

ДИСПЛЕЙ ОЛИГО- α -1,6-ГЛИКОЗИДАЗЫ *Exiguobacterium sibiricum* НА ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК *Escherichia coli*

© 2023 Л.Н. Шингарова^{1*}, Л.Е. Петровская¹, Е.А. Крюкова¹, С.Ш. Гапизов^{1,2},
Д.А. Долгих^{1,2}, М.П. Кирпичников^{1,2}

¹ ФГБУН Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия; электронная почта: lshingarova@gmail.com

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

Поступила в редакцию 02.03.2023

После доработки 03.04.2023

Принята к публикации 04.04.2023

Олиго- α -1,6-гликозидазы широко применяются в биотехнологии для гидролиза крахмала. Клеточный дисплей, основанный на использовании якорных мотивов белков внешней мембраны, позволяет экспонировать целевые пептиды и белки на поверхности микробных клеток, что способствует созданию технологически и экологически оптимальной среды для получения целевого продукта. Ранее нами была получена и охарактеризована рекомбинантная олиго- α -1,6-гликозидаза психротрофной бактерии *Exiguobacterium sibiricum* (EsOgl), демонстрирующая высокую каталитическую активность. Было также показано, что аутоотранспортер AT877 *Psychrobacter cryohalolentis* и его делеционные варианты эффективно экспонируют эстеразу EstPc и 10-й домен фибронектина III-го типа на поверхности клеток *Escherichia coli*. Целью работы явилось получение системы дисплея EsOgl на поверхности бактериальных клеток на основе AT877. Сконструированы гены гибридного аутоотранспортера EsOgl877 и его делеционных мутантов EsOgl877 Δ 239 и EsOgl877 Δ 310. Исследована ферментативная активность EsOgl877 и установлено, что клетки, экспрессирующие этот белок, сохраняли около 90% максимальной активности в температурном диапазоне 15–35 °С. Показано, что активность клеток, содержащих EsOgl877 Δ 239 и EsOgl877 Δ 310, была соответственно в 2,7 и 2,4 раза выше, чем клеток, экспрессирующих полноразмерный АТ. Анализ клеток, экспрессирующих укороченные варианты EsOgl877, после обработки протеиназой К показал, что пассажирский домен во всех случаях локализован на клеточной поверхности. Полученные результаты могут быть использованы для оптимизации систем дисплея олиго- α -1,6-гликозидазы и других гетерологичных белков на поверхности клеток *E. coli*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: секрция, аутоотранспортер, олиго- α -1,6-гликозидаза, бактериальный дисплей.

DOI: 10.31857/S0320972523050147, **EDN:** AZQUAN

ВВЕДЕНИЕ

Крахмалосодержащие культуры составляют важную часть рациона питания и основу для производства различных биотехнологических продуктов при помощи химической и ферментативной обработки. Основным продуктом ферментативной переработки крахмала является глюкозный сироп, конечный выход которого определяется способностью используемых ферментов к эффективной конверсии олигосахаридов крахмала в глюкозу [1, 2].

Крахмал состоит из линейного полисахарида амилозы и амилопектина, цепочки которого соединены между собой α -1,6-связями в точках разветвления. Низкая эффективность гидролиза таких связей ограничивает итоговую концентрацию глюкозы в сиропе. С целью ее повышения используют ферменты, гидролизующие α -1,6-гликозидные связи, в том числе олиго- α -1,6-гликозидазы (ЕС 3.2.1.10), которые принадлежат к 31-му подсемейству 13-го семейства гликозилгидролаз. Эти ферменты широко распространены, в частности,

Принятые сокращения: АТ – аутоотранспортер; EsOgl – олиго- α -1,6-гликозидаза *Exiguobacterium sibiricum*; ¹⁰Fn3 – 10-й домен фибронектина человека III-го типа; PBS – фосфатно-солевой буфер; pNPG – *p*-нитрофенил- α -D-глюкопиранозид.

* Адресат для корреспонденции.

в различных микроорганизмах [3]. Описаны олиго- α -1,6-гликозидазы мезофильных (*Bacillus cereus*, [4]), термофильных и гипертермофильных (*Bacillus coagulans*, *Bacillus thermoglucosidasius* [5, 6]) бактерий. Известно, что использование холодоактивных ферментов обладает рядом преимуществ, в частности, позволяет проводить реакции при более низких температурах [7, 8]. Ранее нами была получена и охарактеризована рекомбинантная олиго- α -1,6-гликозидаза психротрофной бактерии *Exiguobacterium sibiricum* (EsOgl), демонстрирующая высокую каталитическую активность в широком температурном диапазоне, в том числе при низких температурах [9].

Клеточный дисплей, основанный на использовании якорных мотивов белков внешней мембраны, позволяет экспонировать целевые пептиды и белки на поверхности микробных клеток. Перспективы его применения в биотехнологии и промышленности включают разработку живых вакцин, конструирование и скрининг комбинаторных библиотек, а также получение цельноклеточных биокатализаторов [10, 11]. Преимуществом таких биокатализаторов является отсутствие необходимости выделения и очистки целевых ферментов, что существенно снижает их стоимость [12, 13].

