

МУТАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ УГЛЕРОДНОЙ КАТАБОЛИТНОЙ РЕПРЕССИИ У МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *Penicillium canescens*

© 2011 г. А. М. Чулкин*, Е. А. Вавилова, С. В. Беневоленский

Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, Москва, 119071

Поступила в редакцию 16.11.2010 г.

Принята к печати 28.01.2011 г.

Штамм мицелиального гриба *Penicillium canescens* F178 – природный продуцент β-галактозидазы и эндо-1,4-β-ксилазазы. Транскрипция генов *bgaS* и *xylA*, кодирующих эти белки, подвержена углеродной катаболитной репрессии. Разработана система прямой селекции штаммов *P. canescens*, мутантных по углеродной катаболитной репрессии. Два мутантных штамма из полученной коллекции детально изучены. Показано, что мутации комплементируются геном *creA*, кодирующим глобальный регулятор углеродной катаболитной репрессии в мицелиальных грибах, и имеют тип “сдвиг рамки считывания” в С-домене CreA. Ген *xylA* дерепрессирован в мутантах на уровне транскрипции в присутствии D-глюкозы. Транскрипция самого гена *creA* в мутантах также дерепрессирована, что подтверждает эффект авторегуляции для этого гена.

Ключевые слова: мицелиальный гриб, *Penicillium canescens*, углеродная катаболитная репрессия, *creA*.

THE MUTATIONAL ANALYSIS OF CARBON CATABOLITE REPRESSION IN FILAMENTOUS FUNGUS *PENICILLIUM CANESCENS*, by A. M. Chulkin*, E. A. Vavilova, S. V. Benevolensky (Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia, *e-mail: zcbm1@yandex.ru). *Penicillium canescens* strain F178 is a natural producer of β-galactosidase and endo-1,4-β-xylanase. The transcription of genes *bgaS* and *xylA*, coding for these proteins, is subject to carbon catabolite repression. The system for selective isolation of regulatory mutants in *P. canescens* is developed. Two strains from the mutant collection are studied in details. It is shown that both mutations can be complement by *creA* gene of *P. canescens*, encoding global regulator of carbon catabolite repression in filamentous fungi. *creA*⁻ alleles contain frameshift mutations in C-domain of CreA. Gene *xylA* is derepressed in mutants at transcription level in the presence of D-glucose. A transcription of *creA* gene in mutants is also derepressed proving effect of autoregulation for this gene.

Keywords: filamentous fungi, *Penicillium canescens*, carbon catabolite repression, *creA*.

Углеродная катаболитная репрессия (УКР) – это механизм, который позволяет организмам осуществлять последовательную утилизацию источников углерода, начиная с наиболее предпочитаемых (быстро утилизируемых и энергетически выгодных). Обычно это достигается блокированием синтеза ферментов, вовлеченных в метаболизм менее предпочитаемых источников углерода.

У ряда мицелиальных грибов этот механизм осуществляется, главным образом, репрессором транскрипции CreA. CreA – это белок, который состоит из ДНК-связывающего домена, несущего два цинковых пальца класса Cys2His2, поли(Ala)-области и С-концевого домена.

Впервые ген *creA* клонирован [1] и секвенирован [2] из мицелиального гриба *Aspergillus nidulans*. Затем такие же гены-репрессоры были найдены в гри-

бах *A. niger* [3, 4], *Trichoderma reesei* [5–7], *Sclerotinia sclerotiorum* [8], *Humicola grisea* [9], *Gibberella fujikuroi*, *Botrytis cinerea* [10], и *Neurospora crassa* [11] и других.

Получено множество мутантных аллелей гена *cre* из гриба *A. nidulans* [12–20]. Они подразделяются на две группы. Часть аллелей содержат смысловые мутации в области цинковых пальцев, которые влияют на степень связывания CreA с *cis*-регулирующими областями. Другая группа включает аллели, содержащие нонсенс-мутации и мутации сдвига рамки, которые приводят к укорачиванию белка CreA [21–23]. Эти аллели показывают неиерархическую гетерогенность к дерепрессии различных систем. Например, смысловая мутация *creA30* приводит к сильной дерепрессии *alc*-системы – в отличие от нонсенс-мутации *creA220*. Обратная ситуация наблюдается в случае дерепрессии системы ферментов, ответственных за утилизацию пролина [21, 22].

* Эл. почта: zcbm1@yandex.ru

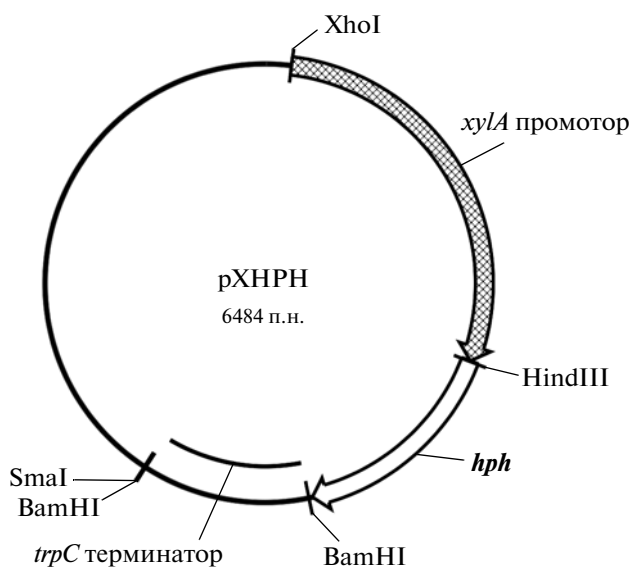


Рис. 1. Карта плазмиды рХНРН. Указаны промотор гена *xylA* *P. canescens*, кодирующая область гена *hph* *E. coli*, терминатор транскрипции гена *trpC* *A. nidulans* и использованные сайты рестрикции.

