

УДК 577.6

ТЕРМОСТАБИЛЬНАЯ ЛИХЕНАЗА *Clostridium thermocellum* ДОПУСКАЕТ ОДИНОЧНЫЕ И ТАНДЕМНЫЕ ИНСЕРЦИИ БЕЛКОВЫХ ДОМЕНОВ*

© 2019 О.С. Павленко^{1**}, О.А. Гра¹, О.Н. Мустафаев², К.В. Кабарбаева¹,
Н.С. Садовская¹, А.А. Тюрин¹, В.С. Фадеев¹, И.В. Голденкова-Павлова^{1**}

¹ Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276 Москва, Россия;
электронная почта: Helliga.p@gmail.com и irengold58@gmail.com

² Бакинский государственный университет, AZ 1148 Баку,
Азербайджан; электронная почта: orkhan@bioset.org

Поступила в редакцию 03.03.2019

После доработки 29.04.2019

Принята к публикации 30.04.2019

В этом исследовании лихеназа *Clostridium thermocellum* (эндо-β-1,3;1,4-глюкан-D-гликозилгидролаза, ЕС 3.2.1.73 (P29716)) апробирована в роли белка, принимающего в двух областях инсерцию двух модельных флуоресцентных белков (EGFP и TagRFP). Функциональная укладка всех доменов подтверждена сохранением ферментативной активности лихеназы и флуоресценции EGFP и TagRFP. Полученные результаты убедительно свидетельствуют, что (i) два экспериментально апробированных петлевых региона лихеназы могут служить областями для инсерции белков без нарушения ее фолдинга *in vivo*, (ii) лихеназа способна допускать не только одиночные, но и тандемные вставки крупных белковых доменов. Высокая активность и термостабильность, эффективный рефолдинг *in vitro* лихеназы делает ее привлекательной в качестве нового принимающего «host»-белка при использовании подхода инсерционного слияния доменов в инженерии многофункциональных белков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: лихеназа, флуоресцентные белки, одиночные и тандемные инсерции белков.

DOI: 10.1134/S0320972519080104

Одно из ключевых направлений в инженерии белков связано с дизайном и конструированием слитых белков, биомолекул, состоящих из двух или более белков и/или пептидов, которые синтезируются как единая белковая конструкция. Для инженерии таких белков используют стратегию прямого «слияния» белков (или стратегию «голова к хвосту») или стратегию инсерции доменов [1–3]. Стратегия «голова к хвосту» достаточно проста и применяется в тех случаях, когда гибкие и неструктурированные N- или C-концевые области белка выступают в качестве «моста», чтобы обеспечить достаточное пространство между доменами белков для их правильной укладки [4]. Помимо этого, возможно объединение белков через линкерный пептид,

который предназначен для разделения белков и поддержания благоприятного взаимодействия между ними. Имеется немало успешных примеров создания рекомбинантных белков с использованием стратегии прямого «слияния» для различного биотехнологического [2, 3, 5] и биофармацевтического применения [6–8].

Однако стратегия «голова к хвосту» может терпеть неудачу вследствие того, что такие рекомбинантные белки более часто подвержены протеолитической деградации и структурно нестабильны [9]. В таких случаях более полезной может быть стратегия инсерции доменов [10–12]. Эта стратегия основана на инсерции одного белкового домена («guest»-домен) в другой белок (принимающий белок или «host»-домен) [11]. Стоит отметить, что эта стратегия является более сложной для дизайна, чем стратегия «прямого» слияния [12, 13]. Так, для успешного создания белков путем инсерции домена крайне важно предсказать потенциальные области интеграции в принимающем белке. Для поиска оптимальных сайтов для «врезания» в белок предложено и успешно апробировано несколько подходов: случайный и направленный

Принятые сокращения: РГК – фосфоглицераткиназа, ВЛА – β-лактамаза, СРБ – суммарный растворимый белок.

* Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 84, вып. 8, 2019.