В литературе имеются сведения о биокатализаторах, полученных с помощью дисплея на поверхности клеток бактерий и обладающих каталитической активностью в отношении различных полисахаридов [13]. Так, β -амилаза батата была экспонирована на клетках *Escherichia coli* при помощи белка Omp1 внешней мембраны *Zymomonas mobilis* и проявляла активность по отношению к растворимому крахмалу [14]. Комплексный биокатализатор, включающий три фермента *Clostridium cellulolyticum* (эндо- α -глюканазу Cel5A, экзо- α -глюканазу Cel9E и β -глюкозидазу), был сконструирован в результате их объединения с якорным белком PgsA и использован для получения этанола [15]. Аутодисплей β -глюкозидазы BglC *Thermobifida fusca* был достигнут благодаря использованию якорных мотивов AIDA-I и липокалина [16, 17]. Однако нам не удалось обнаружить опубликованных данных о цельноклеточных биокатализаторах, обладающих олиго- α -1,6-гликозидазной активностью.

Одним из популярных якорных мотивов для клеточного дисплея является C-концевой транслокаторный домен белков семейства ауотранспортеров (АТ), обладающий структурой типа β -бочонка [11, 18]. Соответствующий домен ранее охарактеризован нами ауотранспортера AT877 *Psychrobacter cryohalolentis*

был использован для дисплея эстеразы EstPc [19] и 10-го домена фибронектина III-го типа человека ($^{10}\text{Fn3}$) [20, 21]. Мы также предложили подходы для повышения эффективности полученной системы, включая конструирование гибридных пассажирских доменов [20] и использование делеционных вариантов АТ [22]. В данной работе мы поставили задачу сконструировать систему дисплея EsOgl на поверхности клеток *E. coli* на основе AT877.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы реактивы Coomassie R250 («Bio-Rad», США), MgCl_2 («Merck», США), ампициллин и глюкоза («Panreac», Испания), субстрат *p*-нитрофенил- α -D-глюкопиранозид (pNPG; «Sigma», США), компоненты сред для культивирования бактерий, триптон и дрожжевой экстракт («Amresco», США), органические растворители производства «Химмед» (Россия). Растворы готовили на деионизованной воде MilliQ.

Клонирование рекомбинантных ДНК осуществляли стандартными методами в клетках *E. coli* XL-1 Blue («Stratagene», США). Использовали ферменты производства «Thermo Fisher Scientific» (США). Олигонуклеотиды синтезированы фирмой «Евроген» (Россия). Ген *EsOgl* амплифицировали на матрице плазмидной ДНК pET28EsOgl с использованием праймеров 1739f и 1739r [9], обрабатывали *NcoI* и *XhoI*, после чего клонировали ПЦР-фрагмент в вектор, полученный обработкой плазмиды pAT877 [19] рестриктазами *NcoI* и *SalGI*. Для конструирования делеционных вариантов EsOgl877 проводили ПЦР, как описано в работе Shingarova et al. [22]. Фрагменты клонировали в вектор pET20b по сайтам *NcoI* и *XhoI*, аналогично гену исходного белка, и подтверждали последовательность вставки секвенированием («Евроген»).

Выделение мембранной фракции. Культуру штамма *E. coli* C41(DE3), трансформированную одной из плазмид, выращивали в LB с ампициллином (100 мкг/мл) при 37 °C до значения ОП при 560 нм, равного 0,5–0,7, индуцировали добавлением 0,2 мМ изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (IPTG), после чего продолжали культивирование в течение 1,5 ч при 25 °C в присутствии 5 мМ MgCl_2 . Клетки осаждали при 2700 g 10 мин при 5 °C, после чего осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 5 мМ EDTA, 20% сахарозы, лизоцим (0,2 мг/мл), и разрушали ультразвуком. Суспензию центрифугировали 30 мин при 6000 g. Полученный супернатант центрифугиро-

вали 1 ч при 100 000 g и суспендировали осадок мембранной фракции в 50 mM Tris-HCl (pH 8,0).

Вестерн-блот-анализ. Разделенные гелеэлектрофорезом в 10%-ном SDS-ПААГ по методу Лэммли белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad»). После инкубации в растворе 1%-ного BSA в Tris-солевом буфере (TBS, 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0) в течение 1 ч при 37 °C мембрану выдерживали в растворе конъюгата моноклональных антител к His-тагу с пероксидазой (1 мкг/мл; «Invitrogen», США) в 1%-ном BSA в TBS в течение 1 ч при комнатной температуре. Окрашивание мембраны проводили с использованием преципитирующего 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB; «Clinical Science Products», США).

Обработка протеиназой К. Индуцированные клетки C41(DE3), экспрессирующие EsOgl877 или AT877, центрифугировали (3000 g, 15 мин при 4 °C) и промывали дважды 1 мл фосфатно-солевого буфера (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4). После центрифугирования осадки суспендировали в 1 мл буфера, содержащего 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) и 5 mM CaCl₂. Раствор протеиназы К («Qiagen», США) добавляли до конечной концентрации 150 мкг/мл, и суспензию инкубировали в течение 1 ч при 37 °C и перемешивании. Реакцию останавливали добавлением фенол-метилсульфонилфторида (PMSF) до конечной концентрации 5 mM, смеси центрифугировали, дважды промывали PBS и суспендировали в 1,5 мл буфера, содержащего 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) и 200 mM NaCl, после чего выделяли мембранную фракцию клеток, как описано выше.

