

УДК 577.29

## ЭКСПРЕССИЯ НУКЛЕАЗЫ CAS9 КОМПЛЕКСА CRISPR/CAS СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА В МИЦЕЛИАЛЬНОМ ГРИБЕ *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*

В.Ю. Кислицин<sup>1</sup>, А.М. Чулкин<sup>1</sup>, И.Г. Синельников<sup>1</sup>, А.П. Сеницын<sup>1,2</sup>,  
А.М. Рожкова<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук; <sup>2</sup> химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; \*e-mail: amrojkova@mail.ru)

Ген *cas9* бактерии *Streptococcus pyogenes*, кодирующий нуклеазу Cas9 системы CRISPR/Cas второго класса, был экспрессирован в мицелиальном грибе *Penicillium verruculosum* под контролем конститутивного аутологичного промотора гена *gpdA* глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы, который был впервые клонирован и секвенирован в представленной работе. Функциональность *gpdA* промотора была подтверждена экспрессией гетерологичного гена  $\beta$ -глюкозидазы *Aspergillus niger* в *P. verruculosum*. Относительное количество копий и уровень экспрессии гена *cas9* в рекомбинантных штаммах был определен методом ПЦР в реальном времени. Для детекции и определения локализации нуклеазы Cas9 в клетках гриба *P. verruculosum* была получена химерная форма Cas9 и флюоресцентного белка eGFP, добавленного на C-конец нуклеазы. Флюоресцентная микроскопия растущего мицелия подтвердила внутриклеточную экспрессию химерной конструкции в клетках рекомбинантных штаммов.

**Ключевые слова:** геномное редактирование, *Penicillium verruculosum*, *gpdA* промотор.

В настоящее время методы геномного редактирования все шире используются в биотехнологии. Этот подход позволяет проводить нокаутирование определенных генов, удаление целых областей генома или замещение его участков донорными фрагментами ДНК [1, 2]. Метод геномного редактирования основан на использовании внутриклеточных механизмов репарации и рекомбинации геномной ДНК. Эффективно активировать данные процессы в необходимых участках генома можно, создавая в этих местах двуцепочечные разрывы геномной ДНК с помощью искусственных программируемых нуклеаз [3]. Одна из наиболее применяемых нуклеаз данного типа – белок Cas9 в комплексе с направляющей РНК (sgRNA). Широкое применение данного комплекса обусловлено большим удобством работы с ним по сравнению с программируемыми нуклеазами других типов [4]. Специфичность места гидролиза ДНК комплексом Cas9-sgRNA определяет последовательность 20-нуклеотидного участка направляющей РНК, называемого протоспейсером, который комплементарен редактируемому фрагменту генома. Таким образом, для получения специфического двуцепочечного разрыва нуклеазой Cas9, нужно лишь доставить в клетку данный белок с направляющей

РНК длиной примерно 100 нуклеотидов или получить их *in vivo*.

Впервые редактирование генома мицелиального гриба с использованием нуклеазы Cas9 было проведено в 2015 г. [5]. Применение данного подхода существенно облегчает изучение функций генов, а также получение промышленных штаммов с улучшенными технологическими характеристиками [6]. В опубликованных материалах по редактированию геномов мицелиальных грибов белок Cas9 доставляют в клетку либо в виде комплекса с направляющей РНК [6], либо в виде гена. При редактировании с использованием собранного *in vitro* комплекса полученные клоны не содержат гена нуклеазы Cas9 и направляющей РНК, что, несомненно, можно считать преимуществом. Однако это требует дополнительных работ по синтезу и очистке компонентов комплекса. Доставка гена *cas9* в редактируемую клетку может осуществляться без проведения указанных операций. В этом случае используют или автономно реплицирующиеся плазмиды [7] или интеграцию гена *cas9* в геном [8]. Использование автономных плазмид с участком *AMA1 Aspergillus nidulans*, отвечающим за автономную репликацию плазмид, позволяет элиминировать гены системы CRISPR/

Cas. Возможность автономной репликации таких плазмид показана для грибов рода *Aspergillus*, а при изучении грибов рода *Penicillium* получены данные о встраивании фрагментов таких плазмид в геном [9]. Следовательно, использование плазмид с участком *AMA1* у грибов из рода *Penicillium* представляется нецелесообразным.