** Адресат для корреспонденции.

ный мутагенез, в частности, комбинаторные подходы к вставке домена, которые используют DNaseI [14–16] или транспозоны [17, 18] для введения случайных разрывов в сегмент ДНК-мишени; циклические перестановки в белке, которые дают представление о том, какие структурные элементы важны для функционирования белка, а также позволяют найти сайты для вставки других белков [19, 20]; *in silico* алгоритмы для предсказания участков интеграции на основе оценки низкой энергии нарушения структурно-функциональных элементов белка [21, 22] и ряд других.

Согласно текущему мнению, белки с inserцией других белковых доменов стали уникальными моделями для фундаментальных исследований, в частности, (i) для изучения механизма кооперативной укладки белков и их функционирования [23]; (ii) для конструирования белков-переключателей [16]; (iii) для увеличения стабильности белковых молекул [13, 24] и (iv) для конструирования бифункциональных белков [1–3, 11, 13, 25].

Отметим, что стратегия inserции доменов использована на немногочисленном списке белков, которые применены в качестве принимающего или «host»-домена. Среди них есть как умеренно стабильные [18, 23], так и термостабильные белки [13, 24–26]. Большинство «host»-белков исследованы за счет вставки одного «guest»-домена, и проявляют к ней полную или частичную толерантность, оцененную по сохранению функциональной укладки обоих («host» и «guest») белков. Вставка одновременно двух «guest»-доменов изучена для двух «host»-белков – фосфоглицераткиназы (PGK) и β -лактамазы (BLA): PGK допускает inserцию двух разных «guest»-доменов в двух разных областях PGK [12], а BLA – тандемную inserцию одного и того же белка, соединенную через короткий гибкий линкер в одной области BLA [17, 27]. Таким образом, список принимающих белков, в частности, белков, способных допускать не только одиночные, но и тандемные вставки двух «guest»-доменов, крайне скромный.

В этом исследовании мы применили подход inserции домена к термостабильной лихеназе (эндо- β -1,3;1,4-глюкан-D-гликозилгидролаза EC 3.2.1.73 (P29716)) *Clostridium thermocellum*, как «host»-белку, с использованием двух модельных флуоресцентных белков. Привлекательность использования термостабильной лихеназы для такого подхода базируется на следующем: (i) белок сохраняет функциональность при N- и C-концевых слияниях [5, 28]; (ii) высокие термостабильность и удельная активность лихеназы, которые могут быть оценены простыми и

чувствительными методами как качественно, так и количественно [5, 13, 28]; (iii) компактная структура белковой молекулы, согласно которой белок имеет несколько петлевых областей [5, 13, 28, 29]; (iv) участки двух петлевых областей (53 и 99 а.о.) каталитического домена термостабильной лихеназы допускают и введение круговой перестановки, и выдерживают внутреннюю интеграцию небольших пептидов (6 а.о.), в том числе и тандемную, с сохранением активности и термостабильности фермента [28].

На основании ранее полученных нами результатов о сохранении лихеназой активности и термостабильности при внутренней интеграции небольших пептидов высказано предположение о толерантности этого белка к более крупным внутренним inserциям в двух петлевых областях (53 и 99 а.о.) [28]. Для того чтобы проверить эту гипотезу, необходимо оценить могут ли эти области лихеназы выдержать внутреннюю интеграцию крупных доменов без драматической потери ферментом активности и термотолерантности.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Генно-инженерные методы. В работе использованы стандартные процедуры молекулярного клонирования [30], праймеры («Evrogen», Россия), ферменты и наборы реагентов («Promega», США), («Fermentas», Литва), («QIAexpress», США) и («Novagene», США). Плазмиды pQE-NC-L-53-99 [28], pTagRFP-C («Evrogen», Россия) и pQE-egfp [31] использованы в качестве источников *licB*, *rfp* и *egfp* генов соответственно. В последовательностях генов-мишеней (*RFP* и *EGFP*) стартовый и стоп-кодона удалены.

