”, Россия), 10 мкл кДНК исследуемого образца и дистиллированной воды до 20 мкл.

Анализ транскрипции генов *bgl1* и *egl2* проводили по изменению флуоресценции в присутствии красителя EVA Green (“Синтол”, Россия), для чего были подобраны соответствующие пары ПЦР-праймеров (табл. 1), показавшие схожую с референсными генами эффективность амплификации при использовании ДНК *P. verruculosum* в качестве матрицы.

Все пробы наносили в трех повторностях. Для сравнения Cq (количество циклов, необходимое для того, чтобы флуоресценция достигла порогового уровня над шумом) в различных плашках, 43 нг ДНК *P. verruculosum* в трех повторностях наносили в каждую плашку для пересекающихся генов в качестве матрицы.

Программа ПЦР в реальном времени: 1 стадия – 5 мин при 95°C, 2 стадия – (15 сек при 95°C, 45 сек при 60°C) 39 циклов, с измерением флуоресценции после каждого цикла.

Амплификацию проводили в приборе CFX96 (Bio-Rad, США) в совместимых 96-луночных белых низкопрофильных планшетах. Результаты анализировали с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager v.3.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клонирование гена транскрипционного фактора *XlnR P. verruculosum*

Используя вырожденные праймеры на консервативные участки генов-гомологов *xlnR* был амплифицирован и секвенирован фрагмент ДНК длиной 1074 п.н. Согласно биоинформатическому анализу, полученный фрагмент ДНК гомологичен гену *xlnR N. crassa*. Для установления полной последовательности гена использовали метод “прогулки по неклонированной геномной ДНК” [21]. В результате была получена нуклеотидная последовательность длиной 4225 п.н., которая содержала полный ген *xlnR P. verruculosum*, кодирующая область которого была разделена двумя интронами (рис. 2).

При сравнении последовательностей, имеющихся в базе данных NCBI, с транслированной последовательностью обнаружено, что степень ее гомологии с транскрипционными факторами (*XlnR*) *Talaromyces marneffe* (KFX43185) и *Talaromyces pinophilus* (KAF3401166.1) составляет 91 и 93% соответственно.

В полученной последовательности были идентифицированы: ДНК-связывающий домен класса Zn(II)2Cys6, кодирующий цинковый палец, характерный для транскрипционных факторов эукариот [24], сигнал внутриядерной локализации (NLS, Nuclear Localization Signal) и Fungal_TF_MHR (Transcription Factor Middle Homol-

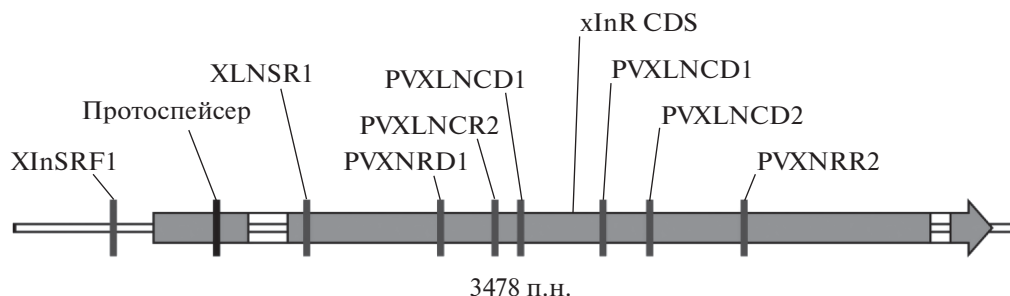


Рис. 2. Карта гена *xlnR* *P. verruculosum*. Показаны экзон-интронная структура, расположение праймеров для ПЦР и секвенирования, а также место посадки sgRNA (протоспейсер).
Fig. 2. *P. verruculosum xlnR* gene map. The exon-intron structure, the location of primers for PCR and sequencing, and the sgRNA site (protospacer) are shown.

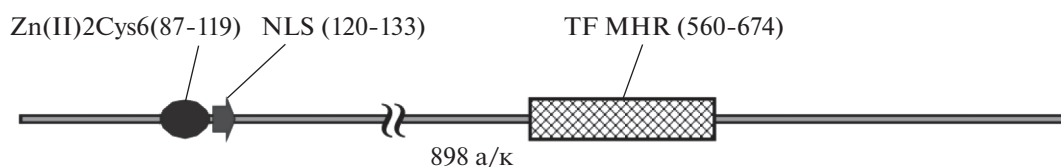


Рис. 3. Карта транскрипционного фактора XlnR *P. verruculosum*. Указаны расположение ДНК-связывающего домена (Zn(II)2Cys6), NLS и TF_MHR домена.
Fig. 3. *P. verruculosum* XlnR transcription factor map. The location of the DNA-binding domain (Zn(II)2Cys6), NLS and TF_MHR domains are indicated.

ogy Region) домен, также характерных для грибных транскрипционных факторов (рис 3).