*Penicillium verruculosum* (ВКМ F-3973D) секретирует высокоактивный сбалансированный комплекс целлюлаз [10], который используется для осахаривания растительных отходов, биополировки хлопчатых тканей, повышения питательности комбикормов и т.д. Адаптация технологии редактирования генома для данного вида может дать новый мощный инструмент для улучшения продуцируемых им ферментных комплексов.

Цель настоящей работы состояла в оценке возможности экспрессии гена *cas9* *Streptococcus pyogenes* в мицелиальном грибе *P. verruculosum* и получении штаммов *P. verruculosum* с генотипом (*cas9*<sup>+</sup>), что может стать этапом разработки методологической базы для редактирования генома гриба *P. verruculosum* с использованием системы CRISPR/Cas9.

## Материалы и методы

### Бактериальные и грибные штаммы и среды

**Штаммы.** В работе использовали штамм *E. coli* XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)]), реципиентный штамм *P. verruculosum* 537 (*niaD*<sup>-</sup>) [11].

**Среды.** Реципиентный и рекомбинантные штаммы *P. verruculosum* культивировались на минимальной среде (МС) с добавлением 10 мМ хлорида аммония или 10 мМ нитрата натрия в качестве источника азота. Состав среды МС (%): 50×PM (2,0), раствор микроэлементов (0,1), глюкоза (1,0), а также 10 мМ NaNO<sub>3</sub> или NH<sub>4</sub>Cl. Состав 50×PM, (%): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,15), KCl (0,05), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,05). Состав раствора микроэлементов (%): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0,005), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0,040), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,080), MnSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,08), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,080), ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,080).

Состав ферментационной среды (ФС, %): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,50), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,50), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,03), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,03), МКЦ (4,00), дрожжевой экстракт (1,00), пшеничные отруби (1,00).

Полученные после трансформации клоны пересевали на отдельные чашки Петри со средой МС для получения спор. Колбы со 100 мл ФС засеивали 1×10<sup>7</sup> спор исследуемых штаммов. Рекомбинант-

ные штаммы культивировали 6 сут при 30 °С и 220 об/мин. На вторые – шестые сутки отбирали по 5 мл культуральной жидкости (КЖ), которую затем фракционировали путем центрифугирования (4000 об/мин) в течение 5 мин. Определение концентрации белка в супернатантах проходило по методу Лоури.

### Определение β-глюкозидазной активности

β-Глюкозидазную активность определяли по гидролизу *n*-нитрофенил-β-D-глюкопиранозида (пНФГ) концентрацией 1 мМ («Sigma», N-8016) до *n*-нитрофенола при 40 °С и рН 5,0. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое способно катализировать образование 1 мкмоль продукта за 1 мин.

### Клонирование промотора гена *gpdA*

Внутренний фрагмент гена *gpdA* *P. verruculosum* был клонирован и секвенирован нами ранее [12]. На полученную нуклеотидную последовательность были синтезированы два реверсных праймера PVGPDCR1 и PVGPDCR2 длиной 30 нуклеотидов. Протяженная 5'-фланкирующая область размером около 1600 п.н. была амплифицирована с использованием метода «ПЦР для неклонированной геномной ДНК» [13]. Последовательность секвенировали с помощью праймеров AP2, PVGPDCR2 и PVGPDSR1 (табл. 1). Анализ нуклеотидной последовательности выявил, что секвенированная часть гена *gpdA* *P. verruculosum* содержит 5 интронов в кодирующей части. Экзон-интронная структура части гена была определена путем сравнения нуклеотидной и аминокислотной последовательностей гена *gpdA* *P. verruculosum* с генами глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназ других мицелиальных грибов с использованием правила GT–AG для начала и конца интронов. Таким образом, была получена неполная последовательность гена *gpdA* *P. verruculosum*, содержащая промотор этого гена длиной около 800 п.н. и 5'-фрагмент его кодирующей части (рис. 1).