Конструирование лихеназы со вставками доменов (domain insertion). Плазмида pQE-LicB/53EGFP сконструирована в два этапа. Первоначально последовательность гена *egfp* клонирована с помощью ПЦР с использованием плазмиды pQE-egfp в качестве матрицы и прямого EGF-A(F) и обратного EGF-A(R) праймеров с введенными сайтами рестрикции *Bam*HI и *Apa*I (табл. 1). Ампликон клонирован в виде фрагмента *Bam*HI – *Apa*I в плазмиду pQE-NC-L-53-99 (далее обозначали плазмиду как pQE-LicB-M) [28], гидролизованную теми же эндонуклеазами рестрикции. Плазмида pQE-LicB/99EGFP также сконструирована в два этапа. Первоначально последовательность гена *egfp* получена с помощью ПЦР с использованием плазмиды pQE-egfp в качестве матрицы и прямого EGF-B(F) и обратного EGF-B(R) праймеров с введенными сайтами рестрикции *Hind*III и *Sma*I (табл. 1).

Ампликон клонирован в виде фрагмента *Hind*III – *Sma*I в плазмиду pQE-LicB-M [29], гидролизованную теми же эндонуклеазами рестрикции. Плазида pQE-LicB/53EGFP/99RFP сконструирована в два этапа. Первоначально последовательность гена *rfp* получена с помощью ПЦП с использованием плазмиды pTagRFP-C в качестве матрицы («Evrogen», Россия) и прямого RFP(F), и обратного RFP(R) праймеров с введенными сайтами рестрикции *Hind*III и *Sma*I (табл. 1). Ампликон клонирован в виде фрагмента *Hind*III – *Sma*I в плазмиду pQE-LicB/53EGFP, гидролизованную теми же эндонуклеазами рестрикции. Рамки считывания генов в плазидах LicB/53EGFP, LicB/99EGFP и LicB/53EGFP/99RFP проверены с помощью секвенирования («Evrogen», Россия).

Экспрессия и очистка белков. Штамм *E. coli* XL1-Blue («Stratagene», США), несущий плазмиды pQE-LicB-M, pQE-EGFP, pQE-LicB/53EGFP, pQE-LicB/99EGFP и pQE-LicB/53EGFP/99RFP, растили до OD₆₀₀ 0,6 при 37 °C в среде LB («Amresco», США) и затем индуцировали 0,5 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактазидом (IPTG) при 37 °C в течение 16 ч. Клетки отделяли от среды на центрифуге 5910R («Eppendorf», Германия), дважды промывали в буфере 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0 и ресуспендировали в том же буфере. Разрушение клеток осуществляли Френч-прессом («Aminco», США) и очищали центрифугированием. Полученный суммарный растворимый белок (СРБ) инкубировали при 65 °C 30 мин и очищали центрифугированием. Осадок высушивали, перерастворяли в 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0 и использовали для очистки на колонке с Ni²⁺-NTA-агарозой («Qiagen», Германия), уравновешенной 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0. Белки элюировали тем же буфером, содержащим линейный градиент (20–200 мМ) имидазола. Элюированные белки подвергали диализу против 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, и очищенный белок (ОБ) использовали в дальнейших экспериментах.

Аналитическая характеристика белков. Чашечный тест проводили, как описано ранее [13, 28]. Кратко: бактериальные колонии переносили на чашки Петри с агаризованной средой LB методом реплики и выращивали колонии при 37 °C в течение ночи. Затем чашки заливали верхним слоем агара, содержащим 0,05% лихенана («Megazyme», Ирландия), и инкубировали 1–16 ч. Активность лихеназы определяли окрашиванием гелей 0,5%-ным раствором Конго красного («Sigma», США) с последующим отмыванием в 1М NaCl [13, 28]. При этом на месте активного белка обнаруживается просветленная область, так как краситель связывается

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	5'–3' последовательность праймеров
EGF-A(F)	GGATCCGTGAGCAAGGGCGA
EGF-A(R)	GGGCCCTTGTACAGCTCGT
EGF-B(F)	AAGCTTGTGAGCAAGGGCGAG
EGF-B(R)	CCCGGGCTTGTACAGCTCGTCC
RFP(F)	AAGCTTGTGAGTAAAGGTGAAGA
RFP(R)	CCCGGGTTCAATTTGTGACCTAG