Иммуноферментный анализ (ELISA). Культуру клеток после индукции осаждали центрифугированием (2700 g 6 мин при 5 °C), дважды промывали PBS с добавлением 5 mM MgCl₂ и центрифугировали при тех же условиях. Доводили мутность суспензии до значения ОП при 560 нм, равного 1, и наносили по 100 мкл в лунки 96-луночного планшета («Costar», США) для ELISA в трех повторностях. Клетки высушивали 20 ч в термостате при 37 °C, блокировали 2%-ным BSA и промывали PBS.

Для анализа экспонированности His-тага использовали конъюгат моноклональных антител к His-тагу с пероксидазой. Конъюгат добавляли в соотношении 1 : 10000 в PBS + 1% BSA, выдерживали 1 ч при 37 °C и перемешивании. После удаления антител промывали лунки 3 раза по 5 мин PBS. После отмывки в лунки добавляли по 100 мкл TMB, выдерживали 4 мин, затем останавливали реакцию добавлением 10%-ной H₂SO₄. Интен-

сивность окрашивания измеряли при 450 нм с помощью ридера Model 680 («Bio-Rad»).

Исследование ферментативной активности EsOgl877 проводили с использованием *p*NPG в качестве субстрата. Клетки после индукции центрифугировали (3000 g, 15 мин при 4 °C) и дважды промывали PBS с добавлением 5 mM MgCl₂. Осадок клеток суспендировали в реакционном буфере. К реакционной смеси (33 mM К-фосфатного буфера (pH 7,0), 0,36 mM субстрата) объемом 0,5 мл добавляли аликвоты очищенного фермента EsOgl (положительный контроль) или клеток. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, экспрессирующие гибридный AT Fn877, не обладающий ферментативной активностью. Смесь инкубировали 15 мин при 25 °C, реакцию останавливали добавлением 100 мкл 1 M Na₂CO₃. После центрифугирования в течение 5 мин в настольной центрифуге по 200 мкл реакционной смеси раскапывали в лунки 96-луночного планшета («Deltalab», Испания). Измеряли величину абсорбции при 405 нм на ридере Multiscan FC («Thermo Fisher Scientific»). За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для высвобождения 1 мкмоль *p*-нитрофенола за 1 мин. Удельную активность определяли как количество единиц активности на 1 мг белка.

Оптимальную температуру реакции определяли путем измерения ферментативной активности при различных температурах (5–35 °C). Реакционную смесь инкубировали при каждой температуре в течение 10 мин, после чего измеряли активность, как описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Конструирование и экспрессия гибридного аутотранспортера EsOgl877. С целью экспонирования целевых белков на поверхности клеток проводят конструирование гибридного гена, кодирующего сигнальную последовательность (для экспорта в периплазматическое пространство), целевой белок и якорный мотив (для закрепления во внешней мембране клеток). В случае систем клеточного дисплея на основе АТ такими мотивами являются альфа-спиральный линкер и транслокаторный домен [11, 18]. Соответственно, для конструирования системы клеточного дисплея ген *EsOgl* был клонирован в вектор, содержащий кодирующие последовательности сигнального пептида PelB, альфа-спирального линкера и транслокаторного домена AT877 под контролем промотора T7lac, аналогично тому, как это

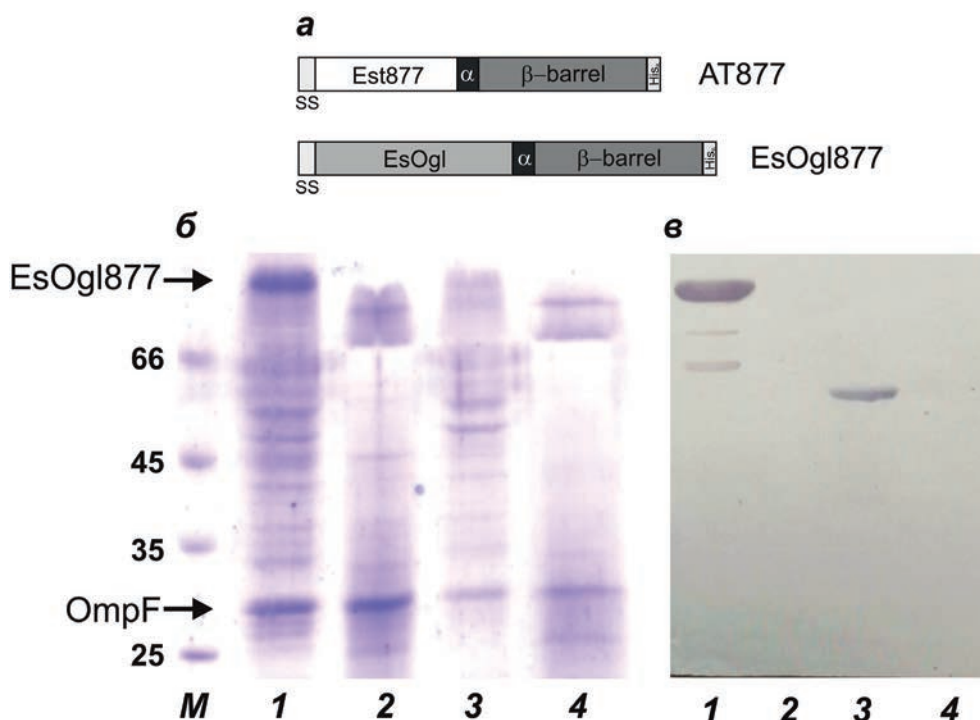


Рис. 1. Экспрессия EsOgl877 в клетках *E. coli*. *а* – Схемы строения AT877 и EsOgl877. Ss – Сигнальная последовательность PelB; α – альфа-спиральный линкер; β-barrel – транслокаторный домен AT877. *б* – Белковый электрофорез в 10%-ном SDS-ПААГ. *в* – Вестерн-блот с анти-His конъюгатом образцов мембранной фракции клеток C41(DE3), экспрессирующих EsOgl877 (дорожки 1 и 2) или AT877 (дорожки 3 и 4); до (дорожки 1 и 3) и после (дорожки 2 и 4) обработки клеток протеиназой К. *М* – маркеры молекулярной массы белков (кДа)