Нокаут гена транскрипционного фактора XlnR системой CRISPR/Cas9

Ранее, в работе [12] нами была отработана методика использования системы CRISPR/Cas9 для получения двойных нокаутов в мицелиальном грибе *P. verruculosum*. Для этого прототрофный штамм гриба был трансформирован двумя плазмидами: плазмидой p5SniaD, содержащей последовательность, кодирующую sgРНК для нокаута маркерного гена нитратредуктазы (*niaD*) и плазмидой pGCX, содержащей ген *cas9* и последовательность, кодирующую sgРНК для нокаута целевого гена *cbh1*. Нокаут маркерного гена *niaD* позволяет отбирать трансформанты на среде, содержащей хлорат натрия [25]. Доставка второй sgРНК для целевого гена в одной плазмиде с геном *cas9* увеличивает вероятность двойного нокаута целевого и маркерного генов. В случае гена *cbh1* доля трансформантов с двойным нокаутом составляла 50% [12].

Для нокаута гена *xlnR* был использован аналогичный подход. Плазмида pGCX вместе с плазмидой p5SniaD была трансформирована в прототрофный штамм *P. verruculosum* 221-151. В результате трансформации, на селективной среде с хлоратом натрия и хлоридом аммония было получено 10 трансформантов, из которых 7 были не

способны утилизировать в качестве источника нитратный азот. В результате секвенирования 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 (рис. 4). У других клонов произошла замена одного нуклеотида.

Таким образом для последующих экспериментов был отобран клон №8 с генотипом $\Delta niaD\Delta xlnR$.

Анализ транскрипции генов целлюлаз cbh1, egl2 и bgl1 в штаммах P. verruculosum B1-221-151 и P. verruculosum ΔniadΔxlnR под влиянием различных индукторов

Мицелиальный гриб *P. verruculosum* является микроорганизмом, продуцирующим комплекс целлюлолитических и гемичеллюлолитических ферментов [26]. В большинстве грибов-целлюлолитиков (*Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp.) целлюлоза и ее производные (ди- и трисахариды) индуцируют транскрипцию целлюлазных и ксиланазных генов посредством XlnR-зависимого и/или XlnR-независимого сигнальных путей. Набор генов, регулируемых транскрипционными факторами в мицелиальных грибах, может значительно изменяться от вида к виду. Например, транскрипционный фактор XlnR в *A. niger* [27], *A. aculeatus* [28] и *P. oxalicum* [29], а также его гомолог Xyr1 в *T. reesei* [30] и *Talaromyces.versatilitis* [31], активируют транскрипцию генов целлюлаз и ге-

	Протоспейсер	PAM
<i>xlnR</i> В1-221-6	gctgggtattcgcaagcattctgctgatacgg	ttgcggtacgccggcggattagtcgt
	A G I R K H S A D T V A V R R R I S R	
Клон 2	gctgggtattcgcaagcattctgGtgatacgg	ttgcggtacgccggcggattagtcgt
	A G I R K H S G D T V A V R R R I S R	
Клон 3	gctgggtattcgcaagcattctgctgatacgg	ttgcggtacgccggcggattagtcgt
Клон 4	gctgggtattcgcaagcattctgGtgatacgg	ttgcggtacgccggcggattagtcgt
Клон 6	gctgggtattcgcaagcattctgGtgatacgg	ttgcggtacgccggcggattagtcgt
Клон 7	gctgggtattcgcaagcattctgGtgatacgg	ttgcggtacgccggcggattagtcgt
Клон 8	gctgggtattcgcaagcattctgctgatacggGttgcggtacgccggcggattagtcgt	
	A G I R K H S A D T G C G T P A D *	
Клон 10	gctgggtattcgcaagcattctgGtgatacgg	ttgcggtacgccggcggattagtcgt

Рис. 4. Сравнение фрагментов гена *xlnR* и кодируемых ими фрагментов белка XlnR у отобранных трансформантов с исходным геном и белком.

Fig. 4. Comparison of *xlnR* gene fragments and XlnR protein fragments encoded by them in selected transformants with the original gene and protein.