только с негидролизированным лихенаном. Энзимогаммы получали окрашиванием геля после разделения белков в 12%-ном ДСН-ПААГ в присутствии 0,1% лихенана, как описано ранее [13, 28]. Кратко: лихенан (0,1%) добавляли в разделяющий гель до полимеризации. Прогретье белковые лизаты, содержащие равное количество суммарного белка (определено по методу Бредфорда [32]), смешивали с буфером (Tris-HCl, pH 6,8; 12,5% (v/v) глицерин, 0,5% SDS, 1,25% β-меркаптоэтанол) и инкубировали при 70 °C 40 мин. После электрофореза гель инкубировали при 70 °C 1 ч. Ферментативная активность определена за счет окрашивания геля 0,5%-ным раствором Конго красного с последующим отмыванием в 1 М NaCl. При этом на месте активного белка обнаруживается просветленная область, так как краситель связывается только с негидролизированным лихенаном. Молекулярная масса белков определена с помощью маркеров Prestained Protein Ladder («Fermentas», Латвия).

Активность лихеназы определена методом восстанавливающих сахаров с использованием лихенана в качестве субстрата. Определение восстанавливающих сахаров проводили с использованием 3,5-динитросалициловой кислоты (DNS) и контролировали калориметрически при 540 нм [13, 29] в устройстве CLARIO star («BMGLABTECH», Германия). За единицу активности принимали количество фермента, образующее 1 мкмоль восстанавливающих сахаров за 1 мин в стандартных условиях. Стандартный анализ проводили в течение 10 мин в 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0) при 70 °C. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта [32]. Термостабильность ферментов, инкубированных в 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0) при 70 °C в течение 4 ч, оценивали по их активности, определенной стандартным анализом: оценивали относительную активность (%) каждого образца белка как (активность лихеназы в данной точке

инкубации при 70 °С)/(активность лихеназы без инкубации) × 100. Обработка этанолом: СРБ обрабатывали тремя объемами 96%-ного этанола при 4 °С в течение 8–10 ч и последующим центрифугированием при 12 °С и 100 g («Eppendorf», Германия). Осадок высушивали при комнатной температуре и растворяли в 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, и определяли активность лихеназы, как указано выше.

Флуоресценцию EGFP в бактериальных трансформантах определяли визуально при освещении УФ-светом. Спектры флуоресценции EGFP регистрировали на спектрофлуориметре Cary Eclipse («Varian B.V.», Австралия). Измерения получены при длине волн возбуждения и эмиссии 488 и 507 нм соответственно. Флуоресценцию RFP у бактерий регистрировали с использованием микроскопа Axio Imager Z2 («Zeiss», Германия), оснащенного цифровой камерой AxioCam MR и фильтром № 43. Модуль ApoTome («Zeiss», Германия), позволяющий уменьшить очаговую флуоресценцию, использовался для регистрации флуоресценции.

Кинетика процесса рефолдинга. Образцы белков (50 мкМ) нагревали до 95 °С в денатурирующем растворе (8 М мочевины, 1 мМ дитиотреитол) в течение 4 мин [33]. Реакции рефолдинга начинали после 100× разведения в том же буфере без мочевины. Кинетика рефолдинга лихеназы оценена по восстановлению ее активности с использованием алгоритма Левенберга–Марквардта, который реализует метод наи-

меньших квадратов для случая нелинейной регрессии [34].

Статистический анализ. Все процедуры проводили как минимум в трех независимых экспериментах, и результаты выражали в виде среднего значения ± стандартное отклонение, если не указано особо.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн термостабильной лихеназы с инсерцией доменов флуоресцентных белков. В этом исследовании термостабильная лихеназа *C. thermocellum* использована как потенциальный принимающий «host»-белок. Лихеназа – мономерный белок, состоящий из 215 а.о., он имеет компактную структуру белковой молекулы и характеризуется повышенной термостабильностью и высокой удельной активностью. Для инсерции доменов использован модифицированный вариант термостабильной лихеназы NC-L-53-99 (в этой работе обозначен как LicB-M) с областью вставки небольших пептидов между 53 и 99 а.о. в каталитическом домене лихеназы (рис. 1). В этом варианте гена термостабильной лихеназы кодоны для интегрированных пептидов формируют уникальные сайты рестрикции на уровне нуклеотидных последовательностей *Bam*HI, *Apa*I, *Hind*III и *Sma*I [28]. Такой дизайн последовательности позволяет легкое применение подхода инсерции доменов для лихеназы как «host»-белка.