было сделано ранее в случае эстеразы EstPc и ¹⁰F_n3 [19, 20]. Таким образом, был сконструирован ген гибридного АТ EsOgl877, в котором природный пассажирский домен (эстеразу) заменили белком EsOgl (рис. 1, *а*).

Экспрессию полученного гена осуществляли в клетках *E. coli* штамма C41(DE3). Для определения локализации EsOgl877 проводили анализ с помощью белкового электрофореза и Вестерн-блота с антителами к гексагистициновой последовательности. С помощью этих методов установлено, что рекомбинантный белок обнаруживается в мембранной фракции клеток в значительных визуализированных количествах, при этом его электрофоретическая подвижность соответствует расчетной молекулярной массе (~101 кДа; рис. 1, дорожка 1 на панелях *б* и *в*).

Для подтверждения поверхностной экспрессии EsOgl877 клетки после индукции обрабатывали протеиназой К, после чего выделяли мембранную фракцию и анализировали ее аналогичным образом. Подобно клеткам, экспрессирующим другие пассажирские домены, такая обработка приводила к исчезновению полос экспонированного целевого белка, в то время как полосы, соответствующие белку внешней мембраны OmpF, не изменились (рис. 1, дорожка 2 на панелях *б* и *в*).

Ферментативная активность EsOgl877. Олиго-α-1,6-гликозидазную активность EsOgl877 исследовали, инкубируя интактные клетки в буфере с субстратом *p*NPG. Измерения, проведенные при различных температурах, показали, что температурный оптимум фермента, экспонированного на поверхности клеток, состав-

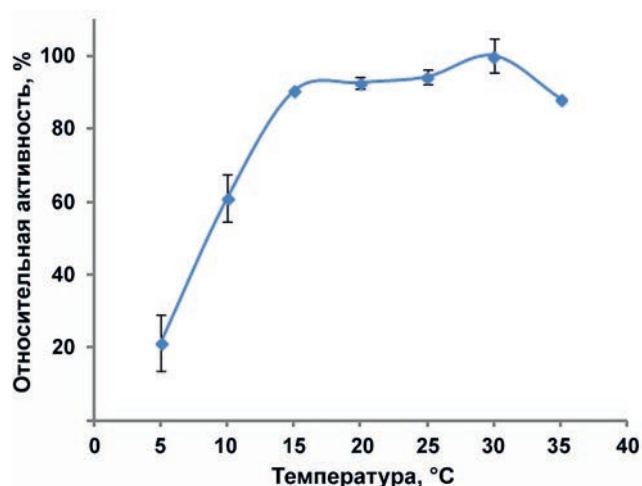


Рис. 2. Зависимость ферментативной активности клеток *E. coli*, экспрессирующих EsOgl877, от температуры. Клетки инкубировали в реакционной смеси, содержащей 33 мМ К-фосфатного буфера (pH 7,0) и 0,36 мМ *p*NPG в течение 15 мин при указанной температуре. Активность при 30 °C принята за 100%. Представлены средние значения трех опытов ± стандартное отклонение

