

На правах рукописи

СЕРЕБРЯНЫЙ ВСЕВОЛОД АЛЕКСАНДРОВИЧ

**КСИЛАНАЗА *PENICILLIUM CANESCENS*: ВЫДЕЛЕНИЕ
ГЕНА, ИЗУЧЕНИЕ ЕГО РЕГУЛЯЦИИ И СОЗДАНИЕ
ШТАММА - ПРОДУЦЕНТА**

Специальность: 03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Москва 2006

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии эукариотических микроорганизмов ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор Ю. П. Винецкий
кандидат биологических наук С. В. Беневоленский

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор А.С. Миронов
кандидат биологических наук Е.С. Захарова

Ведущая организация:

Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН

Защита диссертации состоится 21 декабря 2006 года в 14 часов на заседании диссертационного совета ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» по адресу: Москва, 117545, 1-й Дорожный проезд, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»

Автореферат диссертации разослан 20 ноября 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Г.Г. Заиграева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Ксилан – второй по распространенности природный полимер после целлюлозы, он встречается практически во всех растительных тканях. В зависимости от происхождения, структура и химический состав ксилана значительно меняются, но, в любом случае, главная цепь образована β -1,4-связанными остатками D-ксилозы. В качестве ответвлений встречаются различные заместители, чаще всего арабиноза.

Во многих технологических процессах, прежде всего при производстве бумаги и целлюлозы, ксилан является нежелательной примесью, и встает проблема его деградации. Также необходимо гидролизовать ксилан в некоторых процессах пищевой и кормовой промышленности, и при комплексной переработке растительных отходов. Гидролиз ксилана возможно осуществлять с помощью химических реагентов или ферментативным путем. Ферментативный гидролиз является предпочтительным, так как меньше влияет на структуру других волокон, и при нем образуется меньше химических отходов. В пищевой или кормовой промышленности, химический гидролиз вообще неприемлем.

Для исчерпывающего ферментативного гидролиза ксилана, включающего расщепление боковых цепей, требуется достаточно широкий спектр ферментов, однако, в большинстве технологических процессов достаточно действия фермента, расщепляющего главную цепь ксилана – эндо- β -1,4-ксилаказы (далее просто ксиланаза).

В современной промышленности используются ксиланазы бактериального и грибного происхождения. Большинство грибных ксиланаз принадлежат к 10-му и 11-му семействам гликозил-гидролаз, различающихся по своим физическим свойствам, по субстратной специфичности и оптимуму pH. Многие грибы имеют гены, кодирующие несколько различных ксиланаз, принадлежащих как к одному, так и к разным семействам, и синтезируют несколько ксиланаз одновременно [de Vries R.P., Visser J., 2001.]. У некоторых видов обнаружен синтез только одного фермента.

Изучение синтеза ксиланолитических ферментов мицелиальными грибами объясняется не только растущей потребностью современной промышленности в этих ферментах, но и тем, что это удобная модель для изучения регуляции транскрипции эукариотических генов и секреции белков. Являясь одними из простейших эукариотических организмов, мицелиальные грибы представляют собой удобный объект для изучения.

В настоящее время основными продуцентами ксиланаз грибного происхождения являются грибы родов *Aspergillus* и *Trichoderma*. В то же время, постоянно ведется поиск новых продуцентов, вызванный потребностью в ферментах с улучшенными свойствами, и желанием расширить спектр существующих продуцентов.

Мицелиальный гриб *P. canescens* F178 (ВКПМ) первоначально был выделен как природный продуцент β -галактозидазы, и в настоящее время используется для производства этого фермента. Он характеризуется большой продукцией внеклеточного белка, большая часть которого представлена несколькими ферментами, что делает его перспективным биотехнологическим объектом.

Недавно был клонирован ген, кодирующий β -галактозидазу *P. canescens* F178, и введен в геном этого гриба в нескольких копиях, в результате чего продукция β -галактозидазы была увеличена в 12 раз [Николаев И.В. и др., 1999]. Кроме того, было показано, что культуральная жидкость, полученная при его росте в жидкой среде со свекловичным жомом в качестве источника углерода, кроме β -галактозидазной, обладает значительной ксиланазной активностью [Николаев И.В., Винецкий Ю.П., 1998.]. Мы решили изучить возможность создания продуцента ксиланазы на базе этого штамма.

Цель и задачи исследования. Целью представляемой работы являлся поиск путей увеличения продукции ксиланазы мицелиальным грибом *P. canescens* F178, и оценка возможности создания на основе этого организма промышленного штамма – продуцента. В рамках этой работы были поставлены следующие задачи:

- клонировать ген, кодирующий мажорную ксиланазу *P. canescens* F178;

- оценить возможность увеличения продукции ксиланазы с помощью увеличения числа копий этого гена;
- определить влияние увеличения числа копий этого гена на продукцию других внеклеточных ферментов;
- выяснить наличие у *P. canescens* F178 других генов, кодирующих ксиланазы, и оценить их влияние на суммарную продукцию ксиланазы;
- изучить регуляцию транскрипции гена (генов), кодирующих ксиланазу *P. canescens* F178;
- клонировать ген, кодирующий позитивный регулятор транскрипции гена мажорной ксиланазы *P. canescens* F178, и определить его роль в продукции других ферментов этим организмом.

Научная новизна и практическая ценность работы. В результате проделанной работы были получены следующие результаты:

- клонирован ген *xylA*, кодирующий мажорную ксиланазу *P. canescens* F178 и подтверждено, что этот фермент принадлежит к 10-му семейству гликозил-гидролаз;
- показано, что транскрипция *xylA* является лимитирующим фактором в продукции ксиланазы *P. canescens* F178, и что введение дополнительных копий *xylA* в исходный штамм пропорционально увеличивает продукцию ксиланазы (до 7 раз);
- показано, что транскрипция *xylA* индуцируется L-арабинозой и D-ксилозой, причем арабиноза является лучшим индуктором, чем ксилоза;
- показано наличие в геноме *P. canescens* гена, кодирующего ксиланазу 11-го семейства, и установлено, что его вклад в общую продукцию ксиланазы *P. canescens* незначителен;
- клонирован ген *xlnR*, кодирующий позитивный регулятор транскрипции гена мажорной ксиланазы *P. canescens* F178;
- показано, что *xlnR* играет ключевую роль в регуляции синтеза ряда других ксиланолитических ферментов; что введение дополнительных копий в *xlnR* в исходный штамм увеличивает продукцию этих ферментов и ксиланазы;

- показано, что синтез ряда ферментов, также индуцируемый арабинозой (прежде всего бета-галактозидазы и арабинофуранозидазы), не находится под прямым контролем продукта *xlnR*;
- создан штамм – продуцент ксиланазы, превосходящий по продуктивности исходный штамм *P. canescens* F178 более чем в семь раз.

Апробация работы. Материалы, представленные в работе, докладывались на семинарах лаборатории №18, ФГУП “ГосНИИ генетика”, на 6-ой Европейской Конференции по Генетике грибов (6-th European Conference of Fungal Genetics, 6-9 April 2002, Pisa, Italy).

Апробация диссертации прошла на заседании секции молекулярной генетики ученого совета ФГУП “ГосНИИ генетика” 22 мая 2006 года.

Публикации. По теме диссертации опубликовано четыре печатные работы, одно тезисное сообщение в материалах научной конференции, и получен один патент.