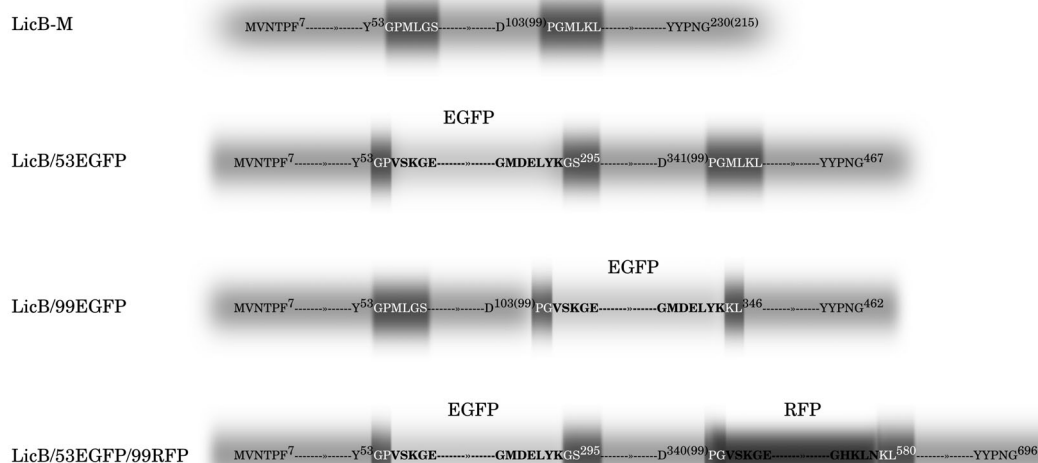


Рис. 1. Последовательности LicB-M (исходный вариант лихеназы), LicB/53EGFP и LicB/99EGFP (варианты лихеназы с инсерцией EGFP в область 53 или 99 а.о. соответственно) и LicB/53EGFP/99RFP (вариант лихеназы с инсерциями EGFP и TagRFP в область 53 и 99 а.о. соответственно). Светло-серые блоки – последовательности лихеназы; темно-серые блоки – интегрированные малые пептиды или их части; EGFP – зеленый флуоресцентный белок; TagRFP – красный флуоресцентный белок. Цифрами у аминокислотных остатков обозначены порядковые номера а.о. в белке, цифрами в скобках обозначены порядковые номера а.о. каталитического домена термостабильной лихеназы

Интегрированные домены – EGFP (PDBID: 4KAG) [35] и TagRFP (AMY56669.1) [36] – мономерные белки, состоящие из 238 и 236 а.о. соответственно, с относительной близостью N- и C-концевых областей, функционально активная укладка которых может быть оценена простой визуализацией за счет их флуоресценции [33, 37, 38].

Методами молекулярного клонирования сконструированы последовательности: LicB/53EGFP и LicB/99EGFP, в которых ген *egfp* интегрирован в последовательность гена лихеназы в область 53 или 99 а.о. соответственно (рис. 1), т.е. последовательности с одной инсерцией EGFP в разных областях лихеназы. Дополнительно сконструирована последовательность LicB/53EGFP/99RFP, которая несет вставки EGFP и TagRFP в регионах 53 и 99 а.о. каталитического домена лихеназы соответственно (рис. 1), т.е. последовательность лихеназы с инсерцией двух флуоресцентных белков в двух разных областях лихеназы.

Экспрессия и функциональные свойства термостабильной лихеназы с инсерцией одного домена в две разные петлевые области. Первоначально мы попытались выяснить: (i) может ли термостабильная лихеназа в принципе быть использована в качестве принимающего белка, т.е. сможет ли лихеназа образовать стабильную и функциональную укладку при вставке крупных доменов; (ii) сохранит ли вставленный домен (в нашем случае флуоресцентный белок) способность к функциональной укладке; (iii) есть ли преференция у одного из выбранных сайтов интеграции в термостабильной лихеназе, как принимающем домене?