При анализе мутации *creA322* показано, что небольшой регион в С-концевом домене CreA содержит последовательность, необходимую для CreA-репрессии. В штамме *A. nidulans*, несущем аллель *creA322*, в белке CreA которого недостает 80 С-концевых аминокислот, углеродная катаболитная чувствительность менее выражена во многих системах: например, в системах генов, вовлеченных в утилизацию ацетамида, L-пролина, этилового спирта и крахмала, а также в присутствии D-глюкозы [22]. Мутант с делецией $\Delta creA$ обладает фенотипом, подобным тем, которые возникают при многих мутациях, приводящих к укорочению CreA [22]. При этом смысловая мутация *creA306* в области ДНК-связывающего домена приводит к более характерному фенотипу, чем определяемому аллелем $\Delta creA$. Мутант имеет компактную морфологию, медленно растет, и степень его дерепрессии высока. Это единственная известная мутация, которая позволяет синтезировать полноразмерный белок CreA, у которого нет какой-либо ДНК-связывающей способности [22].

В мицелиальном грибе *A. nidulans* обнаружены мутации в генах *creB* и *creC*, которые определяют фенотипы, сходные с фенотипами при мутациях гена *creA* [24]. CreB — это отщепляющий убиквитин фермент, а CreC — WD40-белок, образующий комплекс с CreB [25–28]. Таким образом, вполне вероятно, что отщепление убиквитина играет какую-то роль в механизме углеродной катаболитной репрессии [29].

Мутации в гене *creD* супрессируют некоторые фенотипы мутаций генов *creB* и *creC* [24, 30]. Показано,

что белок CreD взаимодействует с убиквитинлигазой НЕСТ (homologous to E6-AP carboxyl terminus) (HulA) [30]. Мутации в гене *acrB* также супрессируют некоторые фенотипы мутаций генов *creB* и *creC* [31]. Это означает, что белок AcrB тоже может быть участником пути убиквитинирования. Хотя компоненты убиквитинирования и отщепления убиквитина определены, мишени их действия неизвестны. Возможно, количество или активность CreA также регулируется убиквитинированием [29].

Штамм *Penicillium canescens* F178 (ВКПМ) — природный продуцент β -галактозидазы (ЕС 3.2.1.23) и эндо-1,4- β -ксилазазы (ЕС 3.2.1.8), кодируемых генами *bgaS* и *xylA* соответственно [32, 33]. Анализ регуляции этих генов показал, что их экспрессия подвержена УКР D-глюкозой [34–36]. В то же время, она индуцируется L-арабитолом и его предшественником в системе метаболизма L-арабинозы [34–36] и, в меньшей степени, D-ксилозой для гена *xylA*. Показано, что штамм мутантен по гену L-арабитолдегидрогеназы и накапливает L-арабитол внутри клетки, вследствие чего данный штамм не может использовать их в качестве источников углерода [35].

Ранее клонировали и охарактеризовали ген *creA* мицелиального гриба *P. canescens*. Определены сайты связывания белка CreA в промоторах генов *bgaS*, *xylA* и *creA* [36].

Цель настоящей работы — изучение УКР у мицелиального гриба *P. canescens* с использованием мутационного анализа. Разработана система селективного отбора таких мутантов. Получены индуцированные *creA*-мутанты, в которых происходит синтез эндо-1,4- β -ксилазазы, а также транскрипция генов *xylA* и *creA*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы микроорганизмов. Использовали штамм *P. canescens* F178 (ВКПМ) и его мутант по гену нитратредуктазы (*niaD*⁻) PCA-10 [37]. Для конструирования плазмид использовали штамм *Escherichia coli* XL-10 Gold (“Stratagene”, США).

Методика протопластирования и трансформации штамма PCA-10 описаны ранее [37].

Среды и условия культивирования. Среду MM [38] без источника углерода и азота использовали как основу для приготовления жидких и агаризованных сред для культивирования штаммов грибов. В качестве источника углерода использовали либо 50 мМ D-глюкозу, либо 50 мМ D-ксилозу, источника азота — 10 мМ NH₄Cl. L-арабиноза (5 мМ) выполняла роль индуктора.

Гриб культивировали при 30°C. Ферментации проводили в 100 мл среды в колбах-качалках (750 мл) на орбитальной качалке (250 об/мин). В колбы засевали споры из расчета 4 × 10⁷ спор на 100 мл среды.

Плазмиды и плазмидные векторы. Использовали pAN7-1 [39], pBluescript KSII(+), pUC57 (“Fermentas”, Канада).

Выделение и очистку ДНК, расщепление рестриктазами, лигирование, электрофорез ДНК в агарозном геле и другие генно-инженерные манипуляции проводили по стандартным протоколам [40].