мицеллюлаз, тогда как в *N. crassa* [13] и *A. nidulans* [32], Xlg-1 и XlnR регулируют транскрипцию только генов гемицеллюлаз. И для первой, и для второй группы мицелиальных грибов транскрипция генов осуществляется по XlnR-зависимому пути. Однако транскрипция генов только целлюлаз, как, например, в грибе *Fusarium graminearum*, происходит по XlnR-независимому пути под действием других транскрипционных факторов [33].

В мицелиальных грибах для активации транскрипции целлюлаз необходимо наличие в среде моно-, ди- и олигосахаридов, являющихся индукторами. Их действие также может значительно отличаться в зависимости от вида гриба. Например, у *A. niger* индуктором транскрипции генов целлюлаз и гемицеллюлаз является ксилоза [26], у *T. reesei* софороза и лактоза [27, 28]. Ранее, нами было показано, что транскрипцию гена *cbh1*, кодирующего “мажорную” целлобиогидролазу I (ЦБГ I) у гриба *P. verruculosum*, активируют в основном целлобиоза, а также ксилоза, гентиобиоза, смесь ди- и три- целлоолигосахаридов ЦОС 2-3 и смесь ксилоолигосахаридов КОС 3-5 [22].

В данном исследовании с помощью метода количественной-ПЦР был проведен анализ транскрипции генов *cbh1*, *egl2*, *bgl1*, кодирующих ЦБГ I, ЭГ 2 и БГ, соответственно, в присутствии ранее установленных индукторов транскрипции гена *cbh1* для исходного штамма *P. verruculosum* В1-221-151 и штамма с нокаутом транскрипционного фактора

P. verruculosum ΔniaDΔxlnR. Результаты экспериментов представлены на рис. 5.

Очевидно, что транскрипционный фактор XlnR участвует в активации транскрипции всех исследуемых генов, но в различной степени. Для генов *egl2* и *bgl1* ранее индукторы не определялись, поэтому панель индукторов для них использовалась по аналогии с геном *cbh1*. Однако данные, приведенные на рисунках 5d и 5f свидетельствуют, что ксилоза и ее производные практически не влияют на индукцию транскрипции генов *egl2* и *bgl1* ни в штамме В1-221-151, ни в штамме ΔxlnR. Общее падение уровня транскрипции всех трех генов в штамме В1-221-151 в динамике 1, 2, 4 ч, по-видимому, связано с увеличением концентрации глюкозы в клетках, образующейся под действием комплекса ЦБГ I, ЭГ 2 и БГ. Это приводит к запуску механизма репрессии под действием белка-репрессора CreA, который провоцирует репрессию регуляторного гена *xlnR*, тем самым снижая уровень транскрипции целлюлаз. Данный механизм баланса индукции-репрессии является общим для мицелиальных грибов, продуцентов целлюлаз/ксиланаз [34].

Снижение уровня транскрипции генов *cbh1* (рис. 5a и 5b) и *egl2* (рис. 5c) в штамме ΔxlnR было более значительно, чем в случае гена *bgl1* (рис. 5e) при добавлении всех использованных индукторов, что говорит о реализации XlnR-зависимого пути транскрипции целлюлазных генов в *P. verruculosum* по аналогии с другими низшими грибами-целлюлолитиками [27–31].