Для того, чтобы ответить на эти вопросы, использовали сконструированные последовательности LicB/53EGFP и LicB/99EGFP (рис. 1), а также исходные последовательности LicB-M и EGFP, которые перенесены в экспрессионные вектора на основе системы векторов pQE. Полученные трансформанты бактерий обозначены нами в соответствии с наименованием сконструированных последовательностей: LicB/53EGFP, LicB/99EGFP, LicB-M и EGFP.

Анализ бактериальных трансформантов методом чашечного теста показал, что присущую лихеназе активность проявляют как LicB-M, так и трансформанты LicB/53EGFP и LicB/99EGFP (просветленные пятна вокруг колоний) (рис. 2, а). При этом у трансформантов LicB/53EGFP и LicB/99EGFP выявлена и флуоресценция EGFP (рис. 2, б). Это с большой вероятностью свидетельствует о том, что в этих белках оба домена принимают функционально активную укладку – «host» (LicB-M) и «guest» (EGFP), и эти белки, по крайней мере умеренно, стабильны

in vivo. В пользу этого предположения свидетельствуют и результаты анализа суммарного растворимого белка методом ДСН-ПААГ-электрофореза (рис. 2, в), который демонстрирует сравнимый уровень экспрессии в *E. coli* как нативных белков LicB-M и EGFP, так и вариантов лихеназы с инсерцией домена в LicB/53EGFP и LicB/99EGFP.

Используя очищенный белок, оценены свойства принимающего белка (активность LicB-M) и вставленного белка (спектр флуоресценции EGFP). Первоначально мы провели анализ очищенных белков методом энзимграмм, на которых детектируются одиночные просветленные полосы активности. Это может свидетельствовать о том, что белки LicB/53EGFP и LicB/99EGFP в образцах представлены в форме мономеров (рис. 2, г), а также о том, что молекулярные массы этих белков соответствуют теоретически рассчитанным (~52 кДа). Сравнительный анализ удельной активности очищенных белков показал, что белки LicB/53EGFP и LicB/99EGFP, в целом, не демонстрируют драматического снижения удельной активности по сравнению с исходным вариантом LicB-M. Так, вариант LicB/53EGFP имеет удельную активность 314 ± 10 ед/мг, что сходно с таковой для исходного варианта LicB-M – 385 ± 11 ед/мг, а активность варианта LicB/99EGFP составляет $147 + 14$ ед/мг, т.е. проявляет лишь ~40% активности по сравнению с LicB-M. Таким образом, у обоих вариантов белков (LicB/53EGFP и LicB/99EGFP) с инсерцией одного домена активность лихеназы, в целом, сохранена.

Функциональность EGFP оценена в образцах СРБ: EGFP, LicB/53EGFP и LicB/99EGFP. Показано, что LicB/53EGFP и LicB/99EGFP имеют сходные с нативным EGFP спектры возбуждения и эмиссии белков (рис. 2, д). Эти данные служат убедительным подтверждением того, что вставленный домен EGFP сохраняет способность к функциональной укладке в принимающем белке.

Экспрессия и функциональные свойства термостабильной лихеназы с тандемной инсерцией доменов. Далее мы попытались совместить два мономерных домена в двух положениях (53 и 99 а.о.) термостабильной лихеназы (LicB-M) – зеленый (EGFP) и красный (TagRFP) флуоресцентные белки, и выяснить: (i) может ли лихеназа образовывать функциональную укладку при вставке одновременно двух доменов; и (ii) сохранят ли при этом вставленные флуоресцентные белки способность к функциональной укладке. Для этого использовали последовательности LicB/53EGFP/99RFP (рис. 1) и TagRFP, которые перенесены в экспрессионные вектора на осно-