### Создание конструкции для экспрессии гена β-глюкозидазы (*bglI*) *Aspergillus niger* под контролем промотора гена *gpdA* *P. verruculosum*

Для проверки функциональности промотора *gpdA* *P. verruculosum* была разработана плазмидная конструкция, содержащая в себе ген *bglI* секретируемой β-глюкозидазы *Aspergillus niger* (КФ 3.2.1.21) с собственным лидерным пептидом под контролем промотора гена *gpdA* *P. verruculosum*

Таблица 1

## Олигонуклеотиды, использованные в работе

Название	Последовательность
GpdBglR	TCAAAGTGAACCTCATGATTGCGGTGATAGTTGC
GpdBglD	ATCACCGCAATCATGAGGTTCACTTTGATCGAGGC
BglKpnR	CCCGTTGAGCACACTGATGGTCAAG
CasGFPSD1	CGACAGCTTCTCCACAGACTG
CasGFPSD2	CAACCTGCTGGCCCAGATC
CasGFPSR1	GTCCACGATGTTGCCGAAG
PVGPDSR1	CCATGCCCATCTGTCCAAGAGA
PVGPDCR1	TGGCAGTGTAGGAGTGGATGGTGGTCATGA
PVGPDCR2	CGTGGTTGACACCCATGACGAACATCTAGA
AP2	ATAGGGCTCGAGCGGC
NlsCasD	TCACCGCAATCATGCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTCCGGT
GpdBamD	GATCAGGATCCGACTTCAGACCTGGATCGG
GpdNLSR	TTCTTCTTTGGCATGATTGCGGTGATAGTTGC
CasApaR	GGTCATCCAGGCGAATCTGCTG
prGpdSD	GCTGCGTTACTTCTGGTGGAG
PVGPDQD2	AACGGCAAGCGCGTCAAGTTCT
PVGPDQR2	ACCCTTCAAGTGAGCAGAGGCCTT
PVACTQD1	ACAAGAAATCCAGACCGCTCCC
PVACTQR1	TTTCGAGACCGATGACGGAAGG

и с терминатором гена *cbh1 P. verruculosum*. Для этого был амплифицирован промотор гена *gpdA* с использованием праймера GpdBamD, содержащего внутри себя сайт рестрикции *Bam*HI, и праймера GpdBglR (табл. 1), обратно комплементарного 3'-концу промотора, с короткой нуклеотидной последовательностью на 5'-конце, обратно комплементарной началу кодирующей части сигнального пептида гена *bgl1*. В качестве матрицы использовали геномную ДНК *P. verruculosum*. Был также амплифицирован 5'-фрагмент кодирующей части гена *bgl1* с использованием праймера GpdBglD, комплементарного началу кодирующей части сигнального пептида гена *bgl1*, с последовательностью на 5'-конце, комплементарной 3'-концу промотора *gpdA*, и праймера BglKpnR, обратного комплементарного 5'-кодирующей части гена *bgl1*, который расположен непосредственно после уникального сайта рестрикции *Kpn*I. В качестве матрицы использовали ДНК плазмиды pPrCBH::bgl1, полученной нами ранее [11]. Смесь этих ПЦР-фрагментов

в эквимолярном соотношении была использована в качестве матрицы для ПЦР с праймеров GpdBamD и BglKpnR. Полученный в результате амплификации ПЦР-фрагмент размером около 2 т.п.н. содержал в себе промотор гена *gpdA* и 5'-часть кодирующей области гена *bgl1*, фланкируемого сайтами рестрикции для *Bam*HI и *Kpn*I.

ПЦР-фрагмент был лигирован в плазмиду pPrCBH::bgl1, предварительно обработанную рестриктазами *Bam*HI и *Kpn*I. Полученная конструкция pGpdBgl1 была секвенирована с использованием праймеров prGpdSD и BglKpnR (табл. 1) в обоих направлениях (рис. 2).

#### Создание конструкции для экспрессии химерного белка Cas9::eGFP

Для экспрессии химерного белка Cas9::eGFP была создана плазмидная конструкция, которая содержит ген *cas9-eGFP*, кодирующий химеру Cas9::eGFP, фланкированный с N-конца сигналом внутриядерной локализации вируса SV40 и содержащий между Cas9 и eGFP сигнал внутриядерной