Структура работы. Диссертация изложена на 117 стр. машинописного текста, включая 28 рисунков и 9 таблиц. Работа состоит из введения, обзора литературы по теме диссертации, описания материалов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов работы, выводов, и списка цитированной литературы (186 наименований).

Список сокращений, использованных в автореферате: кДа – килодальтон; ПЦР – полимеразно-цепная реакция; ОТ-ПЦР – ПЦР, использующая в качестве матрицы продукт обратной транскрипции мРНК; п.н. – пара нуклеотидов; т.п.н – тысяча пар нуклеотидов; SDS – додецилсульфат натрия; ПААГ – полиакриламидный гель; КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клонирование гена, кодирующего мажорную эндо-1,4-бета-ксиланазу *Penicillium canescens*. При разделении белков культуральной жидкости *P. canescens* F178, полученной при росте на жидкой среде со свекловичным жомом в качестве источника углерода, обнаруживаются два мажорных белка с молекулярными массами около 120 и 30 кДа (Рис. 1).

Ранее было показано, что белок размером 120 кДа является β -галактозидазой [Николаев И.В., и др., 1989.], а 31 кДа – ксиланазой, по своим биохимическим параметрам относящейся к 10-му семейству гликозил-гидролаз [Синицына О.А. и др., 2003].

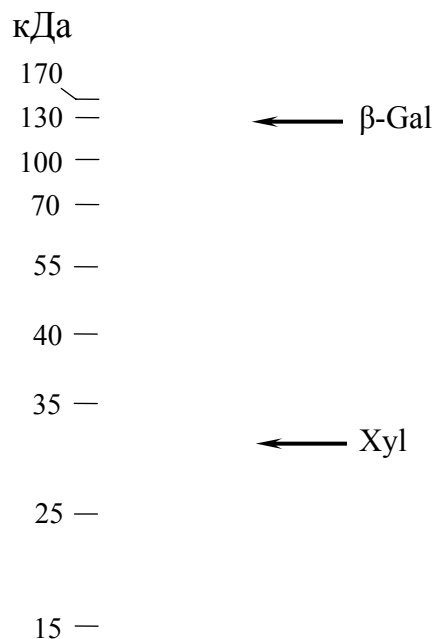


Рис. 1. Электрофоретическое разделение белков культуральной жидкости *P. canescens* F178, полученной при культивировании штамма в жидкой среде со свекловичным жомом в качестве источника углерода.

Мы сравнили нуклеотидные последовательности генов, представленных в GenBank, кодирующих ксиланазы с молекулярной массой около 30 кДа, определили их консервативные области, и на основе полученных данных синтезировали вырожденные олигонуклеотидные праймеры.

xyl1: 5' – CATGAAGTGGGATGC(T/C)ACTGAGCGT- 3'.

xyl2: 5' - CCACTTCTTGAC(G/A)TGG(C/T)TGACCA-3'.

С помощью этих праймеров, методом ПЦР, мы амплифицировали фрагмент геномной ДНК *P. canescens* F178, который использовали в качестве зонда, для скрининга библиотеки генов этого организма, полученной ранее. В результате скрининга, был выделен фрагмент геномной ДНК *P. canescens* размером 3,4 т.п.н., который затем был субклонирован в плазмидный вектор (Рис. 2). Определение нуклеотидной последовательности этого фрагмента подтвердило, что он содержит область, с высокой степенью нуклеотидной гомологии с ксиланазами 10-го семейства родов *Aspergillus* и *Penicillium*. Мы

обозначили эту область как *xyIA*, а полученная плазмида была названа pPCXYLA.

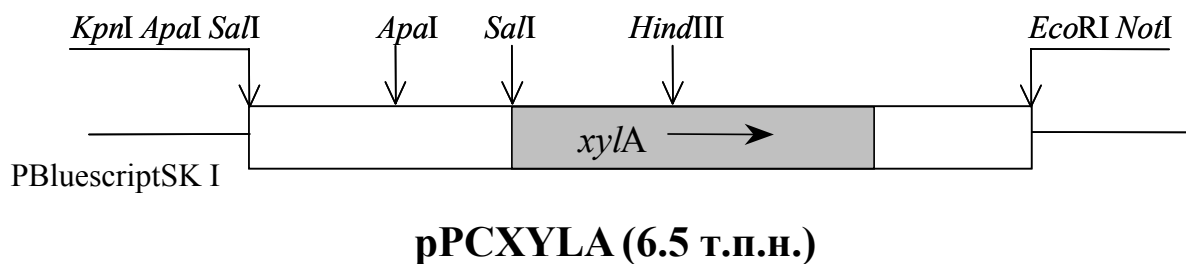


Рис. 2. Карта плазмиды pPCXYLA.

Для установления структуры клонированного нами гена, мы получили соответствующую кДНК, и определили ее нуклеотидную последовательность.

Для этого мы синтезировали олигонуклеотидные праймеры

*xyIA*57: 5'-СТCGAAAACCAAACACATTCAC-3'

*xyIA*31: 5'-ССААТCGТАGАССТСАТСТС-3',

фланкирующие предполагаемую структурную область *xyIA*. Сравнение нуклеотидных последовательностей геномной и кДНК показало, что структурная часть гена разделена восемью интронами, и состоит, таким образом, из девяти экзонов. Предполагаемый размер незрелого белка – 327 аминокислотных остатков, расчетная масса незрелого белка составляет 35,1 кДа.

Для подтверждения того, что клонированный нами ген, кодирует именно мажорную ксиланазу *P. canescens*, он, с помощью плазмидной котрансформации, был введен в штамм *P. canescens* PCA10, изогенный исходному штамму F178, но несущий мутацию по гену нитратредуктазы, использованную как маркер для проведения трансформации. В результате был отобран ряд трансформантов с повышенной, относительно F178, продукцией ксиланазы (Табл. 1). Как видно из приведенных данных у отдельных штаммов продуктивность возросла более чем в семь раз. С помощью гибридизации геномной ДНК было определено, что в геноме трансформанта с максимальной продукцией ксиланазы (XYL23) содержится 8 копий ксиланазного гена. Таким

образом, повышение продукции ксиланазы оказалось пропорциональным числу копий гена, введенного в геном гриба.

Таблица 1. Продукция ксиланазы мультикопийными штаммами при ферментации в жидкой среде со свекловичным жомом.

N	Штамм	Ксиланазная активность, ед./мл	Увеличение продукции, раз
1	PCA10 (контроль)	104	-
2	XYL1	718	6,90
3	XYL7	562	5,42
4	XYL16	703	6,76
5	XYL22	681	6,55
6	XYL23	770	7,40
7	XYL26	767	7,38

Электрофорез белков культуральной жидкости полученных трансформантов показал, что введение плазмиды не привело к появлению новых белков, но вызвало увеличение количества белка размером 31 кДа (рис. 3а). Увеличение транскрипции клонированного гена также было подтверждено гибридизационным анализом мРНК (рис. 3б).

Таким образом, увеличение в исходном штамме числа копий, клонированного нами гена, привело к пропорциональному увеличению количества соответствующей мРНК, и к пропорциональному увеличению продукции белка и ксиланазной активности, что свидетельствует о том, что клонированный нами ген, действительно, кодирует мажорную эндо- β -1,4-ксиланазу *P. canescens*. Более того, пропорциональность между увеличением числа копий, количества мРНК и количества белка свидетельствует о том, что транскрипция является лимитирующим фактором в продукции ксиланазы у *P. canescens*.