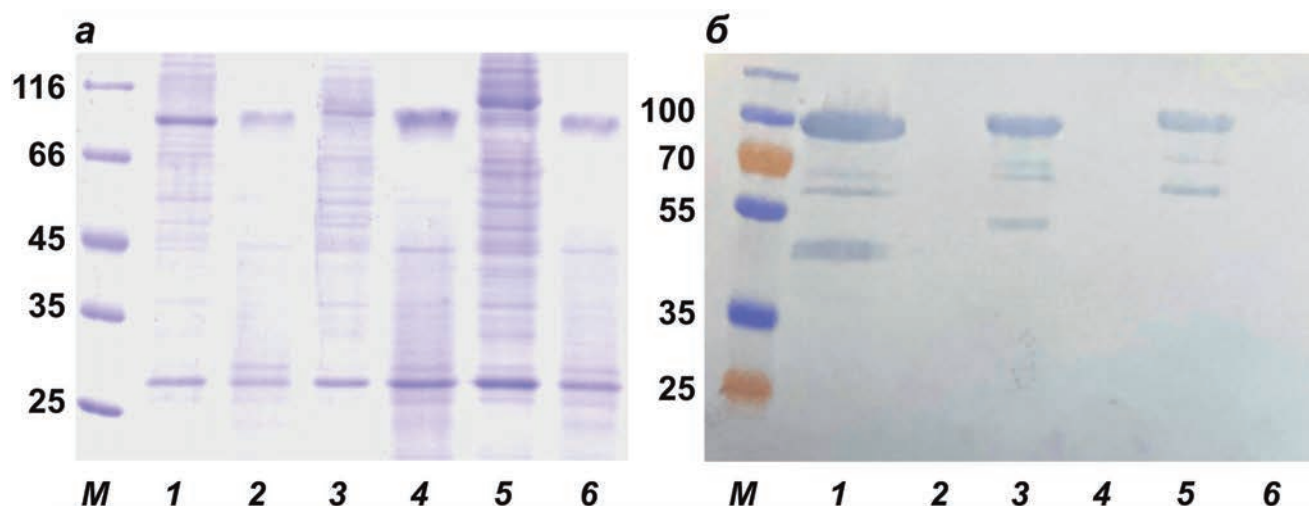


Рис. 3. Белковый электрофорез в 10%-ном SDS-ПААГ (а) и Вестерн-блот с анти-His конъюгатом (б) образцов мембранной фракции клеток C41(DE3), экспрессирующих делеционные варианты EsOgl877. Дорожки 1 и 2 – $\Delta 239$; дорожки 3 и 4 – $\Delta 310$; дорожки 5 и 6 – EsOgl877, до (дорожки 1, 3, 5) и после (дорожки 2, 4, 6) обработки клеток протеиназой К. М – маркеры молекулярной массы белков (кДа)

ляет 30 °С. Клетки, экспрессирующие EsOgl877, сохраняли около 90% ферментативной активности от максимальной (достигаемой при оптимальной температуре) в диапазоне 15–35 °С (рис. 2), что достаточно хорошо совпадает с температурным диапазоном активности исходного фермента EsOgl [9].

Используя ранее полученные данные об удельной активности EsOgl [9], мы смогли примерно оценить число молекул фермента на поверхности одной клетки, которое составило около 14 000.

Оптимизация системы дисплея EsOgl с использованием делеционных вариантов AT877. Ранее нами было показано, что использование делеционных вариантов AT877 позволяет повысить уровень экспонирования пассажирского домена $^{10}\text{Fn3}$ на поверхности клеток *E. coli* [22]. Для оценки возможности использования данного подхода с целью оптимизации системы дисплея EsOgl мы получили два делеционных варианта гибридного аутотранспортера EsOgl877 $\Delta 239$ и EsOgl877 $\Delta 310$, содержащие в составе транслокаторного домена четыре и семь бета-тяжей из двенадцати. Конструирование и экспрессию генов делеционных вариантов EsOgl877 проводили, как было описано ранее для Fn877 [22]. Исследование мембранных фракций клеток *E. coli* с помощью белкового электрофореза и Вестерн-блота с антителами к гексагистидиновой последовательности продемонстрировало, что укороченные варианты гибридного АТ обнаруживаются в мембранной фракции, подобно полноразмерному EsOgl877 (рис. 3, а). Анализ клеток, экспрессирующих укороченные варианты EsOgl877,

после обработки протеиназой К показал, что пассажирский домен во всех случаях локализован на клеточной поверхности (рис. 3, б).

Клетки *E. coli*, экспрессирующие делеционные варианты EsOgl877, демонстрировали олиго- α -1,6-гликозидазную активность по отношению к *p*NPG (рис. 4). При этом удельная активность клеток, содержащих EsOgl877 $\Delta 239$ и EsOgl877 $\Delta 310$, была соответственно в 2,7 и 2,4 раза выше, чем клеток, экспрессирующих полноразмерный АТ. Расчетное число молекул фермента на поверхности одной клетки для них составило соответственно 38 и 34 тысячи. Для подтверждения интактности клеток в процессе эксперимента был проведен их анализ методом ELISA с использованием антител к гексагистидиновой последовательности. Поскольку эта последовательность располагается

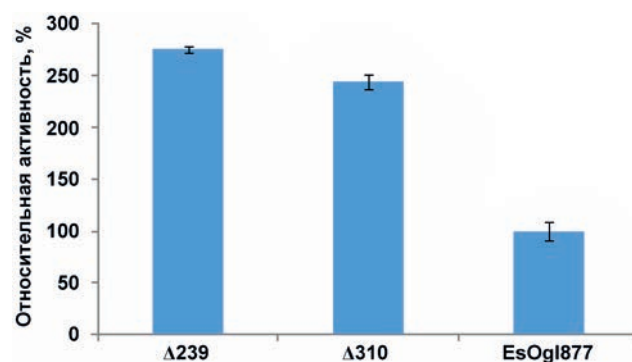


Рис. 4. Сравнительная ферментативная активность клеток C41(DE3), экспрессирующих EsOgl877 и его делеционные варианты, по отношению к *p*NPG. Представлены средние значения трех повторностей $\pm$ относительное стандартное отклонение. Активность клеток, экспрессирующих EsOgl877, принималась за 100%

на С-конце белка, который, предположительно, ориентирован в периплазму, в случае сохранения целостности мембраны она недоступна для связывания специфических антител. Действительно, уровень сигнала, обеспечиваемый клетками с экспрессией полноразмерного EsOgl877 и его делеционных вариантов после обработки лизоцимом или замораживания-оттаивания, оказался примерно в 4 раза выше, чем у клеток, не подвергавшихся такой обработке (данные не приведены), что доказывает отсутствие существенного лизиса.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использование структурных элементов АТ является популярной стратегией для конструирования систем клеточного дисплея [11, 18]. В большинстве случаев природный пассажирский домен АТ может быть заменен целевым белком, который в результате процесса последовательного взаимодействия с компонентами секреторного аппарата клеток и специализированного Bam-комплекса оказывается экспонированным на клеточной поверхности [23, 24]. При этом структура пассажирского домена может оказывать непосредственное влияние на эффективность дисплея. Для природных пассажирских доменов с β -спиральной пространственной структурой (пертактина, EspP и других) установлена зависимость эффективности их экспорта на клеточную поверхность от наличия С-концевого аутошаперона, обладающего повышенной скоростью сворачивания [25–27]. В результате замены N-концевой части пассажирского домена пертактина мутантными вариантами дигидрофолатредуктазы было показано, что мутанты, обладающие меньшей стабильностью, способствуют увеличению эффективности секреции по сравнению с белком дикого типа [27, 28].