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). РНК выделяли, используя RNeasy MiniKit (“QIAGEN”, Германия). Перед обратной транскрипцией препараты РНК обрабатывали ДНКазой I, свободной от РНКаз (“Fermentas”). Для получения кДНК использовали набор RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (“Fermentas”) с Oligo(dT)₁₈ праймером. Для амплификации использовали комплект реагентов для ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I (“Компания СИНТОЛ”, Россия) и прибор Bio-Rad CFX 96 (“Bio-Rad Laboratories”, США), используя следующие праймеры:

PCRTCRED:

5'-TCGGATGAGTTGACTCGTCACTCG-3';

PCRTCRRER:

5'-TGAGAAACAGGCGCAGATCGAGTA-3';

PCRTGPDD:

5'-CACTTGAAGGGTGGTGCCAAGAA-3';

PCRTGPDR:

5'-ATCAGACCCTCAACGAGACCGAAG-3';

PCRTXYLD:

5'-GCGCAACAGCGTCTTCTACAATGT-3';

PCRTXYLR:

5'-AATACCAGCGGCAAGCCACTTCT-3'.

Программа ПЦР-РВ: 95°C – 5 мин; 95°C – 30 с; 60°C – 1 мин, 40 циклов.

Использовали программное обеспечение Bio-Rad CFX Manager v.1.6.541.1028 (“Bio-Rad Laboratories”).

Мутагенез. 2 × 10⁵ спор обрабатывали ультрафиолетовым светом (УФ) до выживаемости 10% и высевали на селективную агаризованную среду.

Активность эндоксилаз определяли, используя окрашенный субстрат ксилана Blue Xylan (BX) (“BioChemika” 95588) [41]. Для этого к 50 мкл культуральной жидкости в соответствующем разведении добавляли 0.45 мл раствора, содержащего BX (5 мг/мл) в 0.05 М Na-ацетатном буфере, pH 5.0, и инкубировали в течение 10 мин при 50°C, после чего добавляли два объема (1 мл) охлажденного этанола и перемешивали. Пробы инкубировали 15 мин при –20°C, затем центрифугировали в течение 5 мин при 10000 g. Оптическую плотность измеряли против контроля (дистиллированная вода) на фотоэлектрическом колориметре при длине волны 610 nm.

Сравнительный анализ мутантов и штамма дикого типа при росте на агаризованной среде в условиях “ИР”

Штамм	Рост на среде с гигромицином В *	Активность β-галактозидазы **	Активность эндоксилаз ***
РСА-10-4	–	–	–
РСА-10-4/І-1	+	++	++
РСА-10-4/І-3	+++	+	++
РСА-10-4/І-5	+	++	++
РСА-10-4/І-6	++	+++	+
РСА-10-4/І-7	+++	+++	+++
РСА-10-4/І-9	++	+	++
РСА-10-4/І-10	+++	++	+
РСА-10-4/ІІ-3	+++	++	+
РСА-10-4/ІІ-9	++	++	++
РСА-10-4/ІІ-10	++	+	+++
РСА-10-4/ІІ-16	++	+	++
РСА-10-4/ІІ-29	+++	+++	+++
РСА-10-4/ІІ-31	+++	+	++
РСА-10-4/ІІ-33	+	+++	+

* Диаметр колонии в присутствии гигромицина В (1200 мкг/мл).

** Диаметр окрашенной зоны в присутствии X-gal (20 мкг/мл).

*** Диаметр зоны просветления при чашечном тесте на активность эндоксилаз.

Для корреляции с международными единицами активности эндоксилаз строили калибровочную кривую, сравнивая оптическую плотность с активностью очищенного препарата эндо-1,4-β-ксилазы XylA *P. canescens*, которую определяли по количеству восстанавливающих сахаров, выделяемых при гидролизе ксилана. За единицу активности принимали количество фермента, высвобождающее 1 мкмоль/мин восстанавливающих сахаров в данных условиях.

Для качественной оценки активности эндоксилаз на чашках штаммы высевали уколом на агаризованную среду и выращивали 24 ч при 30°C, после чего заливали верхний слой расплавленной 0.5%-ной агарозой в 0.1 М Na-ацетатном буфере, pH 5.0, содержащем 1% ВХ. После инкубации в течение 2–4 ч при 37°C активность эндоксилаз оценивали по размеру зоны просветления.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение мутантов по углеродной катаболитной репрессии *P. canescens*

Как указано выше, экспрессия генов *xylA* и *bgaS* в штамме F178 *P. canescens* подвержена репрессии D-глюкозой и индуцируется L-арабинозой, которая служит лишь индуктором, не являясь источником углерода. Незначительная индукция экспрес-