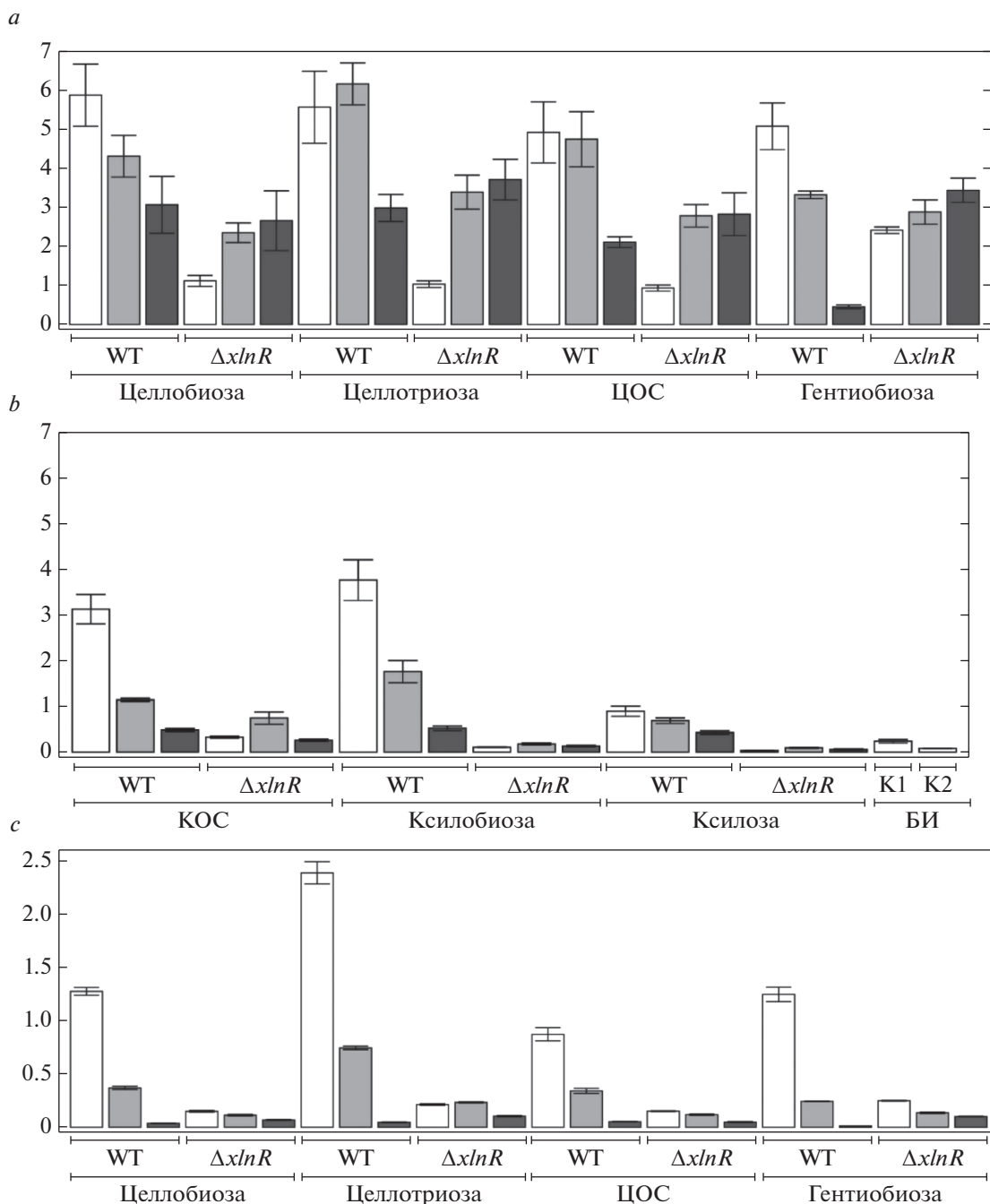


Рис. 5. Относительная транскрипция генов *cbh1* (a, b), *egl2* (c, d) и *bgl1* (e, f) в штаммах *P. verruculosum* B1-221-151 (WT, K1) и штамма *P. verruculosum* $\Delta xlnR$ с нокаутированным транскрипционным фактором ($\Delta xlnR$, K2) под влиянием различных индукторов: целлобиозы, целлотриозы, целлоолигосахаридов (ЦОС), гентиобиозы (a, c, e), ксилоолигосахаридов (КОС), ксилобиозы, ксилозы (b, d, f) через 1 ч (белый), 2 ч (серый) и 4 ч (черный цвет) после добавления индуктора, а также без добавления индуктора (БИ) через 1 час (K1, K2) (b, d, f).

Fig. 5. Relative transcription of *cbh1* (a, b), *egl2* (c, d), and *bgl1* (e, f) genes in *P. verruculosum* B1-221-151 (WT, K1) strains and *P. verruculosum* $\Delta xlnR$ strain with knockout transcription factor ($\Delta xlnR$, K2) under the influence of various inducers: cellobiose, cellotriose, celooligosaccharides (COS), gentiobiose (a, c, e), xylooligosaccharides (XOS), xylobiose, xylose (b, d, f) after 1 h (white), 2 h (gray) and 4 hours (black color) after adding the inductor, and also without adding the inductor (NI) after 1 hour (K1, K2) (b, d, f).