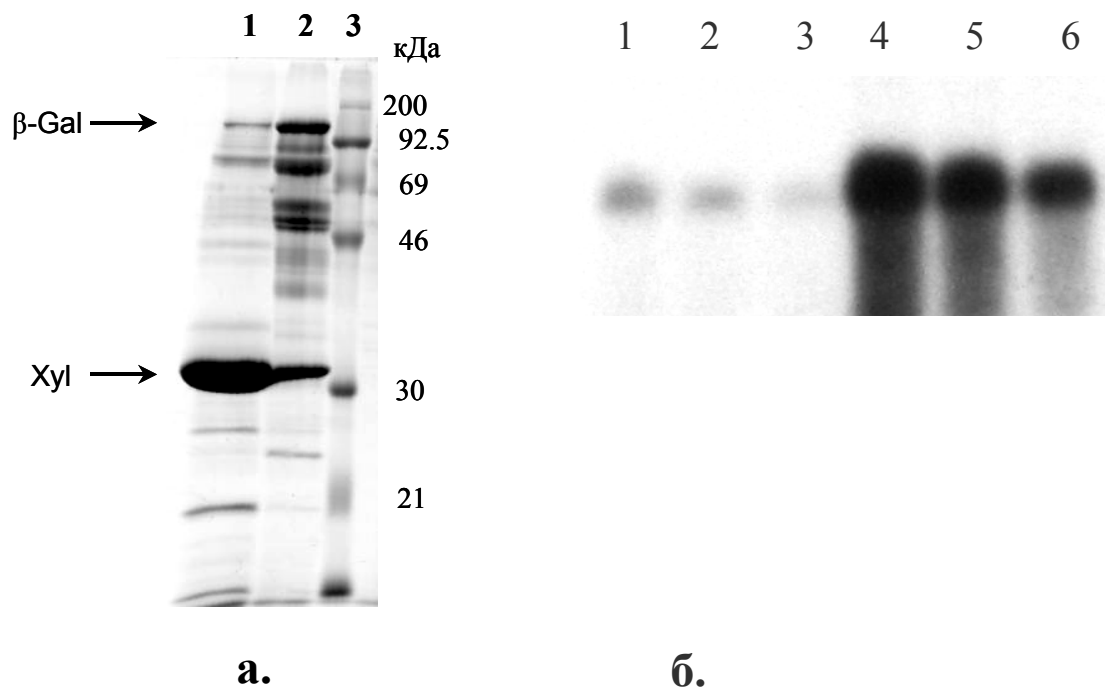


Рис. 3. Увеличение продукции ксиланазы мультикопийным штаммом. **а.** SDS-ПААГ–электрофорез белков культуральной жидкости *P. canescens* PCA10 (2) и мультикопийного штамма XYL23 (1), выращенных в жидкой среде со свекловичным жомом в качестве источника углерода. 3 – белковые маркеры. **б.** Блот-гибридизация РНК исходного (PCA10) и мультикопийного (XYL23) штаммов: 1; 2; 3 – 10; 5; 2,5 мкг РНК PCA10, соответственно. 4; 5; 6 – 10; 5; 2,5 мкг РНК XYL23, соответственно. В качестве зонда использовался фрагмент ДНК *xylA*.

Сравнение свойств ксиланазы, производимой однокопийным и мультикопийным штаммами. Известно, что внеклеточные гликолитические ферменты подвергаются посттрансляционной модификации, включающей в себя отщепление лидерных последовательностей и гликозилирование. Свойства зрелого белка зависят от того, правильно ли прошли эти процессы. В связи с этим встал вопрос, справляются ли системы, отвечающие за посттрансляционную модификацию ксиланазы с почти восьмикратным увеличением количества этого белка? Мы провели сравнение свойств ксиланазы, производимой исходным штаммом и мультикопийным продуцентом XYL26. Эта часть работы производилась совместно с кафедрой химической энзимологии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

С помощью многоступенчатой хроматографической очистки, из культуральной жидкости однокопийного штамма *P. canescens* F178 и

многокопийного *P. canescens* XYL26 (табл. 1), был выделен чистый фермент и определены его биохимические и кинетические параметры, субстратная специфичность, температурный и pH оптимумы, стабильность и др. Показано, что свойства нативного и рекомбинантного ферментов практически не различаются. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Сравнение свойств ксиланазы, производимой исходным штаммом (PCA10), и штаммом с увеличенным числом копий ксиланазного гена (XYL26).

Параметры		PCA10	XYL26
Молекулярная масса, кДа		31	31
pI		8,2-9,3	8,2-9,3
Оптимум pH		5,9	5,4
Оптимум T°C		55	60
Термостабильность, (период полуинактивации, мин) при pH 4/5/6	40°C	180/>180/>180	>180/>180/>180
	50°C	15/180/130	20/120/60
	60°C	1/5/2	1/4/2

Индукция синтеза ксиланазы мицелиальным грибом *P. canescens*.

Ранее было показано, что синтез ксиланазы индуцируется L-арабинозой, и, в меньшей степени, D-ксилозой [Николаев И. В., Винецкий Ю. П., 1998 г., Вавилова Е. А., Винецкий Ю. П., 2003 г.]. Эти данные были получены при переносе предварительно выращенного мицелия, в среды с различными источниками углерода. Однако сам факт переноса мицелия является мощным физиологическим стрессом, что может исказить картину индукции. Кроме того, в этих экспериментах не исследовалась транскрипция ксиланазного гена. Поэтому, для подтверждения данных об индукции синтеза ксиланазы L-арабинозой и D-ксилозой, и для изучения транскрипции *xylA*, мы провели ферментацию на этих сахарах и на не индуцирующем источнике углерода – фруктозе. Так как *P. canescens* F178 практически не способен утилизировать

арабинозу, то в среду с этим сахаром также была добавлена фруктоза. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3. Ксиланазная активность культуральной жидкости *P. canescens* F178 при росте на синтетической среде с различными источниками углерода.

Источник углерода	Активность ксиланазы, ед/мл
Арабиноза + фруктоза	5,0
Ксилоза	0,1
Фруктоза	не детектируется

Как видно из данных, приведенных в таблице, синтез ксиланазы происходит при росте на средах с арабинозой и ксилозой, причем арабиноза является лучшим индуктором, чем ксилоза. При росте на фруктозе, ксиланазная активность не обнаружена. Этот результат совпадает с результатами, полученными в опытах с переносом мицелия, однако, в опытах с переносом ксилоза вызывала значительно более сильный синтез ксиланазы.

Анализ транскрипции *ху1А* с помощью гибридизации РНК, выделенной из мицелия, выращенного в указанных условиях, показал транскрипцию этого гена при росте на среде с арабинозой. В то же время, соответствующая мРНК не была обнаружена при росте на среде с ксилозой, что может объясняться недостаточной чувствительностью метода (Рис. 4а). В связи с этим, мы провели анализ РНК с помощью ОТ-ПЦР. Результат электрофоретического разделения продуктов реакции представлен на Рис. 4б. Можно видеть, что синтез фрагмента, соответствующего мРНК *ху1А* (фрагмент размером около 0,9 т.п.н.), происходит как при проведении реакции с препаратами РНК, выделенными из мицелия, выращенного на среде со свекловичным жомом и на среде со смесью фруктозы с арабинозой (дорожки 3 и 4), так и на среде с ксилозой (дорожка 5). В препарате РНК, выделенном из мицелия, выращенного на среде с фруктозой,

транскрипт *xylA* практически не обнаруживается. При этом количество образующегося транскрипта убывает в ряду "жом – фруктоза + арабиноза – ксилоза", что соответствует результатам измерения активности фермента.