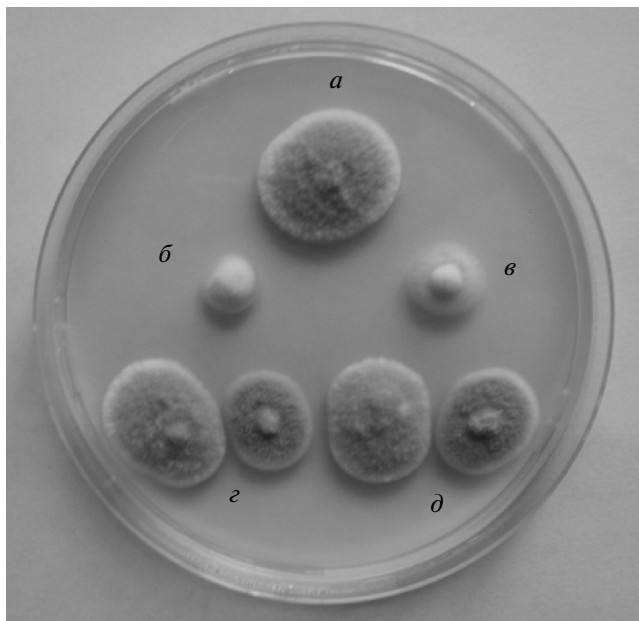


Рис. 2. Комплементационный тест мутантных штаммов. *а* – Штамм дикого типа РСА-10-4; *б* – мутант РСА-10-4/II-29; *в* – мутант РСА-10-4/I-7; *г, д* – штаммы, комплементированные геном *creA* мутантных штаммов.

сии гена *хyIA* происходит и при росте на утилизируемой D-ксилозе.

Исходя из этого, для роста в условиях репрессии генов *хyIA* и *bgas* (обозначена “Р”) выбрана среда с глюкозой, в условиях индукции гена *хyIA* (обозначена “И”) – с ксилозой и арабинозой, в условиях индукции и репрессии, одновременно, генов *хyIA* и *bgas* (“ИР”) – с глюкозой и арабинозой.

Для получения мутантных по УКР гена *хyIA* штаммов сконструировали экспрессионную плазмиду рХНРН, несущую ген *hph* гидромицин-В-фосфотрансферазы *E. coli*, которая обеспечивает устойчивость к антибиотику гидромицину В, и терминатор гена *trpC A. nidulans* из плазмиды рАН7-1 под контролем промотора гена *хyIA P. canescens* (рис. 1). Плазмиду вводили в геном штамма *P. canescens* РСА-10 путем трансформации. Трансформанты отбирали на селективной среде, содержащей гидромицин В (1000 мкг/мл) в условиях “И”.

Трансформанты проверяли на наличие и функционирование плазмиды путем посева на агаризованную среду с гидромицином В (1200 мкг/мл) в условиях “И”, “Р” и “ИР”. Один из трансформантов (РСА-10-4), растущий на среде с гидромицином В в условиях “И” (НМ^R) и не растущий в условиях “Р” и “ИР” (НМ^S), был выбран как дикий тип для получения мутантов.

После мутагенеза споры выбранного штамма высевали на агаризованную среду, содержащую гидромицин В (1000 мкг/мл) и X-gal (20 мкг/мл) в усло-

вия “ИР”. Получено около 150 клонов, имеющих фенотип НМ^R. В 14 из них определялась активность β-галактозидазы, тестируемая по окрашиванию агаризованной среды в синий цвет. Эти клоны проверяли на активность эндоксилаз в условиях “ИР”, используя чашечный тест. Результаты скрининга отобранных мутантов представлены в таблице.

Мутантные штаммы и штамм дикого типа проверяли на устойчивость к гидромицину В и на активность β-галактозидазы на среде “Р”. В этих условиях все штаммы обладают фенотипом НМ^S, а β-галактозидаза в них не синтезируется. Это свидетельствует о необходимости присутствия индуктора экспрессии генов *хyIA* и *bgas* даже в мутантах по УКР.

Два мутантных штамма (РСА-10-4/I-7 и РСА-10-4/II-29) выбраны для дальнейшего анализа. Они обладают измененной морфологией, их компактный рост и спорообразование замедлены.

Анализ мутации в штаммах

Мутантные штаммы трансформировали плазмидой рССгеА [36], содержащей полноразмерный ген *creA P. canescens*. У трансформантов наблюдается реверсия морфологии к дикому типу (рис. 2). На основании этого комплементационного теста можно утверждать, что оба штамма несут мутацию в гене *creA*.

Для детального анализа мутаций амплифицировали и секвенировали ПЦР-фрагменты кодирующих областей гена *creA* мутантных штаммов РСА-10-4/I-7 и РСА-10-4/II-29. В нуклеотидных последовательностях имеются точечные мутации типа “сдвиг рамки” с делецией одного нуклеотида в позиции +468 в мутанте РСА-10-4/I-7 и в позиции +609 в мутанте РСА-10-4/II-29, что приводит к изменению С-конца белка СгеА. Выравнивание транслированных нуклеотидных последовательностей представлено на рис. 3.