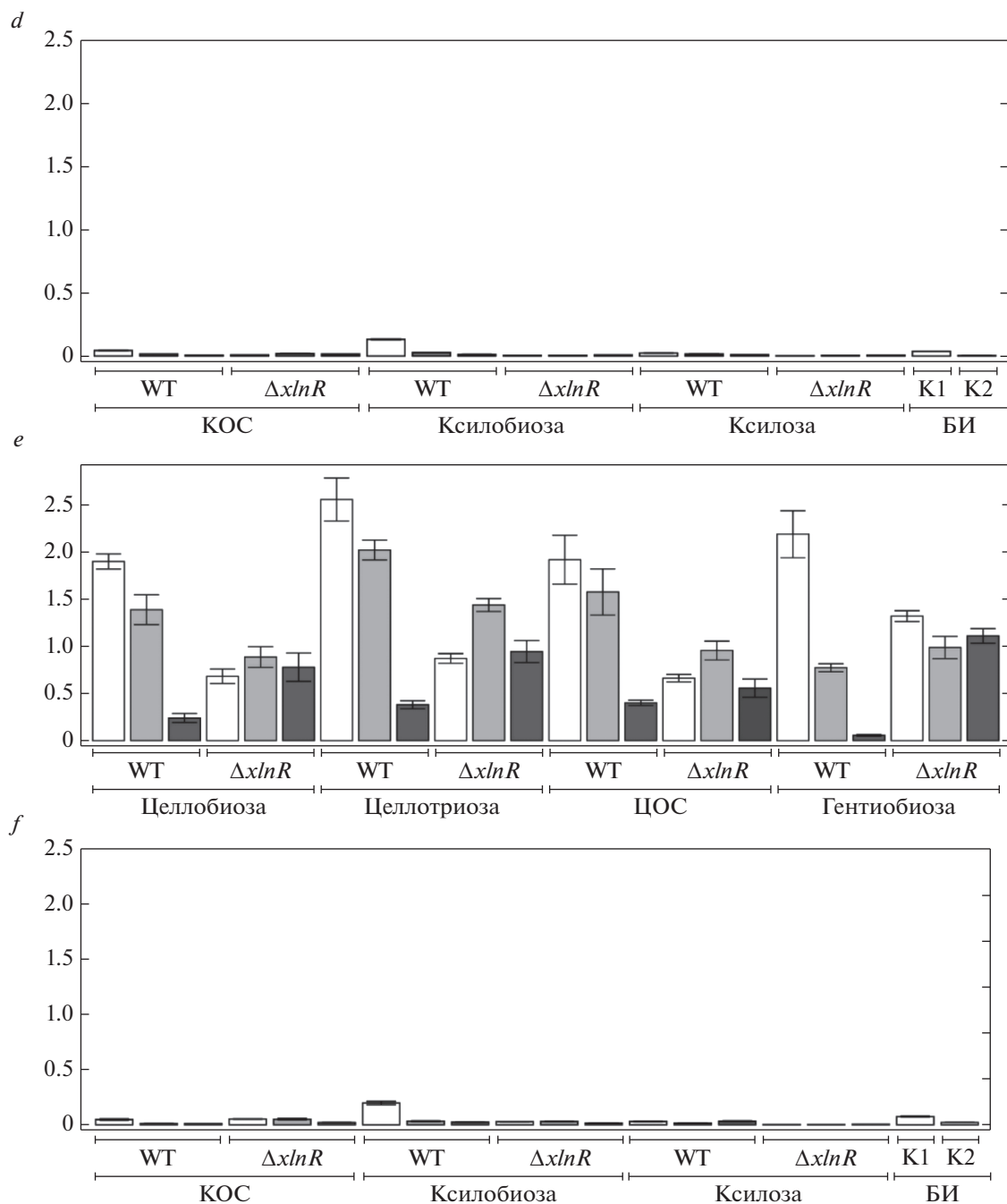


Рис. 5. Окончание

Незначительное увеличение уровня транскрипции гена *cbh1* в штамме В1-221-151 на 2 ч индукции целлотриозой, скорее всего, связано с добавочной индукцией целлобиозой, полученной от ферментативного гидролиза трисахарида в дисахарид под действием собственной БГ в первый час индукции (рис. 5a). Также интересно отметить, что для гена *cbh1* в штамме $\Delta xlnR$ практически полностью пропал эффект индукции ксилозой и кси-

лобиозой (рис. 5b), а пик индукция целлобиозой, целлотриозой, ЦОС 3-5 и гентиобиозой сместился с 1-ого часа на 4 после их добавления (рис. 5a), то есть процесс индукции изменился. Данный эффект объясняется сменой XlnR-зависимого пути индукции транскрипции генов целлюлаз на XlnR-независимый путь, т.е. в транскрипцию *cbh1* гена могут включаться другие транскрипционные факторы, оказывая “замещающий” эффект, например,

TacA, ортолог которого является транскрипционным фактором целлюлаз в близкородственном штамме *T. celluloliticus* [15]. Подобный эффект наблюдался в штамме *A. aculeatus* при индукции штамма $\Delta xlnR$ целлобиозой [33].