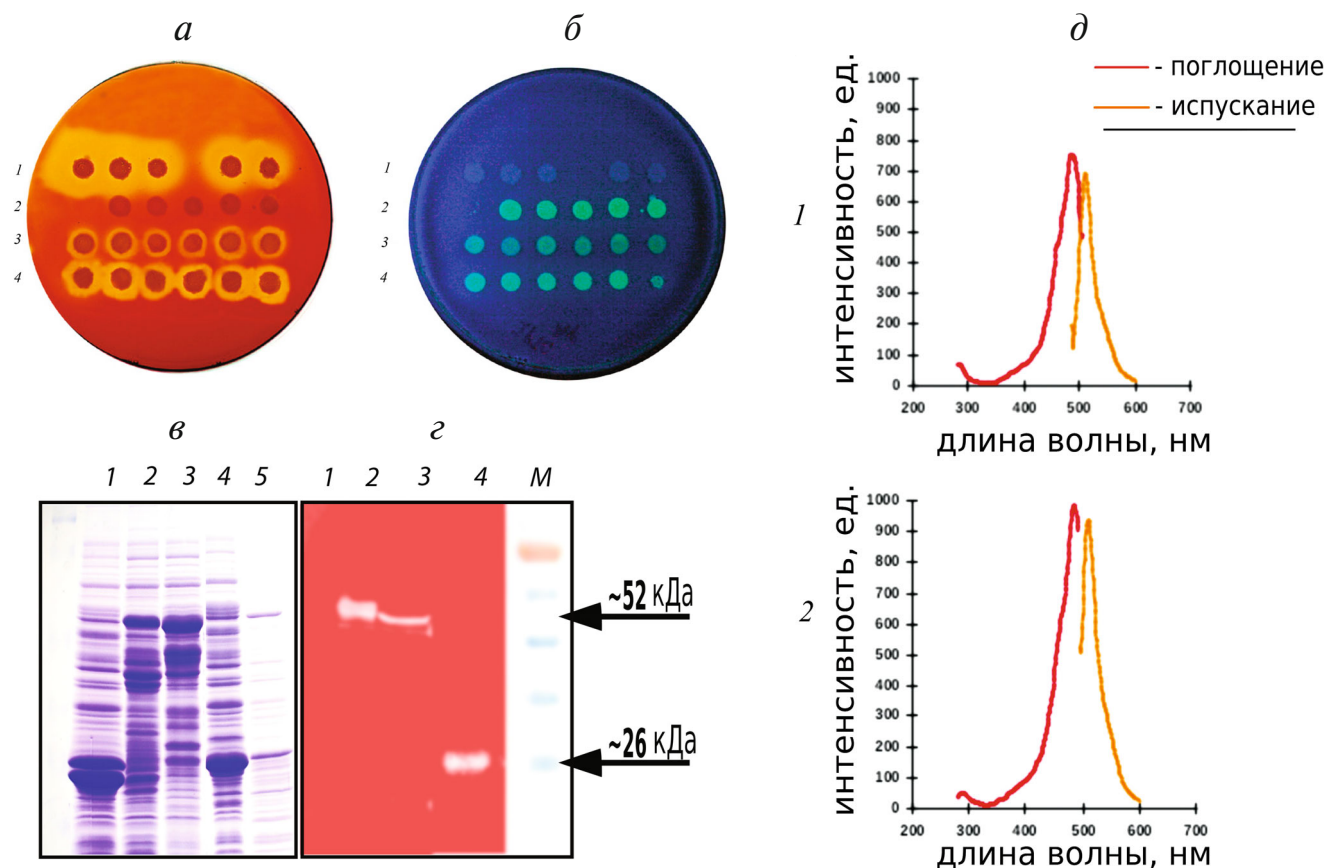


Рис. 2. Характеристика исходного варианта лихеназы (LicB-M) и вариантов лихеназы с инсерцией EGFP (LicB/53EGFP и LicB/99EGFP). *a* – Чашечный тест бактериальных трансформантов (об активности лихеназы свидетельствуют просветленные пятна вокруг колоний). *б* – Чашечный тест бактериальных трансформантов (EGFP флуоресценция). Для рисунков *a* и *б* – бактериальные трансформанты LicB-M (1), EGFP (2), LicB/53EGFP (3) и LicB/99EGFP (4) соответственно. *в* – Электрофореграмма сырых белковых лизатов EGFP (1), LicB/53EGFP (2), LicB/99EGFP (3), LicB-M (4), сырого белкового лизата штамма XL1-Blue, как контроль (5). *г* – Энзимограмма очищенных белков EGFP (1), LicB/53EGFP (2), LicB/99EGFP (3), LicB-M (4). *М* – маркер молекулярных масс. *д* – Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции EGFP. 1 – Нативный EGFP, 2 – LicB/99EGFP. Спектры LicB/53EGFP идентичны LicB/99EGFP (*б*). С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