Анализ транскрипции генов *хyIA* и *creA* в мутантных штаммах

Для изучения транскрипции генов *хyIA* и *creA* штаммы *P. canescens* РСА-10-4, РСА-10-4/I-7 и РСА-10-4/II-29 выращивали в условиях “ИР”. При достижении концентрации глюкозы в среде 30–40 мМ мицелий собирали фильтрованием для выделения РНК, которую переводили в форму кДНК и использовали для ПЦР-РВ в трех повторностях для каждой пробы. Транскрипцию генов *хyIA* и *creA* определяли относительно конститутивной транскрипции гена *gpdA* глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы *P. canescens* (GenBank, Acc. no. GQ996946.1). Результаты представлены на рис. 4. Как видно, в мутантных штаммах РСА-10-4/I-7 и РСА-10-4/II-29 значительно увеличена транскрипция гена *хyIA*; уве-

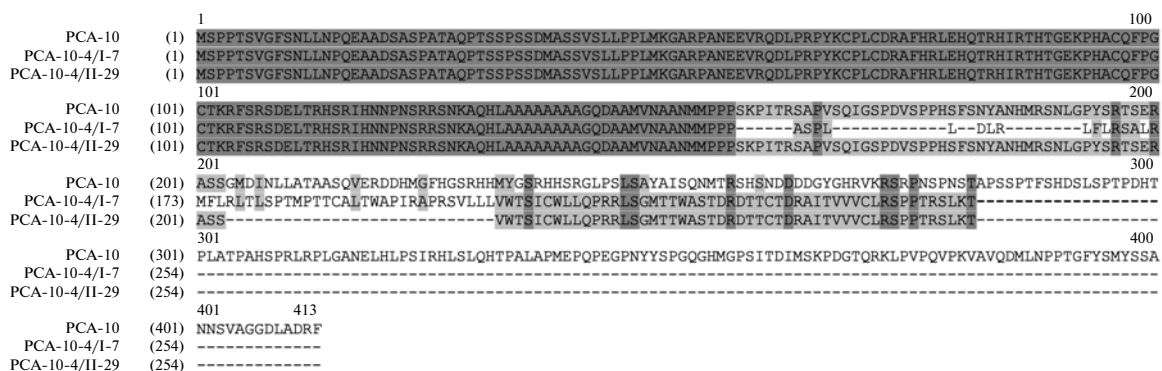


Рис. 3. Выравнивание транслированных нуклеотидных последовательностей генов *creA* штаммов PCA-10, PCA-10-4/I-7 и PCA-10-4/II-29.

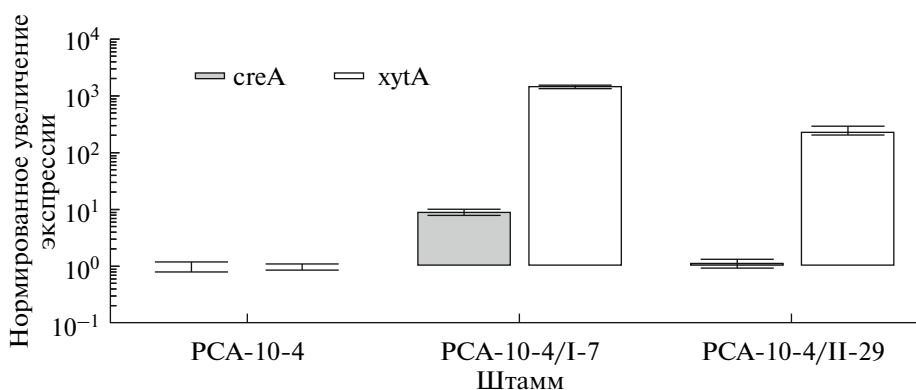


Рис. 4. Анализ экспрессии генов *xylA* и *creA* в штаммах PCA-10-4, PCA-10-4/I-7 и PCA-10-4/II-29 в условиях “ИР”, нормированной к реципиентному штамму PCA-10-4.

личена также транскрипция мутантных аллелей гена *creA*.

Анализ продукции эндоксилазы

Штаммы PCA-10, PCA-10-4/I-7 и PCA-10-4/II-29 выращивали в условиях “ИР”, после чего измеряли активность эндоксилазы, остаточный сахар в культуральной жидкости и сухой вес мицелия. Из полученных данных (рис. 5) видно, что глюкоза — репрессирующий источник углерода для эндоксилазы в штамме дикого типа, а в мутантных штаммах репрессия глюкозой сильно ослаблена или не наблюдается вовсе.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, получена серия мутантных по УКР штаммов мицелиального гриба *P. canescens*, и два мутанта, имеющие наиболее отчетливый фенотип, проанализированы детально.

Обычно мутанты по УКР получают, используя систему отбора на не утилизируемом аналоге D-глюкозы (2-дезоксид-глюкозе) в присутствии дру-

го источника углерода. Однако при этом выявляются, в основном, мутанты, устойчивые к 2-дезоксид-глюкозе, и не являющиеся мутантами по УКР. В зависимости от дополнительного источника углерода, мутации, как правило, приводят к дерепрессии отдельных систем, например, системы утилизации пролина при добавлении L-пролина в селективную среду, либо *alc*-системы при добавлении этанола [21, 22].

Нами получены мутанты путем использования системы прямой селекции по устойчивости к гигромицину В в условиях индукции и репрессии гена *xylA* эндо-1,4-β-ксилазы одновременно. Для этого исследовали плазмидную конструкцию, несущую ген устойчивости к гигромицину В под контролем индуцируемого L-арабитолом и репрессируемого D-глюкозой промотора гена *xylA* эндо-1,4-β-ксилазы. Помимо мутантов, устойчивых к гигромицину В, получены мутанты по УКР. Эта система не привязана к утилизации альтернативного источника углерода и позволяет проводить прямой отбор мутантов при снятии репрессии используемого промотора (в нашем случае — промотор гена *xylA*).