Известно, что холодоактивные ферменты обладают пониженной стабильностью, что является следствием особенностей их первичной и пространственной структуры [29–31]. Ранее мы показали, что холодоактивная эстераза EstPc *P. cryohalolentis*, обладающая липолитической активностью в температурном диапазоне 10–35 °С [32], может быть эффективно экспонирована на поверхности клеток *E. coli* с использованием сконструированной нами системы дисплея на основе АТ877 [19]. Кроме того, расположение EstPc на N-конце пассажирского домена позволило повысить уровень секреции ¹⁰Fn3, обладающего более стабильной структурой [20].

В данной работе мы продемонстрировали, что гибридный АТ, содержащий холодоактивную олиго- α -1,6-гликозидазу *Exi. sibiricum*, также обеспечивает высокий уровень транспорта пассажирского домена на клеточную поверхность, что было показано с помощью анализа ферментативной активности и протеолитической обработки целых клеток. Клетки, экспрессирующие EsOgl на поверхности, демонстрируют высокую ферментативную активность при температуре 15–35 °С. Ранее мы показали, что EsOgl обладает максимальной активностью при 25 °С, и при этом сохраняет более 75% активности в диапазоне 10–40 °С [9]. Дальнейшее повышение температуры приводит к быстрой инактивации фермента.

Анализ полученных результатов позволяет высказать предположение о высокой совместимости со структурными элементами АТ и, как следствие, повышенной эффективности экспорта холодоактивных ферментов и других белков психрофильных организмов с использованием системы секреции V-типа. Безусловно, подтверждение данной гипотезы требует проведения дополнительных исследований и конструирования систем дисплея новых холодоактивных белков.

Ранее мы показали, что использование делеционных вариантов АТ877 позволяет повысить уровень экспорта пассажирского домена на поверхность клеток [22]. Белок ¹⁰Fn3, который являлся пассажирским доменом в предыдущем исследовании, обладает высокой скоростью сворачивания в цитоплазме клеток. Соответственно, эффективность его транспорта с использованием полноразмерного АТ877 исходно была достаточно низкой [20]. Интересно было проверить, позволит ли укорочение транслокаторного домена АТ877 повысить уровень секреции EsOgl. Проведенные нами эксперименты показали, что делеции положительно повлияли на эффективность транспорта и в данном случае, что привело к повышению ферментативной активности клеток в 2,7 и 2,4 раза, причем клетки, экспрессирующие более короткий белок, обладали большей гликозидазной активностью. Мы предполагаем, что это связано с увеличением числа молекул пассажирского домена (EsOgl) на поверхности клеток, экспрессирующих делеционные варианты гибридного АТ. В дальнейшем мы планируем продолжить работы по получению новых делеционных вариантов и исследованию их свойств.

Таким образом, можно утверждать, что предложенная система клеточного дисплея на

основе аутопереносчика АТ877 *P. cryohalolentis* обладает достаточной универсальностью и позволяет экспонировать на поверхности клеток *E. coli* белки, обладающие различными ферментативными активностями, в том числе олиго- α -1,6-гликозидазной. В сочетании с другими цельноклеточными биокатализаторами полученный штамм может быть использован для эффективной биотехнологической переработки крахмалосодержащего сырья. Разработанные нами подходы к повышению эффективности секреции белков семейства АТ могут найти применение в конструировании систем бактериального дисплея других гетерологичных пассажирских доменов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проделанной работы получены гибридный АТ, содержащий холодо-активную олиго- α -1,6-гликозидазу, и два его укороченных варианта. Все варианты обеспечивают высокий уровень транспорта пассажирского домена на клеточную поверхность. Следует отметить, что делеции привели к уве-

личению эффективности транспорта EsOgl и повышению ферментативной активности клеток в 2,7 и 2,4 раза, причем клетки, экспрессирующие самый короткий белок, обладали максимальной активностью. Полученные нами результаты могут быть использованы для оптимизации систем дисплея на поверхности клеток *E. coli*.