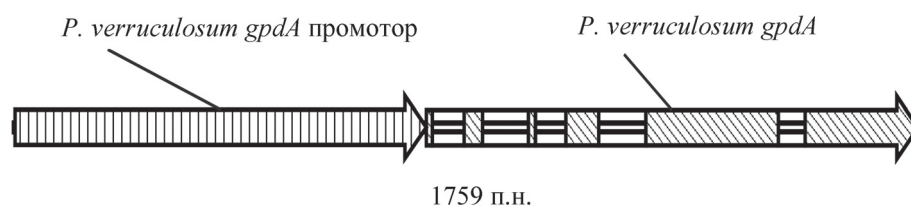


Рис. 1. Структура секвенированной части гена *gpdA* *P. verruculosum*

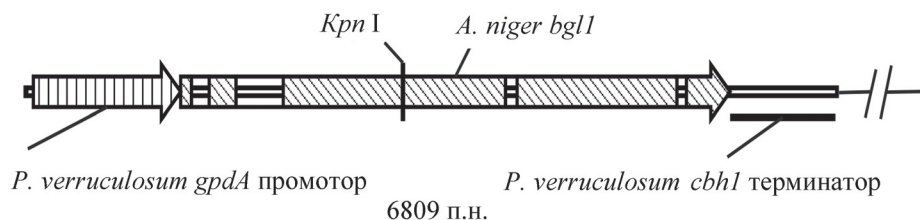


Рис. 2. Схема плазмиды *pGpdBgl1*. Указаны используемый сайт рестрикции и экзон-интронная структура гена

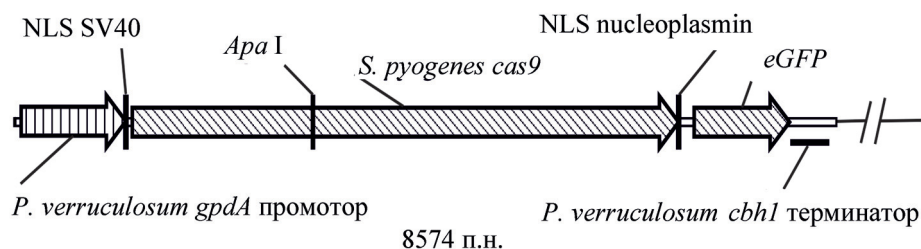


Рис. 3. Схема плазмиды *pGpdCas9GFP*. Указаны используемый сайт рестрикции и сигналы внутриядерной локализации (NLS)

локализации нуклеоплазмин *Xenopus laevis* [14] под контролем промотора гена *gpdA* *P. verruculosum* и с терминатором гена *cbh1* *P. verruculosum*. Конструкция получена аналогично предыдущей.

Промотор гена *gpdA* был амплифицирован с помощью праймера *GpdBamD*, содержащего внутри себя сайт рестрикции *Bam*HI, и праймера *GpdNLSR* (табл. 1), обратного комплементарного 3'-концу промотора, с дополнением на 5'-конце, обратного комплементарного началу кодирующей части сигнала внутриядерной локализации вируса SV40. В качестве матрицы использовали геномную ДНК *P. verruculosum*. Также был амплифицирован фрагмент, кодирующий сигнал внутриядерной локализации вируса SV40 и 5'-часть гена *cas9*, с использованием праймера *NlsCasD* (табл. 1), комплементарного началу сигнала внутриядерной локализации вируса SV40, с дополнением на 5'-конце, комплементарного 3'-концу промотора *gpdA*, и праймера *CasAraR*, обратного комплементарного 5'- кодирующей части гена *cas9*, которая расположена непосредственно после уникального сайта рестрикции *Apa*I. Смесь ПЦР-фрагментов в эквимольном со-

отношении была использована в качестве матрицы для ПЦР с праймеров *GpdBamD* и *CasAraR* (табл. 1). Полученный в результате амплификации ПЦР-фрагмент размером около 1,4 т.п.н. содержал в себе промотор гена *gpdA*, сигнал внутриядерной локализации вируса SV40, и 5'-часть кодирующей области гена *cas9*, фланкируемый сайтами действия эндонуклеаз *Bam*HI и *Apa*I.

ПЦР-фрагмент был обработан рестриктазами *Bam*HI и *Apa*I и встроен с помощью реакции лигирования вместо промотора гена *cbh1*, сигнала внутриядерной локализации вируса SV40 и 5'-части кодирующей области гена *cas9* в плазмиду *pPrCBH::Cas9::GFP* [неопубликованные данные], расщепленную эндонуклеазами *Bgl*II и *Apa*I. Полученная конструкция *pGpdCas9GFP* (рис. 3) была секвенирована с помощью праймеров *CasGFPSR1*, *CasGFPSD1*, *CasGFPSD2* (табл. 1).