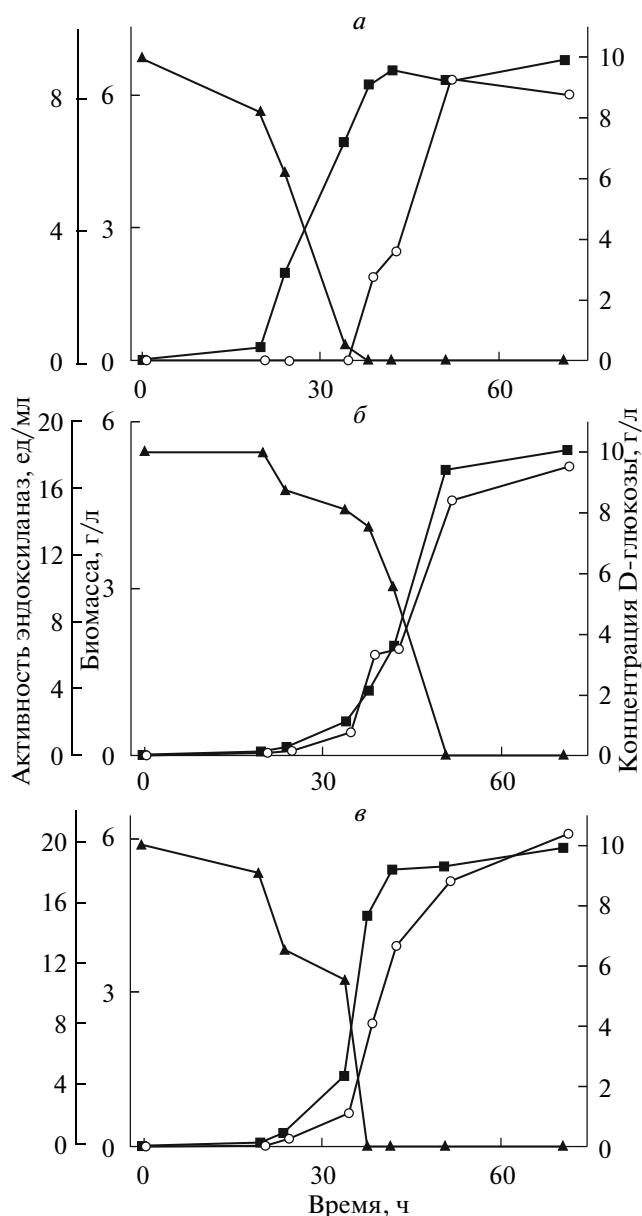


Рис. 5. Рост штамма дикого типа PCA-10-4 (а), мутантов PCA-10-4/I-7 (б) и PCA-10-4/II-29 (в) в условиях “ИР”. —■— Биомасса; —▲— концентрация D-глюкозы; —○— активность эндоксилаза.

УКР в мицелиальных грибах осуществляется, главным образом, репрессором транскрипции CreA. В мицелиальном грибе *A. nidulans* также обнаружены гены *creB*, *creC*, *creD*, *acrB*, которые вовлечены в этот процесс. Нами показано, что полученные мутации в двух исследованных штаммах обусловлены изменениями в гене *creA*. Трансформация интактным геном *creA* приводит к полной комплементации мутаций и к возвращению дикого фенотипа *P. canescens*. При секвенировании кодирующей области *creA* обнаружены точечные мутации типа

“сдвиг рамки считывания”, которые приводят к изменениям в С-домене CreA мутантных штаммов, не затрагивая ДНК-связывающий домен. Тот факт, что оба штамма имеют мутации в гене *creA*, можно объяснить тем, что их селекция проводилась с использованием сразу двух контрольных генов — *bgaS* и *xyIA*, но не исключено, что размер выборки был недостаточно велик. Показано, что изменение УКР этих генов в полученных мутантах не затрагивает их индукцию.

Анализ транскрипции генов в условиях “ИР” дикого и мутантного типов методом ПЦР-РВ показал, что в мутантных штаммах значительно увеличивается (до 1400 раз в штамме PCA-10-4/I-7) синтез транскрипта гена *xyIA*, что и ожидалось, исходя из метода селекции. Одновременно с этим увеличивается количество транскрипта гена *creA*.

В мицелиальных грибах *A. nidulans* и *T. reesei* гены *creA* (*creI*) авторегулируются и транскрибируются на более низких уровнях в условиях репрессии — по сравнению с дерепрессирующими условиями [24], тогда как в *A. chrysogenum* и *S. sclerotiorum* транскрипция генов *creA* (*creI*) положительно скоррелирована с внеклеточной концентрацией глюкозы [42, 43]. Таким образом, существуют различия в регуляции транскрипции *creA* и его гомологов в *T. reesei* и *A. nidulans*, с одной стороны, и в *A. chrysogenum* и *S. sclerotiorum*, с другой [29].

Данные о транскрипции *creA* в мутантных штаммах показывают, что в *P. canescens* имеет место авторегуляция гена *creA*. Эти данные совпадают с ранее полученными нами данными по регуляции этого гена [36], когда транскрипция *creA* в условиях дерепрессии вырастает в 14–26 раз по сравнению с репрессией в присутствии 50 мМ глюкозы. Таким образом, значительное увеличение транскрипции *creA* в мутанте PCA-10-4/I-7 в 7–11 раз при концентрации глюкозы в среде 30–40 мМ свидетельствует о сильной степени дерепрессии. Различия в степени увеличения транскрипции генов *xyIA* и *creA* можно объяснить различиями в степени изначальной репрессии этих генов в штамме дикого типа. Как показано [36], в промоторе гена *creA* имеется один сайт связывания CreA, а в промоторе гена *xyIA* их четыре.