Таким образом, мы показали, что транскрипция *xylA* индуцируется как L-арабинозой, так и D-ксилозой, причем индукция D-ксилозой происходит значительно слабее.

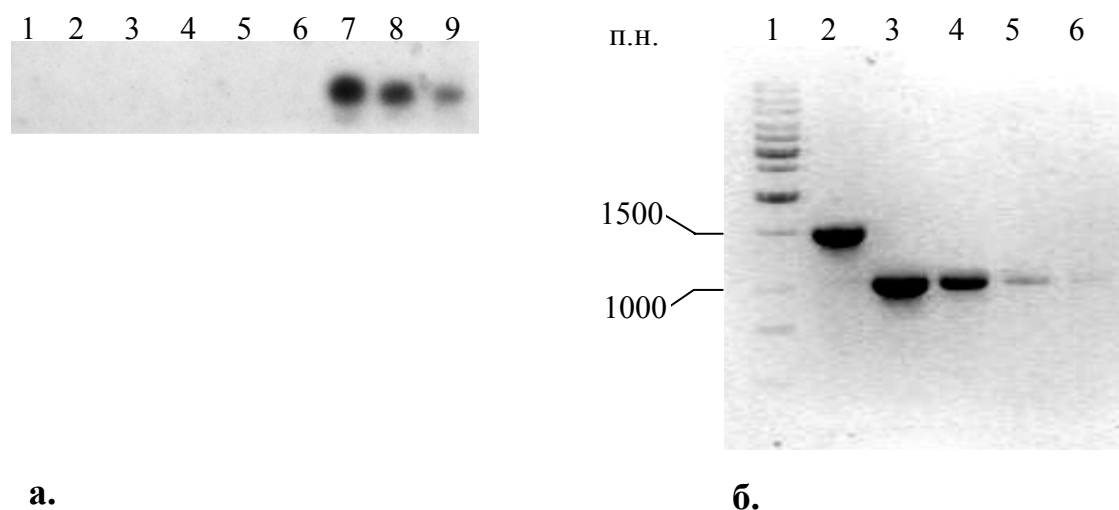


Рис. 4. Транскрипция *xylA* при росте на различных источниках углерода. **а.** Гибридизация РНК, выделенной из мицелия, выращенного на синтетической среде с: 1; 2; 3 – фруктозой, 4; 5; 6 – ксилозой, 7; 8; 9 – арабинозой и фруктозой. В случае каждой среды наносилось по 10; 5; 2,5 мкг РНК, соответственно. В качестве зонда использовался фрагмент ДНК *xylA*. **б.** Электрофоретическое разделение продуктов ОТ-ПЦР РНК из мицелия, выращенного на различных средах, с праймерами *xylA57* и *xylA31*. Дорожки: 1 – ДНК маркер, 2 – амплификат хромосомальной ДНК *P. canescens* с теми же праймерами, 3 – амплификат продуктов обратной транскрипции РНК из мицелия, выращенного на среде со свекловичным жомом, 4 – с арабинозой и фруктозой, 5 – с ксилозой, 6 – с фруктозой.

Влияние суперпродукции ксиланазы на продукцию других внеклеточных ферментов. Увеличение числа копий сильно экспрессирующихся генов, кодирующих внеклеточные гликозилазы, может влиять (обычно в сторону уменьшения) на продукцию других внеклеточных ферментов. Это влияние может объясняться различными причинами, например конкуренцией за связывание белка активатора транскрипции, изменением внутриклеточного пула индуктора и питательных веществ, голоданием клетки,

вызванным сверхпродукцией белка, или перегрузкой секреторного аппарата. В связи с этим, мы сравнили продукцию ряда ферментов мультикопийным штаммом Xyl23 и исходным штаммом PCA10. Для сравнения мы измерили активности тех же ферментов в культуральной жидкости мультикопийного продуцента β -галактозидазы PCA26. Результаты приведены в таблице 4. Как видно из приведённых данных, введение дополнительных копий ксиланазного гена не приводит к изменению продукции большинства ферментов, что говорит о том, что не происходит голодания клеток по ростовым факторам или питательным веществам. В тоже время продукция двух ферментов – β -галактозидазы и эндоглюканазы, снижена значительно. Это снижение можно было бы объяснить эффектом титрования общего для этих генов белка активатора, но в мультикопийном по гену β -галактозидазы штамме (PCA26) не происходит снижения продукции ни ксиланазы, ни эндоглюканазы, в то время как уменьшается продукция арабиназы. Таким образом, снижение β -галактозидазы и эндоглюканазы происходит не из-за титрования общего белка активатора, а вследствие каких-то других причин, например изменения внутриклеточных концентраций индукторов синтеза этих белков.

Таблица 4. Относительные активности некоторых ферментов культуральной жидкости штаммов *P. canescens* PCA26 и XYL-23, при выращивании на среде со свекловичным жомом. За 100% приняты соответствующие активности PCA10.

Штамм	Ксиланаза	β -галактозидаза	β -ксилозидаза	Арабиназа	Арабинофуранозидаза	β -глюкозидаза	Эндоглюканаза
PCA26	97	761	91	29	97	77	108
XYL23	895	58	93	98	118	114	53

Ксиланаза В. Как уже было упомянуто, мицелиальные грибы производят несколько типов ксиланаз, причем многие организмы производят несколько ферментов одновременно. Мы проверили, имеет ли *P. canescens* другие структурные гены ксиланаз, и, если имеет, то экспрессируются ли они. Для выполнения этой задачи, мы использовали тот же подход, что и при

клонировании гена ксиланазы А. Мы определили консервативные области генов одного из типов ксиланаз 11-го семейства, имеющих размер около 20кДа, синтезировали олигонуклеотидные праймеры хуlB50 и хуlB30, гомологичные этим областям, и с помощью ПЦР амплифицировали соответствующий участок генома *P. canescens*.

хуlB50: 5'-ААСТАСААСGGCAACСТTGG-3'

хуlB30: 5'-ТTCGCCCAGAAГTTGAAATG-3'

Определение нуклеотидной последовательности полученного фрагмента ДНК подтвердило, что он обладает высокой структурной гомологией с генами ксиланаз 11-го семейства родов *Aspergillus* и *Penicillium*, имеющих молекулярную массу около 20 кДа.