### **Трансформация штамма *P. verruculosum* 537 и культивирование рекомбинантов**

Целевыми плазмидами *pGpdBgl1*, *pGpdCas9GFP* проводили трансформацию по методике

[15], используя котрансформационную плазмиду pSTA-10 [16], несущую селективный ген *niaD* нитратредуктазы *Aspergillus niger*.

Рекомбинантные штаммы высевали уколом на агаризованную среду ММ с 10 мМ нитратом натрия в качестве источника азота и инкубировали 14 дней при 32 °С. Споровой суспензией засеивали 100 мл жидкой среды ММ ( $5 \times 10^6$  спор/мл) с 10 мМ нитратом натрия и инкубировали 48 ч на орбитальной качалке (220 об/мин) при 32 °С, после чего из мицелия выделяли ДНК, используя набор DNeasy Plant Mini Kit («QIAGEN», США). РНК выделяли с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit («QIAGEN», США).

### Обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени

Перед обратной транскрипцией по 1 мкг выделенной РНК обрабатывали ДНКазой I («ThermoScientific», США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Далее по 300 нг обработанной РНК использовали для синтеза кДНК набором RevertAid RT Reverse («ThermoScientific», США) с применением коммерческой смеси праймеров oligoT и Random Hexamer Primers по 25 пкМ каждого на реакцию.

Пробы для ПЦР в реальном времени имели следующий состав: прямой праймер (10 пмоль), обратный праймер (10 пмоль), реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ с красителем EVA Green (M-439, «Синтол», Россия) (8 мкл), ДНК (4 нг), деионизованная вода (до 20 мкл). Программа ПЦР в реальном времени включала три стадии: I стадия – 5 мин при 95 °С, II стадия – 15 с при 95 °С, 45 с при 60 °С, 39 циклов (с измерением флуоресценции после каждого цикла), III стадия – увеличение температуры от 75 до 95 °С с шагом 0,2 °С за 10 с для определения температуры плавления продуктов ПЦР.

Для осуществления количественной ПЦР гена *cas9*, а также референсных генов *gpdA* и

*actA* были использованы соответственно следующие пары праймеров (табл. 1):

CasGFPSD1–CasGFPSR1,  
PVGPDQD2–PVGPDQR2,  
PVACTQD1–PVACTQR1.

Аmplификацию проводили на приборе «CFX96» («Bio-Rad», США) в совместимых 96-луночных белых низкопрофильных плашках. Для анализа результатов использовали ПО Bio-Rad CFX Manager v. 3.1.

### Подготовка препаратов для микроскопии

В стерильные пробирки (2 мл) с 1 мл минимальной среды МС засеивали по 10 мкл смыва спор с колоний выросших на чашках Петри с агаризованной средой ММ. Споры проращивали в течение 20 ч при 32 °С. Перед нанесением на предметные стекла проросший мицелий концентрировали на дне пробирки центрифугированием 5 мин при 4000 об/мин; 900 мкл среды отбирали с верхней части пробирки. Из оставшихся 100 мкл отбирали 10 мкл и помещали на предметные стекла для приготовления препарата типа «раздавленная капля». Микроскопирование проводили на флуоресцентном микроскопе «Axioskop 40» («Zeiss», Германия) с использованием ртутной лампы.

### Результаты и их обсуждение

Для экспрессии белка Cas9 в клетках *P. verruculosum* было решено использовать собственный конститутивный промотор (*gpdA*) глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы. Аналогичная схема была использована при экспрессии Cas9 в грибах рода *Aspergillus* [7]. Промотор гена *gpdA P. verruculosum* был клонирован и секвенирован впервые.

Для подтверждения функциональности клонированного промотора гена *gpdA P. verruculosum* была разработана плазида pGpdBgl1 (рис. 2). Ген *bglI* использовали в данном случае как референсный ген, показывающий ранее стабильную интеграцию в геном *P. verruculosum* в случае как

Т а б л и ц а 2

Концентрация белка ( $C_B$ , мг/мл) и удельная активность  $\beta$ -глюкозидазы на 1 мл культуральной жидкости (\*) и на 1 мг общего секретлируемого белка (\*\*)

$C_B$	КЖ	537 (К)	BGL-4	BGL-5	BGL-15	BGL-16
			4,4±0,12	5,9±0,26	2,95±0,07	7,2±0,66
Активность по пНФГ, ед./мл*		0,36 ± 0,01	34±1,5	9,1±0,28	21,8±0,91	35±2,5
Активность по пНФГ, ед./мг**		0,082±0,004	5,7±0,29	3,1±0,17	3,02±0,40	5,74±0,898

О б о з н а ч е н и я: КЖ – культуральная жидкость.