При ферментации мутантных и реципиентного штаммов в присутствии D-глюкозы наблюдается изменение в кинетике активности эндоксилаза. В случае штамма дикого типа активность проявляется только после полной утилизации D-глюкозы, в то время как у мутантных штаммов рост активности одинаков (для штамма PCA-10-4/I-7), или несколько запаздывает (для штамма PCA-10-4/II-29) по отношению к росту сухого веса мицелия. Это свидетельствует о сильной дерепрессии генов эндоксилаза. Кроме того, активность эндоксилаза у мутантов увеличивается в 2–2.5 раза. Сходная картина наблюдается в мутантах по УКР для эндоксилаза в *A. nidulans* [44].

Результаты нашей работы свидетельствуют о сходстве системы УКР в мицелиальном грибе *P. ca-nescens* и других мицелиальных грибах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (08-04-00471) на базе Центра коллективного пользования Прикладные биотехнологии ИНБИ РАН, а также ГК №16.512.11.2150 в рамках Федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dowzer C.E., Kelly J.M. 1989. Cloning of the *creA* gene from *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression. *Curr. Genetics*. **15**, 457–459.
- Dowzer C.E., Kelly J.M. 1991. Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5701–5709.
- Ruijter G.J., Visser J. 1997. Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiol. Letters*. **151**, 103–114.
- Drysdale M.R., Kolze S.E., Kelly J.M. 1993. The *Aspergillus niger* carbon catabolite repressor encoding gene, *creA*. *Gene*. **130**, 241–245.
- Strauss J., Mach R.L., Zeilinger S., Hartler G., Stöffler G., Wolschek M., Kubicek C.P. 1995. Cre1, the carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei*. *FEBS Letters*. **376**, 103–107.
- Ilmén M., Thrane C., Penttilä M. 1996. The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. *Mol. General Genet.* **251**, 451–460.
- Takashima S., Iikura H., Nakamura A., Masaki H., Uozumi T. 1996. Analysis of Cre1 binding sites in the *Trichoderma reesei* *cbh1* upstream region. *FEMS Microbiol. Letters*. **145**, 361–366.
- Vautard G., Cotton P., Fèvre M. 1999. The glucose repressor CRE1 from *Sclerotinia sclerotiorum* is functionally related to CREA from *Aspergillus nidulans* but not to the Mig proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. **453**, 54–58.
- Takashima S., Nakamura A., Hidaka M., Masaki H., Uozumi T. 1998. Isolation of the *creA* gene from the cellulolytic fungus *Humicola grisea* and analysis of CreA binding sites upstream from the cellulase genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 2364–2370.
- Tudzynski B., Liu S., Kelly J.M. 2000. Carbon catabolite repression in plant pathogenic fungi: isolation and characterization of the *Gibberella fujikuroi* and *Botrytis cinerea* *creA* genes. *FEMS Microbiol. Letters*. **184**, 9–15.
- de la Serna I., Ng D., Tyler B.M. 1999. Carbon regulation of ribosomal genes in *Neurospora crassa* occurs by a mechanism which does not require Cre-1, the homologue of the *Aspergillus* carbon catabolite repressor, CreA. *Fungal Genet. Biol.* **26**, 253–269.
- Arst H.N. Jr., Cove D.J. 1973. Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. General Genet.* **126**, 111–141.
- Bailey C., Arst H.N. Jr. 1975. Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Europ. J. Biochem.* **51**, 573–577.
- Hynes M.J., Kelly J.M. 1977. Pleiotropic mutants of *Aspergillus nidulans* altered in carbon metabolism. *Mol. General Genet.* **150**, 193–204.
- Arst H.N. Jr., Tollervey D., Dowzer C.E., Kelly J.M. 1990. An inversion truncating the *creA* gene of *Aspergillus nidulans* results in carbon catabolite derepression. *Mol. Microbiol.* **4**, 851–854.
- Shroff R.A., Lockington R.A., Kelly J.M. 1996. Analysis of mutations in the *creA* gene involved in carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Canad. J. Microbiol.* **42**, 950–959.
- Shroff R.A., O'Connor S.M., Hynes M.J., Lockington R.A., Kelly J.M. 1997. Null alleles of *creA*, the regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **22**, 28–38.
- Felenbok B., Kelly J.M. 1996. The Mycota III. In: *Biochemistry and Molecular Biology*. Eds Brainbl R., Marzulf G.A. Berlin–Heidelberg–New-York: Springer-Verlag, pp. 369–380.
- Kelly J.M. 1994. Progress in industrial microbiology. In: *Aspergillus: 50 Years On*, vol. 29. Eds Martinelli S.D., Kinghorn J.R. Amsterdam–London–New-York–Tokyo: Elsevier, pp. 355–367.
- van der Veen P., Ruijter G.J., Visser J. 1995. An extreme *creA* mutation in *Aspergillus nidulans* has severe effects on D-glucose utilization. *Microbiol.* **141**, 2301–2306.
- Shroff R.A., Lockington R.A., Kelly J.M. 1996. Analysis of mutations in the *creA* gene involved in carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Canadian J. Microbiol.* **42**, 950–959.
- Shroff R.A., O'Connor S.M., Hynes M.J., Lockington R.A., Kelly J.M. 1997. Null alleles of *creA*, the regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **22**, 28–38.
- Kelly J.M. 2004. The regulation of carbon metabolism in filamentous fungi. In: *Mycota III*. Eds Brambl R., Marzulf G.A. Berlin–Hiedelberg: Springer-Verlag. pp. 385–401.
- Hynes M.J., Kelly J.M. 1977. Pleiotropic mutants of *Aspergillus nidulans* altered in carbon metabolism. *Mol. General Genet.* **150**, 193–204.
- Kelly J.M., Hynes M.J. 1977. Increased and decreased sensitivity to carbon catabolite repression of enzymes of acetate metabolism in mutants of *Aspergillus nidulans*. *Mol. General Genet.* **156**, 87–92.
- Lockington R.A., Kelly J.M. 2001. Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans* involves deubiquitination. *Mol. Microbiol.* **40**, 1311–1321.
- Lockington R.A., Kelly J.M. 2002. The WD40-repeat protein CreC interacts with and stabilizes the deubiquitinating enzyme CreB *in vivo* in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **43**, 1173–1182.
- Todd R.B., Lockington R.A., Kelly J.M. 2000. The *Aspergillus nidulans* *creC* gene involved in carbon catabolite repression encodes a WD40 repeat protein. *Mol. General Genet.* **263**, 561–570.
- Roy P., Lockington R.A., Kelly J.M. 2008. CreA-mediated repression in *Aspergillus nidulans* does not require transcriptional auto-regulation, regulated intrac-