Интересный эффект наблюдался для транскрипции гена *egl2*. Динамика транскрипции в штаммах $\Delta xlnR$ с индукцией целлобиозой, целлотриозой, ЦОС и гентиобиозой в целом повторяла динамику уменьшения транскрипции *egl2* в В1-221-151, однако ее уровень в штамме $\Delta xlnR$ был значительно ниже (рис. 5с). Другими словами, в отличие от гена *cbh1* (рис. 5а) “включение” альтернативного пути транскрипции происходило уже через 1 ч после добавления индукторов. Данный эффект требует дальнейшего изучения.

В случае гена *bgl1* (рис. 5е) в штамме $\Delta xlnR$ не наблюдали канонической картины увеличения/уменьшения транскрипции в динамике 1, 2, 4 ч как это происходило с генами *cbh1* и *egl2*. Известно, что БГЛ является третьим ключевым ферментом целлюлазного комплекса, продуцируемого *P. verruculosum* и осуществляет финальную стадию гидролиза целоолигосахаридов до глюкозы [35]. Возможно, индукция гена *bgl1* поддерживается исключительно дисахаридами (целлобиозой и гентиобиозой), находящимися в равновесной концентрации, и транскрипция данного гена стационарна по крайней мере в пределах первых 4 часов наблюдения, что связано с недостаточностью экспрессии генов *cbh1* и *egl2* за этот период в штамме с нокаутом гена *xlnR*.

В результате проведенных исследований было установлено, что транскрипционный фактор XlnR участвует в активации транскрипции основных целлюлаз у *P. verruculosum* также как у *T. reesei* и *P. oxalicum* [19]. В тоже время, в активации транскрипции генов *cbh1*, *egl2* и *bgl1* целлобиозой, целлотриозой, софорозой и гентиобиозой также участвуют и другие транскрипционные факторы, определяя комплексный эффект нескольких факторов транскрипции в биосинтезе целлюлолитического комплекса ферментов, продуцируемых грибом *P. verruculosum* В1-221-151. Полученные данные позволяют продвинуться в понимании транскрипционно-активаторного механизма гриба *P. verruculosum*, что позволит в дальнейшем провести генетическую модификацию штамма и получить новые рекомбинантные штаммы с измененными паттернами экспрессии целлюлаз и/или гемицеллюлаз. Потенциальная стратегия модификации производственных штаммов, состоящая в получении новых экспрессионных систем на основе конститутивной или индуцибельной экспрессии регуляторных белков позволит получать востребованные промышленные ферменты в экспрессионных системах, не зависящих от индукторных веществ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (Грант №22-24-00997).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rozhkova A.M., Kislitsin V.Y. CRISPR/Cas Genome Editing in Filamentous Fungi. *Biochemistry (Moscow)*. 2021, 86(1), S120–S139. <https://doi.org/10.1134/S0006297921140091>
2. Blackburn P.R., Campbell J.M., Clark K.J., Ekker S.C. The CRISPR system-keeping zebrafish gene targeting fresh. *Zebrafish*. 2013, 10(1), 116–118. <https://doi.org/10.1089/zeb.2013.9999>
3. Ebina H., Misawa N., Kanemura Y., Koyanagi Y. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci. Rep.* 2013, 3, 2510. <https://doi.org/10.1038/srep02510>
4. Tyagi S., Kumar R., Das A., Won S.Y., Shukla P. CRISPR-Cas9 system: A genome-editing tool with endless possibilities. *J. Biotechnol.*, 2020, 319, 36–53. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.05.008>
5. Nodvig C.S., Nielsen J.B., Kogle M.E., Mortensen U.H. A CRISPR-Cas9 System for Genetic Engineering of Filamentous Fungi. *PLoS One*, 2015, 10(7), e0133085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133085>
6. Kuivanen J., Wang Y.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, 15(1), 210. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0613-5>
7. Pohl C., Kiel J.A., Driessen A.J., Bovenbeg R.A.L., Nygard Y. CRISPR/Cas9 Based Genome Editing of *Penicillium chrysogenum*. *ACS Synth. Biol.*, 2016, 5(7), 754–764. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00082>
8. 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, 12(1), e0169712. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169712>
9. Rantasalo A., Vitikainen M., Paasikallio T., Jantti J., Landowski C.P., Mojzica D. Novel genetic tools that enable highly pure protein production in *Trichoderma reesei*. *Sci Rep*. 2019, 9(1), 5032. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41573-8>
10. Berlin A., Gilkes N., Kilburn D., Maximenko V., Bura R., Markov A., Skomarovsky A., Gusakov A., Sinityn A., Okunev O., Solovieva I., Saddler J. Evaluation of cellulase preparations for hydrolysis of hardwood substrates. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2006, 129–132, 528–545. <https://doi.org/10.1385/abab:130:1:528>
11. 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, 56(6), 551–560. <https://doi.org/10.31857/S0555109920060161>
12. Kislitsin V.Y., Chulkin A.M., Zorov I.N., Denisenko Yu.A., Sinityn A.P., Rozhkova A.M. The effect of cellobiohy-