индуцибельной, так и конститутивной экспрессии [17]. Плазмиду интегрировали в геном штамма *P. verruculosum* 537 в результате котрансформации с селективной плазмидой pSTA-10, несущей ген *niaD* нитратредуктазы *A. niger*. После культивирования трансформантов на среде ФС были измерены концентрация белка в культуральной жидкости и активность  $\beta$ -глюкозидазы по пНФГ (табл. 2). Из результатов измерений следует, что новый промотор *gpdA* обеспечивает синтез  $\beta$ -глюкозидазы на уровне, соответствующем конститутивной экспрессии [17] и достаточном для экспрессии белка Cas9. Более того, относительно низкий биосинтез нуклеазы Cas9 предположительно снизит уровень нецелевого расщепления геномной ДНК комплексом Cas9–sgRNA [18].

Для экспрессии гена *cas9* в *P. verruculosum* 537 была создана плазмидная конструкция pGpdCas9GFP (рис. 3). Плазмидой pGpdCas9GFP трансформировали реципиентный штамм *P. verruculosum* 537. Полученные трансформанты выращивали на минимальной среде с глюкозой в качестве источника углерода. Из мицелия выделяли ДНК и РНК, после чего анализировали относительное число копий гена *cas9* в трансформантах

и уровень экспрессии гена *cas9* при росте мицелия на глюкозе, используя метод ПЦР в реальном времени. В качестве референсных генов были выбраны гены *gpdA* и актина *actA* *P. verruculosum*. По результатам измерения относительного числа копий гена *cas9*, встроившихся в геном, и относительного уровня транскрипции в рекомбинантных клонах было установлено, что из пяти проверенных клонов наибольшее число копий имеется в клонах 1, 2 и 3, тогда как в клонах 4 и 5 их примерно в 5 раз меньше. Уровень экспрессии также коррелирует с числом встроившихся копий (рис. 4, 5). Клон 1 был выбран для анализа с использованием флюоресцентной микроскопии.

На снимках мицелия, полученного с помощью флюоресцентной микроскопии, наблюдалась зеленая флюоресценция с усилением в точках, что может свидетельствовать о накоплении Cas9::eGFP в ядрах (рис. 6). Ядерная локализация Cas9 позволит осуществить траффик комплекса Cas9–sgRNA в протопласты *P. verruculosum* в дальнейших экспериментах. Нами был также проведен эксперимент по трансформации плазмиды pGpdGFP, не содержащей ген *cas9*. В этом случае

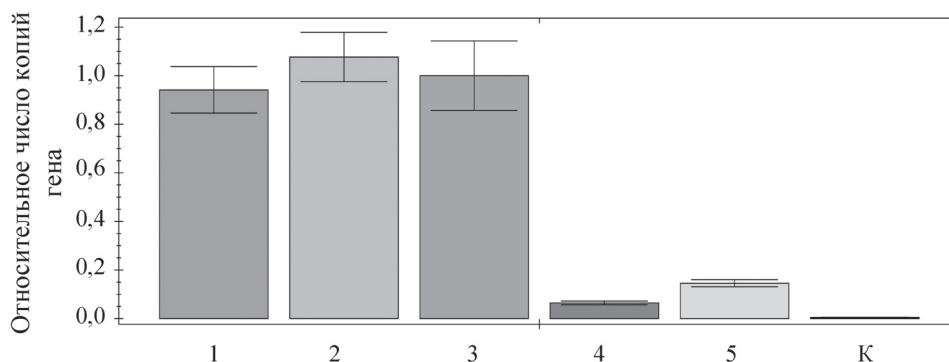


Рис. 4. Относительное число копий гена *cas9* в трансформантах (1–5) и в реципиентном штамме (К)