Мы обозначили фрагмент геномной ДНК *P. canescens*, предположительно кодирующий вторую ксиланазу этого организма, как *хуlB*. Чтобы определить происходит ли транскрипция этого гена, мы провели ПЦР, используя в качестве матрицы продукты реакции обратной транскрипции РНК, выделенной из мицелия *P. canescens*, выращенного на различных источниках углерода, и праймерами хуlB50 и хуlB30. Места отжига этих праймеров располагаются с разных сторон от содержащегося в гене интрона, в результате чего продукты амплификации кДНК и геномной

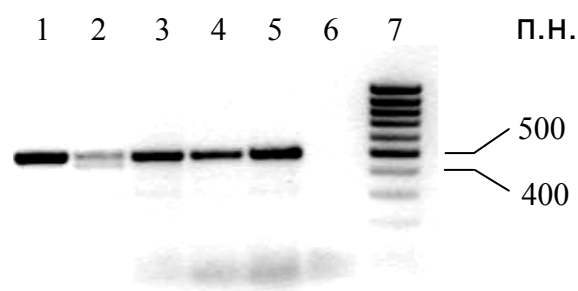


Рис. 5. Электрофоретическое разделение продуктов ОТ-ПЦР с праймерами хуlB50 и хуlB30 РНК из мицелия *P. canescens*, выращенного на различных источниках углерода. Дорожки: 1 – в качестве матрицы для ПЦР использовалась геномная ДНК (контроль), 2 – продукт обратной транскрипции РНК из мицелия, выращенного на среде со свекловичным жомом, 3 – на среде со смесью фруктозы и арабинозы, 4 – с ксилозой, 5 – с фруктозой, 6 – пустая проба, 7 – ДНК-маркер.

ДНК должны различаться на 50 оснований. (Такой метод анализа был выбран из-за его большей чувствительности, по сравнению с гибридизацией, так как в спектре белков культуральной жидкости не наблюдается значительного

количества белка соответствующего молекулярного веса (Рис. 1)). Результат электрофоретического разделения продуктов реакции представлен на Рис. 5. Из приведенной фотографии видно, что транскрипт *xylB* удалось обнаружить только в пробе, полученной из мицелия, выращенного на среде со свекловичным жомом (нижняя полоса), причем транскрипция даже в этих условиях происходит чрезвычайно слабо. В пробах, полученных из мицелия, выращенного на ксилозе, смеси фруктозы и арабинозы, и на фруктозе, амплифицируется только фрагмент геномной ДНК, содержащейся в качестве примеси в препаратах РНК.

Таким образом, *P. canescens* имеет ген, кодирующий ксиланазу 11-го семейства, с молекулярной массой около 20 кДа, но, в изученных условиях, его вклад в общую продукцию ксиланазы незначителен.

Клонирование гена *P. canescens*, кодирующего регулятор транскрипции ксиланолитических генов. Некоторое время назад был клонирован ген *xlnR*, кодирующий белок – активатор транскрипции генов ксиланолитического и целлюлолитического комплексов мицелиального гриба *Aspergillus niger* [Noel et al., 1998]. Этот белок активирует транскрипцию целого ряда генов, индуцируемую ксилозой, связываясь с последовательностью "5'-GGCTAA-3' " в их промоторах. Гомолог этого гена найден в ряде других аспергиллов, и в мицелиальном грибе *Trichoderma reesei*. Во всех этих организмах он регулирует транскрипцию внеклеточных ферментов, индуцированную ксилозой. Для *Aspergillus niger* было показано что, введение дополнительных копий *xlnR* в геном исходного штамма, приводит к повышению уровня транскрипции контролируемых им генов. (Также введение дополнительных копий гена активатора может супрессировать эффект титрования белка активатора, вызванный введением дополнительных копий контролируемых генов.)

Мы решили выяснить, есть ли у *P. canescens* ген, гомологичный *xlnR* *A. niger*, и если есть, то какова его роль в регуляции продукции ксиланазы и других внеклеточных ферментов этим организмом.

Эта часть работы состояла из следующих этапов:

- поиска в геноме *P. canescens* уникального участка с похожей структурой.
- клонирование этого участка, определение и анализ его нуклеотидной последовательности
- определение физиологической роли клонированного фрагмента ДНК.

Анализ геномной ДНК *P. canescens* и клонирование гена. С помощью ПЦР мы получили фрагмент ДНК *xlnR A. niger*, который использовали в качестве зонда для гибридизации по Саузерну геномной ДНК *P. canescens*. Анализ показал наличие в геноме *P. canescens* единственной области, с высокой степенью нуклеотидной гомологии с *xlnR A. niger*. Эту область мы выделили из банка генов *P. canescens* в составе фрагмента ДНК размером около 7,5 т.п.н., и субклонировали в плазмидный вектор. Полученная плазида была названа pXR53 (рис. 6 а).

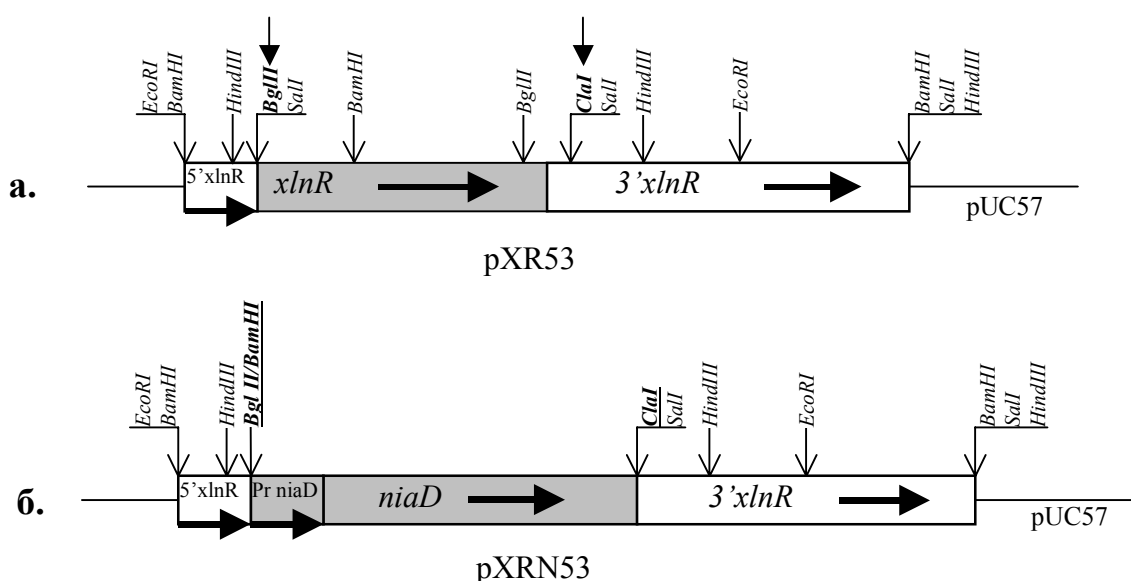


Рис. 6. а. Карта плазмиды pXR53. Фрагмент геномной ДНК *P. canescens*, клонированный в плазмидный вектор pUC57, содержит кодирующую область гена, 0,8 тпо промоторной области, и около 6 тпо 3'- не транслируемой области. Закрашенными стрелками отмечены сайты рестрикции, по которым производилось расщепление, для создания конструкции для делеции гена. **б.** Плазида pXRN53, примененная для делеции *xlnR*.

Мы определили нуклеотидную последовательность части клонированного фрагмента, и определили, что она кодирует белок на 70% совпадающий с XlnR *A. niger*. По аналогии с *A. niger* эта область была обозначена *xlnR*. Мы нашли, что в N-концевой области белка, кодируемого *xlnR* находится кластер со структурой “Cys-X2-Cys-X6-Cys-X5-Cys-X2-Cys-X6-Cys”, характерный для GAL4-подобных грибных транскрипционных регуляторов, у которых он образует цинк-содержащий ДНК-связывающий домен (“цинковый палец”) типа “Zn2Cys6”. Сравнение аминокислотных последовательностей “цинковых пальцев” известных на настоящий момент времени гомологов XlnR *A. niger* представлено на Рис. 7. Также на этом рисунке приведена структура ДНК-связывающего домена дрожжевого регулятора GAL4 и активатора транскрипции целлюлазных генов *T. reesei ace2*.