- drolase 1 gene knockout for composition and hydrolytic activity of the enzyme complex secreted by filamentous fungus *Penicillium verruculosum*. *Biores. Technol. Rep.*, 2022, 18.
<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101023>
13. *Klaubauf S., Narang H.M., Post H., Zhou M., Brunner K., Mach-Aiger A.R., Mach R.L., Heck A.J.R., Altelaar A.F., 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, 72, 73–81.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.07.007>
 14. *Huberman L.B., Liu J., Qin L., Glass L.* Regulation of the lignocellulolytic response in filamentous fungi. *Fungal Biol. Rev.*, 2016, 30(3), 101–111.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.06.001>
 15. *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, 175(6), 3218 *Fungal Biology Reviews* 29.
<https://doi.org/10.1007/s12010-015-1497-2>
 16. *van Peij N.N., Gielkens M.M., de Vries R.P., Visse J., de Graaff L.H.* The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64(10), 3615–3619.
<https://doi.org/10.1128/AEM.64.10.3615-3619.1998>
 17. *Gielkens M.M., Dekkers E., Visser J., de Graaff L.H.* Two cellobiohydrolase-encoding genes from *Aspergillus niger* require D-xylose and the xylanolytic transcriptional activator XlnR for their expression. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65(10), 4340–4345.
<https://doi.org/10.1128/AEM.65.10.4340-4345.1999>
 18. *Battaglia E., Visser L., Nijssen A., van Veluw G.J., Wosten H.A., de Vries R.P.* Analysis of regulation of pentose utilisation in *Aspergillus niger* reveals evolutionary adaptations in Eurotiales. *Stud. Mycol.*, 2011, 69(1), 31–38.
<https://doi.org/10.3114/sim.2011.69.03>
 19. *de Vries R.P., van den Broeck H.C., Dekkers E., Manzanares P., de Graaff L.H., Visser J.* Differential expression of three alpha-galactosidase genes and a single beta-galactosidase gene from *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65(6), 2453–2460.
<https://doi.org/10.1128/AEM.65.6.2453-2460.1999>
 20. *Kaminskyj S.G.* Fundamentals of growth, storage, genetics and microscopy of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Newsl.*, 2001, 25–31.
 21. *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, 23(6), 1087–1088.
<https://doi.org/10.1093/nar/23.6.1087>
 22. *Aleksenko A.Y., Makarova N.A., Nikolaev I.V., Clutterbuck A.J.* Integrative and replicative transformation of *Penicillium canescens* with a heterologous nitrate-reductase gene. *Curr. Genet.*, 1995, 28(5), 474–477.
<https://doi.org/10.1007/BF00310818>
 23. *Кислицин В.Ю., Чулкин А.М., Зоров И.Н., Шашков И.А., Сатрутдинов А.Д., Синуцын А.П., Рожкова А.М.* Влияние моно- и олигосахаридов на транскрипцию гена *cbh1* в мицелиальном грибе *Penicillium verruculosum*. *Биотехнология*. 2021, 37(1), 45–53.
<https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-1-45-53>
 24. *Pabo C.O., Peisach E., Grant R.A.* Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 2001, 70, 313–340.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.313>
 25. *Cove D.J.* Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: the selection and characterisation of chlorate resistant mutants. *Heredity (Edinb)*. 1976, 36(2), 191–203.
<https://doi.org/10.1038/hdy.1976.24>
 26. *Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R.M., Pravitnikov A.G., Osipov D.O., Sinitsyn A.P.* Cellulases of *Penicillium verruculosum*. *Biotechnol. J.*, 2010, 5(8), 871–880.
<https://doi.org/10.1002/biot.201000050>
 27. *Gruben B.S., Makela M.R., Kowalczyk J.E., Zhou M., Benoit-Gelber I., de Vries R.P.* Expression-based clustering of CAZyme-encoding genes of *Aspergillus niger*. *BMC Genomics*, 2017, 18(1), 900.
<https://doi.org/10.1186/s12864-017-4164-x>
 28. *Tani S., Kanamasa S., Sumitani J., Arai M., Kawaguchi T.* XlnR-independent signaling pathway regulates both cellulase and xylanase genes in response to cellobiose in *Aspergillus aculeatus*. *Curr. Genet.*, 2012, 58(2), 93–104.
<https://doi.org/10.1007/s00294-012-0367-5>
 29. *Xia C., Gao L., Li Z., Liu G., Song X.* Functional analysis of the transcriptional activator XlnR of *Penicillium oxalicum*. *J. Appl. Microbiol.*, 2022, 132(2), 1112–1120.
<https://doi.org/10.1111/jam.15276>
 30. *Ilmen M., Saloheimo A., Onnela M.L., Penttila M.E.* Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63(4), 1298–1306.
<https://doi.org/10.1128/AEM.63.4.1298-1306.1997>
 31. *Llanos A., Dejean S., Neugnot-Roux V., Francois J.M., Parrou J.-L.* Carbon sources and XlnR-dependent transcriptional landscape of CAZymes in the industrial fungus *Talaromyces versatilis*: when exception seems to be the rule. *Microb. Cell Fact.*, 2019, 18(1), 14.
<https://doi.org/10.1186/s12934-019-1062-8>
 32. *Coutinho P.M., Andersen M.R., Kolenova K., van Kuyk P.A., Benoit I., Gruben B.S., Trejo-Aguilar B., Visser H., Solingen P., Pakula T., Seiboth B., Battaglia E., Aguilar-Osorio G., Jong J.F., Ohm R.A., Aguilar M., Henrissat B., Nielsen J., Stalbrand H., de Vries R.P.* Post-genomic insights into the plant polysaccharide degradation potential of *Aspergillus nidulans* and comparison to *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.*, 2009, 46 Suppl 1, S161–S169.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.07.020>
 33. *Brunner K., Lichtenauer A.M., Kratochwill K., Delic M., Mach R.L.* Xyr1 regulates xylanase but not cellulase formation in the head blight fungus *Fusarium graminearum*. *Curr. Genet.*, 2007, 52(5–6), 213–220.
<https://doi.org/10.1007/s00294-007-0154-x>
 34. *Tamayo E.N., Villanueva A., Hasper A.A., de Graaff L.H., Ramon D., Orejas M.* CreA mediates repression of the regulatory gene xlnR which controls the production of xylanolytic enzymes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.*, 2008, 45(6), 984–993.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.03.002>
 35. *Volkov P.V., Rozhkova A.M., Zorov I.N., Sinitsyn A.P.* Cloning, purification and study of recombinant GH3 family beta-glucosidase from *Penicillium verruculosum*. *Biochimie*, 2020, 168, 231–240.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.11.009>