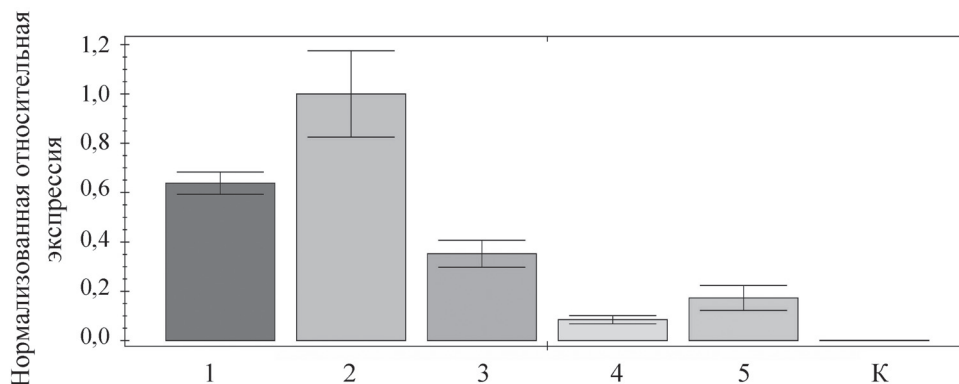


Рис. 5. Относительный уровень транскрипции гена *cas9* в трансформантах (1–5) и в реципиентном штамме (К)

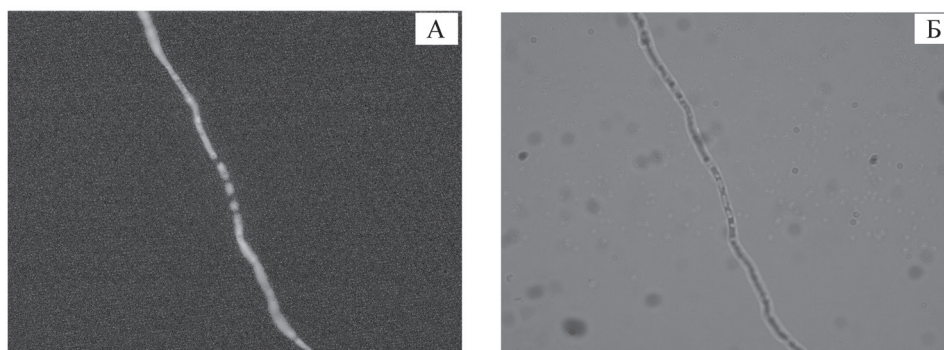


Рис. 6. Флюоресцентная микроскопия (А) и микроскопия в проходящем свете (Б) растущего мицелия штамма I

не наблюдалось флюоресценции, локализуемой в ядрах мицелия (данные не представлены).

Таким образом, применение методов генетической инженерии позволило получить химерную форму Cas9::eGFP, экспрессия которой в ядрах мицелия позволяет говорить о базовой экспрессии Cas9 нуклеазы, что является важным методологическим шагом при разработке системы редактирования генома гриба *Penicillium verrucosum*. Полученный результат показывает потенциальную возможность доставки комплекса Cas9–sgRNA для специфического расщепления ДНК и делеции целевых генов. Например, удаление гена *cbhI*, который кодирует основной фермент целлюлолитического комплекса, секретируемого грибом *P. verrucosum*, с использованием системы CRISPR/

Cas9 позволит получить новую серию реципиентных штаммов *P. verrucosum* *cbhI niaD*, что даст возможность экспрессировать новые рекомбинантные белки без примесей целлюлогидролазы I. Другим направлением использования системы CRISPR/Cas9 может стать редактирование генома *P. verrucosum*, позволяющее провести нокаут генов-активаторов транскрипции, которые отвечают за экспрессию отдельных групп генов, в ответ на используемый источник углерода, или гена-активатора протеиназ, что предположительно повысит уровень экспрессии целевых белков.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-07070).