PcXlnR	TAVRRRISRA	CDQCNQLRTKCDGQQPCAHNCIEFGLSC	EYARERKKRGKASKKDLAAAAA
AnigXlnR	APVRRRISRA	CDQCNQLRTKCDGQHPCAHNCIEFGLTCE	EYARERKKRGKASKKDLAAAAA
AoXlnR	GPVRRRISRA	CDQCNQLRTKCDGQNPCAHNCIEFGLTCE	EYARERKKRGKASKKDLAAAAA
AkawXlnR	APVRRRISRA	CDQCNQLRTKCDGQHPCAHNCIEFGLTCE	EYARERKKRGKASKKDLAAAAA
AnidXlnR	APVRRRISRA	CDQCNQLRTKCDGQNPCAHNCIEFGLTCE	EYARERKKRGKASKKDIAAAAA
TreyXlnR	GPIRRRISRA	CDQCNQLRTKCDGLHPCAHNCIEFGLGCE	EYVRERKKRGKASRKDIAAQQA
TreyAce2	MDLRQA	CDRCHDKKLRCPRISGSPCCSRCAKANVAC	VFSPPSRP
Gal4	MKLLSSIEQA	CDICRLKKLKSKEKPKCAKCLKNNWEC	RYSPKTKRSPLTRAHLTEVES

Рис. 7. Сравнение аминокислотных последовательностей ДНК-связывающих доменов известных на настоящий момент времени гомологов XlnR *A. niger*. Для сравнения на этом рисунке приведена структура ДНК-связывающего домена дрожжевого регулятора GAL4 и активатора транскрипции целлюлазных генов *T. reesei Ace2*. Обведены области цинк-содержащего кластера, серым фоном отмечены совпадающие аминокислоты. Приведены последовательности (сверху вниз): XlnR *P. canescens*, XlnR *A. niger*, AoXlnR *A. oryzae*, XlnR *A. kawachii*, XlnR *A. nidulans*, Xyr1 *T. reesei*, Ace2 *T. reesei*, Gal4 *S. cerevisiae*.

Из приведенного сравнения видно, что аминокислотная последовательность ДНК-связывающего домена XlnR *P. canescens* отличается от домена XlnR *A. niger* на две аминокислоты, но эти аминокислоты не являются консервативными. Такая высокая степень гомологии позволяет предположить, что XlnR *P. canescens* связывается с той же последовательностью, что и его гомологи.

Влияние делеции и амплификации *XlnR* на продукцию ксиланазы и рост штамма. Для определения физиологической роли *xlnR* мы заменили его кодирующую область геном нитратредуктазы мицелиального гриба *P. chrysogenum*, под управлением собственного промотора, для чего создали конструкцию, изображенную на Рис. 6 б. Также, с помощью плазмидной трансформации, мы получили ряд штаммов с увеличенным числом копий *xlnR*.

Штаммы с делецией оказались практически не способны к росту на агаризованной среде с ксиланом в качестве единственного источника углерода, но продолжали хорошо расти на среде с глюкозой (Рис. 8 а), фруктозой, ксилозой, и карбоксиметилцеллюлозой.

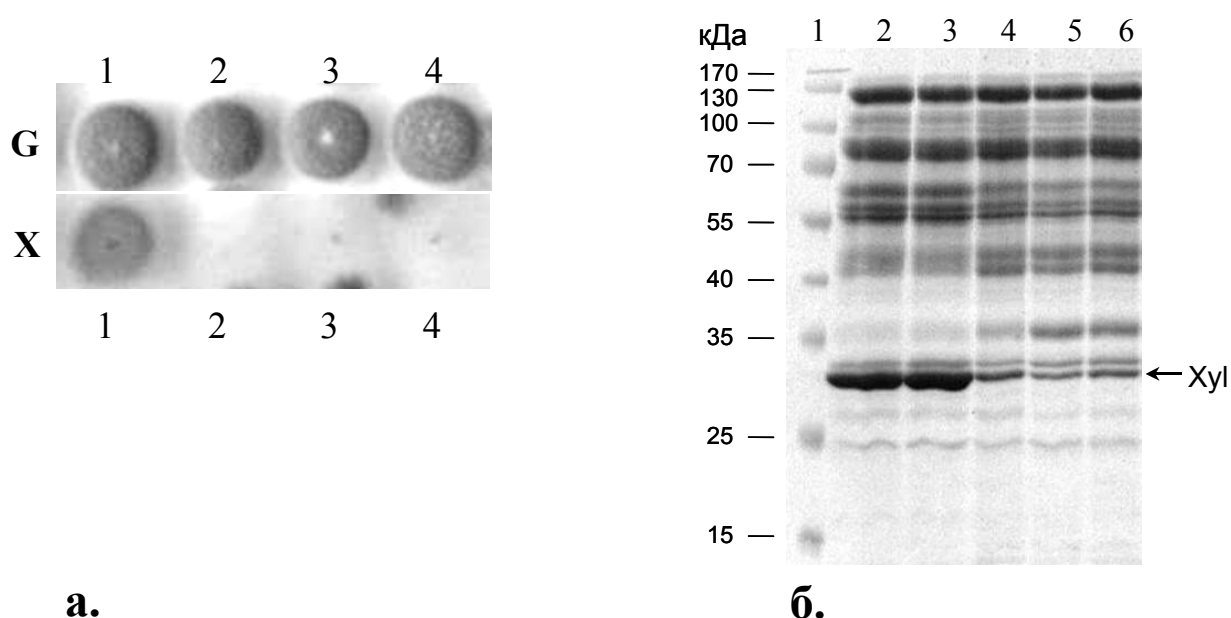


Рис. 8. Влияние делеции *xlnR* на рост гриба и продукцию ксиланазы. **а.** Рост штаммов на среде с глюкозой (G) и ксиланом (X). 1 – дикий тип (PSA10), 2, 3, 4 – штаммы с делецией *xlnR*. **б.** SDS-ПААГ-электрофорез белков культуральной жидкости штаммов, ферментированных в жидкой среде со свекловичным жомом. Дорожки: 1 – белковый маркер, 2, 3 – культуральная жидкость штаммов дикого типа, 4, 5, 6 – штаммов с делецией *xlnR*.

Культивирование этих штаммов в жидких средах с различными источниками углерода показало, что у них значительно снижена продукция ксиланазы как при росте на среде со свекловичным жомом (Рис 8 б, Табл. 5), так и при росте на среде с ксилозой, и среде со смесью фруктозы и арабинозы

(Табл. 5). Таким образом, белок, кодируемый *xlnR*, необходим для индукции синтеза ксиланазы обоими сахарами.

Одновременно с ксиланазной активностью, в культуральной жидкости измерялась активность β -галактозидазы. Результаты измерений также представлены в таблице 5. Из приведенных данных видно, что делеция *xlnR* влияет на продукцию β -галактозидазы значительно слабее, чем на продукцию ксиланазы. К тому же это влияние неоднозначно. Таким образом, продукция β -галактозидазы у *P. canescens*, находится под контролем другого регулятора, несмотря на то, что она индуцируется арабинозой, также как продукция ксиланазы.