- ellular localisation or degradation of CreA. *Fungal Genet. Biol.* **45**, 657–670.
30. Boase N.A., Kelly J.M. 2004. A role for *creD*, a carbon catabolite repression gene from *Aspergillus nidulans*, in ubiquitination. *Mol. Microbiol.* **53**, 929–940.
 31. Boase N.A., Lockington R.A., Adams J.R.J., Rodbourn L., Kelly J.M. 2003. Molecular characterization and analysis of the *acrB* gene of *Aspergillus nidulans*: a gene identified by genetic interaction as a component of the regulatory network that includes the CreB deubiquitination enzyme. *Genetics*. **164**, 95–104.
 32. Николаев И.В., Епишин С.М., Захарова Е.С., Котенко С.В., Винецкий Ю.П. 1992. Молекулярное клонирование гена секретируемой бета-галактозидазы мицелиального гриба *Penicillium canescens*. *Молекуляр. биология*. **26**, 869–875.
 33. Серебряный В.А., Вавилова Е.А., Чулкин А.М., Винецкий Ю.П. 2002. Клонирование гена эндо-1,4-β-ксилазазы *Penicillium canescens* и получение мультикопийных штаммов. *Прикладная биохимия и микробиология*. **38**, 495–501.
 34. Николаев И.В., Винецкий Ю.П. 1998. L-арабиноза индуцирует синтез секретируемой бета-галактозидазы у мицелиального гриба *Penicillium canescens*. *Биохимия*. **63**, 1294–1298.
 35. Вавилова Е.А., Винецкий Ю.П. 2003. Индукция синтеза эндо-1,4-β-ксилазазы и β-галактозидазы в исходных и рекомбинантных штаммах гриба *Penicillium canescens*. *Прикладная биохимия и микробиология*. **39**, 133–159.
 36. Чулкин А.М., Вавилова Е.А., Беневоленский С.В. 2010. Транскрипционный регулятор углеродной кatabолитной репрессии CreA мицелиального гриба *Penicillium canescens*. *Молекуляр. биология*. **44**, 667–687.
 37. Aleksenko A.Y., Makarova N.A., Nikolaev I.V., Clutterbuck A.J. 1995. Integrative and replicative transformation of *Penicillium canescens* with a heterologous nitrate-reductase gene. *Curr. Genetics*. **28**, 474–477.
 38. Kaminskyj S.G.W. 2001. Fundamentals of growth, storage, genetics and microscopy of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Newsletter*. **48**, 25–31.
 39. Punt P.J., Oliver R.P., Dingemans M.A., Pouwels P.H., van den Hondel C.A. 1987. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene*. **56**, 117–124.
 40. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. 1982. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press.
 41. Chalmers J.H., J.R. 1990. Chromogenic and fluorogenic substrates for assaying xylanases of *Neurospora*. *Fungal Genetics Newsletter*. **37**, 25–31.
 42. Jekosch K., Kuck U. 2000. Loss of glucose repression in an *Acremonium chrysogenum* beta-lactam producer strain and its restoration by multiple copies of the *cre1* gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 556–563.
 43. Jekosch K., Kuck U. 2000. Glucose dependent transcriptional expression of the *cre1* gene in *Acremonium chrysogenum* strains showing different levels of cephalosporin C production. *Curr. Genet.* **37**, 388–395.
 44. Prathumpai W., McIntyre M., Nielsen J. 2004. The effect of CreA in glucose and xylose catabolism in *Aspergillus nidulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 748–753.