Конфликта интересов нет.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Esvelt K.M., Wang H.H. // *Molecular Systems Biology*. 2013. Vol. 9. P. 641.
2. Tan W.S., Carlson D.F., Walton M.W., Fahrenkrug S.C., Hackett P.B. // *Advances in Genetics*. 2012 Vol. 80. P. 37.
3. Ruet P., Smih F., Jasin M. // *Mol. Cell Biol*. 1994. Vol. 14. P. 8096.
4. Sontheimer E. J., Barrangou R. // *Human Gene Therapy*. 2015. Vol. 26. P. 413.
5. Liu R., Ling C., Jiang Y., Zhou Z., Zou G. // *Cell Discov*. 2015. Vol.12. N 1. P. 15007.
6. Rantasalo A., Vitikainen M., Paasikallio T., Jääntti J., Landowski C. P., Mojzita D. // *Scientific reports*. 2019. Vol. 9. P. 5032.
7. Nødvig C.S., Nielsen J.B., Kogle M.E., Mortensen U.H. // *PLOS One* 2015. Vol. 10. N 7. P. e0133085.
8. Zheng X., Zheng P., Zhang K., Cairns T. C., Meyer V., Sun J., Ma Y. // *ACS Synth. Biol*. 2018. Vol. 8. N 7. P. 1568.
9. Pohl C., Kiel J.A.K.W., Driessen A.J.M., Bovenberg R.A.L., Nygard Y. // *ACS Synth. Biol*. 2016. Vol. 5. P. 754.
10. Morozova V. V., Gusakov A.V., Andrianov R.M., Pravilnikov A.G., Osipov D.O., Sinitsyn A.P. // *Biotechnol. J*. 2010. Vol. 5. P. 871.
11. Пат. РФ № 2378372 от 10.01.2010.
12. Чулкин А.М., Кислицин В.Ю., Зоров И.Н., Синицын А.П., Рожкова А.М. // *Биотехнология*. 2019. Т. 35. № 5. С. 51.
13. Siebert P.D., Chenchik A., Kellogg D.E., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A. // *Nucleic Acids Res*. 1995. Vol. 23. N 6. P. 1087.
14. Dingwall C., Robbins J., Dilworth S.M., Roberts B., Richardson W.D. // *J. Cell Biology*. 1988. Vol. 107. N 3. P. 841.
15. Осунов Д.О., Рожкова А.М., Матыс В.Ю. и др. // *Катализ в промышленности*. 2010. № 5. С. 63.
16. Unkles S.E., Campbell E.I., Punt P.J., Hawker K.L., Contreras R., Hawkins A.R., Van den Hondel C.A., Kinghorn J.R. // *Gene*. 1992. Vol. 111. N 2. P. 149.
17. Dotsenko G.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Korotkova O.G., Sinitsyn A.P. // *Process Biochemistry*. 2015. Vol. 50. P. 1258.
18. Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E.J., Wu X., Shalem O., Cradick T.J., Marraffini L.A., Bao G., Zhang F. // *Nat. Biotechnol*. 2013. Vol. 31. P. 827.

Поступила в редакцию 10.01.2020

Получена после доработки 12.01.2020

Принята к публикации 20.01.2020

## EXPRESSION OF CAS9 NUCLEASE OF CRISPR/CAS GENOME EDITING SYSTEM IN FILAMENTOUS FUNGI *Penicillium verruculosum*

V.Yu. Kislitsin<sup>1</sup>, A.M. Chulkin<sup>1</sup>, I.G. Sinelnikov<sup>1</sup>, A.P. Sinitsyn<sup>1,2</sup>, A.M. Rozhkova<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences; <sup>2</sup> Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; \*e-mail: amrojkova@mail.ru)

The *cas9* gene of the *Streptococcus pyogenes* bacterium, which encodes second-class CRISPR / Cas system Cas9 nuclease, was expressed in filamentous fungus *Penicillium verruculosum* under the control of the constitutive autologous promoter of the *gpdA* gene encoding glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, which was cloned and sequenced at the first time in the this work. The functionality of the *gpdA* promoter was confirmed by expression of the heterologous *Aspergillus niger*  $\beta$ -glucosidase in *P. verruculosum*. The relative copy number and expression level of the *cas9* gene in recombinant strains was counted by real-time PCR. To detect the localization of Cas9 nuclease in *P. verruculosum* fungal cells a fluorescent eGFP protein was added to the C-terminus of Cas9 and the chimeric nuclease was expressed. Fluorescence microscopy of growing mycelium confirmed the intracellular expression of the chimeric construct in cells of recombinant strains.

**Key words:** genome editing, *Penicillium verruculosum*, *gpdA* promoter.

**Сведения об авторах:** Кислицин Валерий Юрьевич – мл. науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (kislitsin.val@gmail.com); Чулкин Андрей Михайлович – науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. биол. наук (zcbm1@yandex.ru); Синельников Игорь Геннадиевич – мл. науч. сотр., аспирант лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (sinelnikov.i@list.ru); Синецын Аркадий Пантелеймонович – зав. лаб. физико-химии ферментативной биотрансформации полимеров химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, зав. лаб. биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, докт. хим. наук, профессор (apsinitsyn@gmail.com); Рожкова Александра Михайловна – ст. науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (amrojkova@yahoo.com).