Function of Transcription Factor XlnR in Filamentous Fungus *Penicillium verruculosum*V. Yu. Kislitsin^a, A. M. Chulkin^a, I. N. Zorov^{a, b}, I. G. Slnel'nikov^a, A. P. Sinitsyn^{a, b}, and A. M. Rozhkova^{a, #}^a*Fundamentals of Biotechnology Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*^b*Faculty of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*[#]*e-mail: amrojko@yahoо.com*

Abstract—The *Penicillium verruculosum* filamentous fungus is a highly active producer of cellulolytic complex enzymes, cellobiohydrolases, endoglucanases and β -glucosidases. Using the CRISPR/Cas9 genomic editing system, previously adapted to *P. verruculosum*, a strain with a knockout of the *xlnR* gene encoding XlnR, one of the main transcription factors of filamentous fungi, has been obtained. The transcription level of cellulolytic genes was determined by quantitative PCR for the *P. verruculosum* B1-221-151 strain and the new *P. verruculosum* Δ xlnR strain. The XlnR protein was shown to activate transcription of the *cbh1*, *egl2*, and *bgl1* genes encoding cellobiohydrolase 1, endoglucanase 2, and β -glucosidase, respectively, in the presence of xylose and xylooligosaccharides in the growth medium. It was found that other factors are also involved in the activation of transcription of these genes by cellobiose, cellotriose, sophorose, and gentiobiose, which has a complex effect on the biosynthesis of the cellulolytic complex of enzymes produced by the *P. verruculosum* fungus.

Keywords: *Penicillium verruculosum*, XlnR, cellobiohydrolase 1, endoglucanase 2, β -glucosidase, transcription, CRISPR/Cas9