Таблица 5. Накопление ксиланазной и β -галактозидазной активностей при ферментации штамма дикого типа (PCA10) и штамма с делецией *xlnR* ($\Delta xlnR$) на средах, содержащих различные источники углерода.

Источник углерода	Фермент	PCA10, ед/мл	$\Delta xlnR$, ед/мл	Остаточная активность %
Свекловичный жом	Ксиланаза	97,5	14,7	14
	β - галактозидаза	64,2	43,4	67
Арабиноза + фруктоза	Ксиланаза	5,1	не обнаруживается	0
	β - галактозидаза	17,6	13,2	77
Ксилоза	Ксиланаза	0,1	не обнаруживается	0
	β - галактозидаза	0,2	0,4	200
Фруктоза	Ксиланаза	не обнаруживается	не обнаруживается	—
	β - галактозидаза	0,3	0,4	133

Также было показано, что введение дополнительных копий *xlnR* увеличивает продукцию ксиланазы (Табл. 6, Рис. 9 б). Анализ мРНК штаммов с делецией *xlnR* и дополнительными копиями этого гена, выращенных на

свекловичном жоме, показал, соответственно, снижение и увеличение количества мРНК *xyIA*, что говорит о том, что делеция *xlnR* влияет именно на транскрипцию ксиланазного гена. (Рис. 9 а).

Роль *xlnR* в регуляции продукции других ферментов. Мы измерили активности ряда ферментов в культуральной жидкости штаммов с делецией и дополнительными копиями *xlnR*, выращенных на среде со свекловичным жомом. Результаты приведены в таблице 6.

Таблица 6. Активности ферментов в культуральной жидкости штамма дикого типа (PCA10), штамма с делецией *xlnR* ($\Delta xlnR$), и штамма с дополнительными копиями *xlnR* (XR53), выращенных на среде со свекловичным жомом.

Фермент	Активность, ед/мл		
	PCA 10	$\Delta xlnR$	XR53
α -L-арабинофуранозидаза	39,6	38,4	45,6
β -D-глюкозидаза	6,0	4,4	7,0
β -D-целлобиаза	0,4	0,04	1,8
β -D-ксилозидаза	9,3	3,3	27,9
α -D-галактозидаза	4,8	1,4	26
β -D-галактзидаза	64,2	43,4	55,8
эстеразная активность (по <i>n</i> НФ-бутирату)	2,6	0,8	22
эстеразная активность (<i>n</i> НФ-капроату)	0,8	1,0	14,6
Ксиланаза (по ксилану из березы, pH 5,0)	132	22	300
Арабиноксилан- арабинофураногидролаза (по арабиноксилану из пшеницы)	148	72	320
Эндоглюканаза (по КМЦ)	2,2	2,0	11
Эндоглюканаза (по β -глюкану из овса)	2,4	3,2	25,2

Из представленных данных видно, что у штаммов с делецией *xlnR* значительно уменьшена не только продукция эндо- β -1,4-ксилазы, но, также, других ферментов с ксиланолитической активностью (арабиноксилан-арабинофураногидролазы, β -ксилозидазы и β -целлобиазы), в то время как продукция β -галактозидазы и α -L-арабинофуранозидазы изменялась незначительно. Активности β -глюкозидазы и эндо- β -1,4-глюканазы так же изменялись мало, оставаясь весьма низкими. Электрофоретическая картина секретируемых белков исследуемых штаммов приведена на Рис. 9. Можно

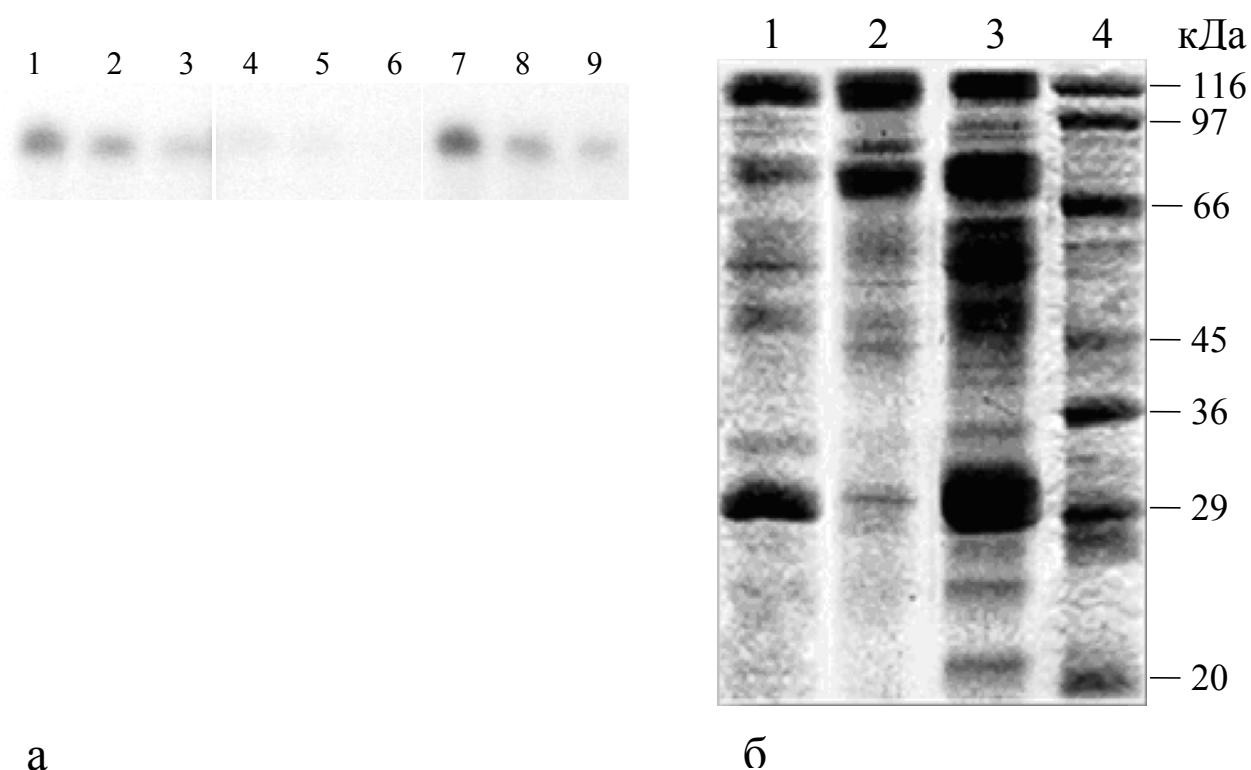


Рис. 9. Влияние делеции и амплификации *xlnR* на транскрипцию *xylA* и продукцию внеклеточных ферментов. **а.** Блот-гибридизация РНК из мицелия, выращенного на свекловичном жоме, с фрагментом ДНК *xylA*. Дорожки: 1, 2, 3 – 10, 5, 2,5 мкг РНК исходного штамма (РСА10), соответственно; 4, 5, 6 – 10, 5, 2,5 мкг РНК штамма с делецией *xlnR*; 7, 8, 9 – 10, 5, 2,5 мкг РНК штамма с дополнительными копиями *xlnR*. **б.** SDS-ПААГ–электрофорез белков культуральной жидкости штаммов, ферментированных в жидкой среде со свекловичным жомом. Дорожки: 1 – исходный штамм (РСА10), 2 – штамм с делецией *xlnR*, 3 – штамма с увеличенным числом копий *xlnR*, 4 – маркер молекулярного веса.