Вклад авторов. Л.Н. Шингарова, Л.Е. Петровская, М.П. Кирпичников – концепция и руководство работой; Л.Н. Шингарова, Е.А. Крюкова, С.Ш. Гапизов – проведение экспериментов; Л.Н. Шингарова, Л.Е. Петровская, Д.А. Долгих – обсуждение результатов исследования; Л.Е. Петровская, Л.Н. Шингарова – написание текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Госзадания ИБХ РАН № FMFM-2019-0007 (0101-2019-0007).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Van der Maarel, M. J. E. C., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H., and Dijkhuizen, L. (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family, *J. Biotechnol.*, **94**, 137-155, doi: 10.1016/s0168-1656(01)00407-2.
2. Hua, X., and Yang, R. (2016) *Enzymes in starch processing*, in *Enzymes in Food and Beverage Processing* (Chandrasekaran, M. ed.) CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 139-170.
3. Dong, Z., Tang, C., Lu, Y., Yao, L., and Kan, Y. (2020) Microbial oligo- α -1,6-glucosidase: current developments and future perspectives, *Starch Stärke*, **72**, 1900172, doi: 10.1002/star.201900172.
4. Watanabe, K., Hata, Y., Kizaki, H., Katsube, Y., and Suzuki, Y. (1997) The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1,6-glucosidase at 2.0 Å resolution: structural characterization of proline-substitution sites for protein thermostabilization, *J. Mol. Biol.*, **269**, 142-153, doi: 10.1006/jmbi.1997.1018.
5. Watanabe, K., Kitamura, K., and Suzuki, Y. (1996) Analysis of the critical sites for protein thermostabilization by proline substitution in oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus coagulans* ATCC 7050 and the evolutionary consideration of proline residues, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2066-2073, doi: 10.1128/aem.62.6.2066-2073.1996.
6. Watanabe, K., Chishiro, K., Kitamura, K., and Suzuki, Y. (1991) Proline residues responsible for thermostability occur with high frequency in the loop regions of an extremely thermostable oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus thermoglucosidasius* KP1006, *J. Biol. Chem.*, **266**, 24287-24294, doi: 10.1016/S0021-9258(18)54226-5.
7. Feller, G. (2013) Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology, *Scientifica*, **2013**, 512840, doi: 10.1155/2013/512840.
8. Barroca, M., Santos, G., Gerday, C., and Collins, T. (2017) *Biotechnological Aspects of Cold-Active Enzymes*, in *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology* (Margesin, R. ed.) Springer International Publishing, Cham, pp. 461-475, doi: 10.1007/978-3-319-57057-0_19.
9. Berlina, Y. Y., Petrovskaya, L. E., Kryukova, E. A., Shingarova, L. N., Gapizov, S. S., Kryukova, M. V., Rivkina, E. M., Kirpichnikov, M. P., and Dolgikh, D. A. (2021) Engineering of Thermal stability in a cold-active oligo-1,6-glucosidase from *Exiguobacterium sibiricum* with unusual amino acid content, *Biomolecules*, **11**, 1229, doi: 10.3390/biom11081229.
10. Van Ulsen, P., ur Rahman, S., Jong, W. S., Daleke-Schermerhorn, M. H., and Luirink, J. (2014) Type V secretion: from biogenesis to biotechnology, *Biochim.*

- Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1843**, 1592-1611, doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.11.006.
11. Nicolay, T., Vanderleyden, J., and Spaepen, S. (2015) Autotransporter-based cell surface display in Gram-negative bacteria, *Crit. Rev. Microbiol.*, **41**, 109-123, doi: 10.3109/1040841X.2013.804032.
 12. De Carvalho, C. C. (2017) Whole cell biocatalysts: essential workers from nature to the industry, *Micr. Biotechnol.*, **10**, 250-263, doi: 10.1111/1751-7915.12363.
 13. Schüürmann, J., Quehl, P., Festel, G., and Jose, J. (2014) Bacterial whole-cell biocatalysts by surface display of enzymes: toward industrial application, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 8031-8046, doi: 10.1007/s00253-014-5897-y.
 14. He, M.-X., Feng, H., and Zhang, Y.-Z. (2008) Construction of a novel cell-surface display system for heterologous gene expression in *Escherichia coli* by using an outer membrane protein of *Zymomonas mobilis* as anchor motif, *Biotechnol. Lett.*, **30**, 2111-2117, doi: 10.1007/s10529-008-9813-3.
 15. Ryu, S., and Karim, M. N. (2011) A whole cell biocatalyst for cellulosic ethanol production from dilute acid-pretreated corn stover hydrolyzates, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **91**, 529-542, doi: 10.1007/s00253-011-3261-z.
 16. Muñoz-Gutiérrez, I., Oropeza, R., Gosset, G., and Martinez, A. (2012) Cell surface display of a β -glucosidase employing the type V secretion system on ethanologenic *Escherichia coli* for the fermentation of cellobiose to ethanol, *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.*, **39**, 1141-1152, doi: 10.1007/s10295-012-1122-0.
 17. Soma, Y., Inokuma, K., Tanaka, T., Ogino, C., Kondo, A., Okamoto, M., and Hanai, T. (2012) Direct isopropanol production from cellobiose by engineered *Escherichia coli* using a synthetic pathway and a cell surface display system, *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 80-85, doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.02.019.
 18. Van Ulsen, P., Zinner, K. M., Jong, W. S. P., and Luirink, J. (2018) On display: autotransporter secretion and application, *FEMS Microbiol. Lett.*, **365**, fny165, doi: 10.1093/femsle/fny165.
 19. Petrovskaya, L., Novototskaya-Vlasova, K., Kryukova, E., Rivkina, E., Dolgikh, D., and Kirpichnikov, M. (2015) Cell surface display of cold-active esterase EstPc with the use of a new autotransporter from *Psychrobacter cryohalolentis* K5T, *Extremophiles*, **19**, 161-170, doi: 10.1007/s00792-014-0695-0.
 20. Petrovskaya, L., Zlobinov, A., Shingarova, L., Boldyreva, E., Gapizov, S. S., Novototskaya-Vlasova, K., Rivkina, E., Dolgikh, D., and Kirpichnikov, M. (2018) Fusion with the cold-active esterase facilitates autotransporter-based surface display of the 10th human fibronectin domain in *Escherichia coli*, *Extremophiles*, **22**, 141-150, doi: 10.1007/s00792-017-0990-7.
 21. Shingarova, L., Petrovskaya, L., Zlobinov, A., Gapizov, S. S., Kryukova, E., Birikh, K., Boldyreva, E., Yakimov, S., Dolgikh, D., and Kirpichnikov, M. (2018) Construction of artificial TNF-binding proteins based on the 10th human fibronectin type III domain using bacterial display, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 708-716, doi: 10.1134/S0006297918060081.
 22. Shingarova, L. N., Petrovskaya, L. E., Kryukova, E. A., Gapizov, S. S., Boldyreva, E. F., Dolgikh, D. A., and Kirpichnikov, M. P. (2022) Deletion variants of autotransporter from *Psychrobacter cryohalolentis* increase efficiency of ¹⁰FN3 exposure on the surface of *Escherichia coli* cells, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 932-939, doi: 10.1134/S0006297922090061.
 23. Dalbey, R. E., and Kuhn, A. (2012) Protein traffic in Gram-negative bacteria – how exported and secreted proteins find their way, *FEMS Microbiol. Rev.*, **36**, 1023-1045, doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00327.x.
 24. Kim, K. H., Aulakh, S., and Paetzel, M. (2012) The bacterial outer membrane beta-barrel assembly machinery, *Prot. Sci.*, **21**, 751-768, doi: 10.1002/pro.2069.
 25. Peterson, J. H., Tian, P., Ieva, R., Dautin, N., and Bernstein, H. D. (2010) Secretion of a bacterial virulence factor is driven by the folding of a C-terminal segment, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **107**, 17739-17744, doi: 10.1073/pnas.1009491107.
 26. Junker, M., Besingi, R. N., and Clark, P. L. (2009) Vectorial transport and folding of an autotransporter virulence protein during outer membrane secretion, *Mol. Microbiol.*, **71**, 1323-1332, doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06607.x.
 27. Renn, J. P., Junker, M., Besingi, R. N., Braselmann, E., and Clark, P. L. (2012) ATP-independent control of autotransporter virulence protein transport via the folding properties of the secreted protein, *Chem. Biol.*, **19**, 287-296, doi: 10.1016/j.chembiol.2011.11.009.
 28. Braselmann, E., and Clark, P. L. (2012) Autotransporters: the Cellular environment reshapes a folding mechanism to promote protein transport, *J. Phys. Chem. Lett.*, **3**, 1063-1071, doi: 10.1021/jz201654k.
 29. Siddiqui, K. S., and Cavicchioli, R. (2006) Cold-adapted enzymes, *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 403-433, doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142723.
 30. Struvay, C., and Feller, G. (2012) Optimization to low temperature activity in psychrophilic enzymes, *Int. J. Mol. Sci.*, **13**, 11643-11665, doi: 10.3390/ijms130911643.
 31. Santiago, M., Ramírez-Sarmiento, C. A., Zamora, R. A., and Parra, L. P. (2016) Discovery, molecular mechanisms, and industrial applications of cold-active enzymes, *Front. Microbiol.*, **7**, 1408, doi: 10.3389/fmicb.2016.01408.
 32. Novototskaya-Vlasova, K., Petrovskaya, L., Yakimov, S., and Gilichinsky, D. (2012) Cloning, purification, and characterization of a cold adapted esterase produced by *Psychrobacter cryohalolentis* K5T from Siberian cryopeg, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **82**, 367-375, doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01385.x.

**DISPLAY OF OLIGO- α -1,6-GLYCOSIDASE
FROM *Exiguobacterium sibiricum* AT THE SURFACE
OF *Escherichia coli* CELLS**

**L. N. Shingarova^{1*}, L. E. Petrovskaya¹, E. A. Kryukova¹, S. S. Gapizov^{1,2},
D. A. Dolgikh^{1,2}, and M. P. Kirpichnikov^{1,2}**

¹ *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
117997 Moscow, Russia; e-mail: lshingarova@gmail.com*

² *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

Cell-surface display based on the use of anchor motifs of outer membrane proteins allows the exposure of target peptides and proteins on the surface of microbial cells. Previously, we obtained and characterized recombinant oligo- α -1,6-glycosidase of the psychrotrophic bacterium *Exiguobacterium sibiricum* (EsOgl) which demonstrated high catalytic activity. It has also been shown that the autotransporter AT877 from *Psychrobacter cryohalolentis* and its deletion variants effectively exhibit the 10th domain of type III fibronectin (10Fn3) on the surface of *Escherichia coli* cells. The aim of the work was to obtain an EsOgl display system on the surface of bacterial cells based on AT877. The genes of the hybrid autotransporter EsOgl877 and its deletion mutants EsOgl877 Δ 239 and EsOgl877 Δ 310 were constructed. The enzymatic activity of EsOgl877 was investigated and it was found that the cells expressing this protein retained about 90% of the maximum activity in the range of 15–35°C. It was shown that activity of the cells containing EsOgl877 Δ 239 and EsOgl877 Δ 310 was 2.7 and 2.4 times higher, respectively, than of the cells expressing full-sized AT. Analysis of cells expressing shortened variants of EsOgl877 after treatment with proteinase K showed that the passenger domain is also localized on the cell surface. The obtained results can be used for optimization of the display systems of oligo- α -1,6-glycosidase and other heterologous proteins on the surface of *E. coli* cells.

Keywords: secretion, autotransporter, oligo- α -1,6-glucosidase, bacterial display