видеть, что штамм с делецией *xlnR* синтезируют два мажорных белка – β -галактозидазу (полоса в области 120 кДа) и α -L-арабинофуранозидазу (полоса в

области 70 кДа), в то время как другие ферменты, проявляющиеся на электрофореze в виде заметных полос, в том числе мажорная ксиланаза (полоса в области 31 кДа), практически не секретируются.

Увеличение числа копий *xlnR* увеличивало активность тех же ферментов, активность которых уменьшалась у штамма с удалённым геном *xlnR* (Табл. 6). Из Рис. 9б видно, что среди всех секретируемых белков значительно увеличивался вклад компонентов с массой 50-60 кДа, а так же появлялись новые электрофоретические полосы, соответствующие белкам с массой порядка 20 кДа, возможно соответствующие ксиланазе В. Затрагивались и некоторые целлюлитические ферменты: в мультикопийном варианте *P.canescens* XR53 возрастала секреция β -целлобиазной и эндо-глюканазной активностей. Вместе с тем, активность β -галактозидазы и α -L-арабинофуранозидазы, как и в случае делеционного варианта *xlnR*, изменялась незначительно.

Транскрипция *xlnR*. Мы попытались определить, как регулируется транскрипция *xlnR*. Для этого мы использовали тот же подход, что и при исследовании транскрипции *xylA* и *xylB*. Были синтезированы два олигонуклеотидных праймера *xlnR*72 и *xlnR*32, комплементарных областям, расположенным с двух сторон первого интрона *xlnR*.

*xlnR*72: 5'-ТССААТСГТТСГССААТТССТ-3'

*xlnR*32: 5'-ГСААГАТЦСТТТТТСГАГГСТТ-3'

С помощью этих праймеров была проведена ПЦР с продуктами реакции обратной транскрипции РНК,

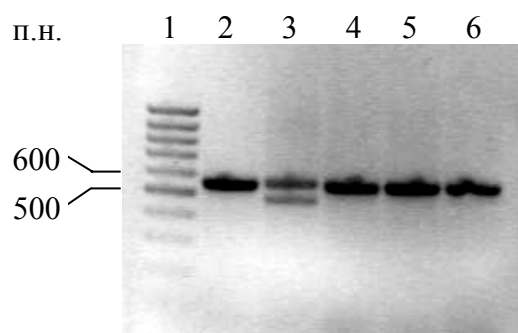


Рис. 10. Электрофоретическое разделение продуктов ОТ-ПЦР с праймерами *xlnR*72 и *xlnR*32 РНК из мицелия *P. canescens*, выращенного на различных источниках углерода. Дорожки: 1 – ДНК-маркер, 2 – ПЦР с геномной ДНК (контроль), 3 – ПЦР с продуктом обратной транскрипции РНК из мицелия, выращенного на свекловичном жоме, 4 – на смеси фруктозы и арабинозы, 5 – на ксилозе, 6 – на фруктозе.

выделенной из мицелия *P. canescens*, выращенного на различных источниках углерода. Фотография электрофоретического разделения продуктов реакции представлена на Рис. 10. Можно видеть, что транскрипт *xlnR* удалось обнаружить в препарате РНК, выделенном из мицелия, выращенного на свекловичном жоме, и не удалось – при росте на синтетических средах. Этот факт позволяет сделать вывод о том, что транскрипция *xlnR* регулируется, но не позволяет определить природу этой регуляции. Можно предложить два объяснения усиления транскрипции *xlnR* при росте на среде со свекловичным жомом: либо в этой среде присутствует специфический индуктор транскрипции *xlnR*, либо транскрипция этого гена подвержена катаболитной репрессии.

Выводы.

1. Показано наличие у *P. canescens* F178 двух генов *xylA* и *xylB*, первый из которых кодирует ксиланазу 10-го семейства, а второй – 11-го.
2. Показано, что продукция ксиланазы *P. canescens* обусловлена, главным образом, активностью гена *xylA*, в то время как вклад *xylB* в общую продукцию ксиланазы незначителен.
3. Клонирован полный ген *xylA*, и показано, что введение дополнительных копий этого гена в исходный штамм пропорционально увеличивает продукцию ксиланазы. Это доказывает, что транскрипция *xylA* является лимитирующим фактором в продукции ксиланазы *P. canescens*.
4. Клонирован ген *xlnR*, кодирующий позитивный регулятор транскрипции гена мажорной ксиланазы *P. canescens* *xylA*, и показано что его амплификация приводит к увеличению транскрипции этого гена.
5. Показано, что *xlnR* необходим для индукции синтеза ксиланазы, обусловленной как L-арабинозой, так и D-ксилозой.
6. Показано, что *xlnR* играет ключевую роль в продукции целого ряда ксиланолитических ферментов мицелиальным грибом *P. canescens*, и что увеличение числа копий этого гена приводит к увеличению синтеза этих ферментов.
7. Показана перспективность использования *P. canescens* F178 в качестве базового штамма для создания промышленного продуцента ксиланазы.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Николаев И.В., Беккер О.Б., Серебряный В.А., Чулкин А.М., Винецкий Ю.П. Суперпродукция секретируемой бета-галактозидазы мицелиальным грибом *Penicillium canescens*: структура гена и конструкция мультикопийного продуцента // Биотехнология. 1999. №3. С. 3-13.
2. Серебряный В.А., Вавилова Е.А., Чулкин А.М., Винецкий Ю.П. Клонирование гена эндо-1,4-β-ксилазазы *Penicillium canescens* и получение мультикопийных штаммов // Прикладная биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. № 5. С. 495-501.
3. Serebrianyi V., Nikolaev I., Aleksenko A., Vinetski Y., Nielsen J. Expression of genes encoding arabinose induced carbohydrases in *Aspergillus nidulans* is modulated by different factors // Abstracts of 6-th European Conference of Fungal Genetics, 6-9 April 2002, Pisa, Italy. P. 18.
4. Синицына О.А., Гусаков А.В., Окунев О.Н., Серебряный В.А., Вавилова Е.А., Винецкий Ю.П., Синицын А.П. Рекомбинантная эндо-1,4-β-ксилазаза *Penicillium canescens* // Биохимия. 2003. Т. 68. № 12. С. 1631-1638.
5. Винецкий Ю.П., Вавилова Е.А., Серебряный В.А., Чулкин А.М. Фрагмент ДНК РСХ-302, кодирующий синтез секретируемой эндо-(1-4)-бета-ксилазазы *Penicillium canescens* и штамм гриба *Penicillium canescens* - продуцент секретируемой эндо-(1-4)-бета-ксилазазы. Патент РФ № 2197526. 2003.01.27.
6. Серебряный В.А., Синицына О.А., Федорова Е.А., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Соколова Л.М., Вавилова Е.А., Винецкий Ю.П., Синицын А.П. Синтез ксиланолитических ферментов и других карбогидраз в трансформантах гриба *Penicillium canescens* с измененным числом копий гена транскрипционного активатора *xlnR* // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 6. С. 1-8.