ве системы векторов pET, и получены трансформанты бактерий, обозначенные нами в соответствии с наименованием сконструированных последовательностей: LicB/53EGFP/99RFP и TagRFP.

Чашечный тест бактериальных трансформантов показал, что активность лихеназы проявляют LicB-M и LicB/53EGFP/99RFP, и флуоресценция EGFP выявлена как у трансформанта EGFP, так и у LicB/53EGFP/99RFP (данные в статье не приводятся). Это является убедительным аргументом в пользу того, что LicB/53EGFP/99RFP и принимающий белок LicB-M, и по крайней мере один из «guest»-доменов (EGFP) функционально активны.

Методом ДСН-ПААГ-электрофореза проведен анализ СРБ, результаты которого свидетельствуют о сходном уровне экспрессии в *E. coli* как для LicB-M, так и для варианта LicB/

53EGFP/99RFP с тандемной вставкой доменов (рис. 3, *a*). Этот результат является свидетельством того, что белок с двойной вставкой доменов может свернуться в естественных условиях и проявляет стабильность. Далее часть СРБ была очищена, и оценены свойства «host»-белка (активность LicB-M) и «guest»-белков (флуоресценция EGFP и TagRFP). После разделения белков в ДСН-ПААГ методом энзимограмм была охарактеризована способность LicB-M и варианта LicB/53EGFP/99RFP гидролизовать субстрат (просветленные полосы активности) (рис. 3, *б*). На зимограмме наблюдалась единственная полоса активности с молекулярной массой, соответствующей теоретически рассчитанной массе LicB/53EGFP/99RFP (~88 кДа) (рис. 3, *б*). Удельная активность очищенного LicB/53EGFP/99RFP белка оказалась сравнимой с таковой у варианта LicB/99EGFP (с инсер-

цией EGFP в область 99 а.о.) и составила 155 ± 15 ед/мг. Флуоресцентная микроскопия бактериальных трансформантов подтвердила флуоресценцию TagRFP у варианта LicB/53EGFP/99RFP (рис. 3, в). Дополнительно установлено, что очищенный белок LicB/53EGFP/99RFP обладает флуоресценцией с максимумами возбуждения/эмиссии, характерными как для EGFP (488 и 507 нм), так и для TagRFP (555 и 584 нм) (данные в статье не приводятся). Полученные результаты указывают на то, что оба вставленных белка (TagRFP и EGFP) способны к функциональной укладке при inserции в лихеназу.

Термостабильность очищенных белков оценена в процессе инкубации при 70 °С в отсутствии субстрата, и остаточная удельная активность лихеназы рассчитана после 4 ч инкубации. Отмечено снижение удельной активности лихеназы только для варианта LicB/53EGFP. Вариант LicB/99EGFP сохраняет удельную актив-

ность практически на первоначальном уровне, а вариант LicB/53EGFP/99RFP проявляет схожий с LicB-M показатель остаточной удельной активности.

Рефолдинг лихеназы *in vitro*. Последствием inserции доменов может быть полная или частичная потеря способности принимающего белка к рефолдингу *in vitro* [18]. Основным методологическим приемом изучения укладки и стабильности белков является исследование их разворота (unfolding) под воздействием денатурирующих агентов и последующего рефолдинга *in vitro*. Мы исследовали способность лихеназы в исходном варианте белка LicB-M и в белках с inserцией доменов LicB/53EGFP, LicB/99EGFP и LicB/53EGFP/99RFP к повторной укладке *in vitro* после денатурации их мочевиной и этанолом. Для оценки способности лихеназы к рефолдингу *in vitro* использована ферментативная активность, как единственный показа-

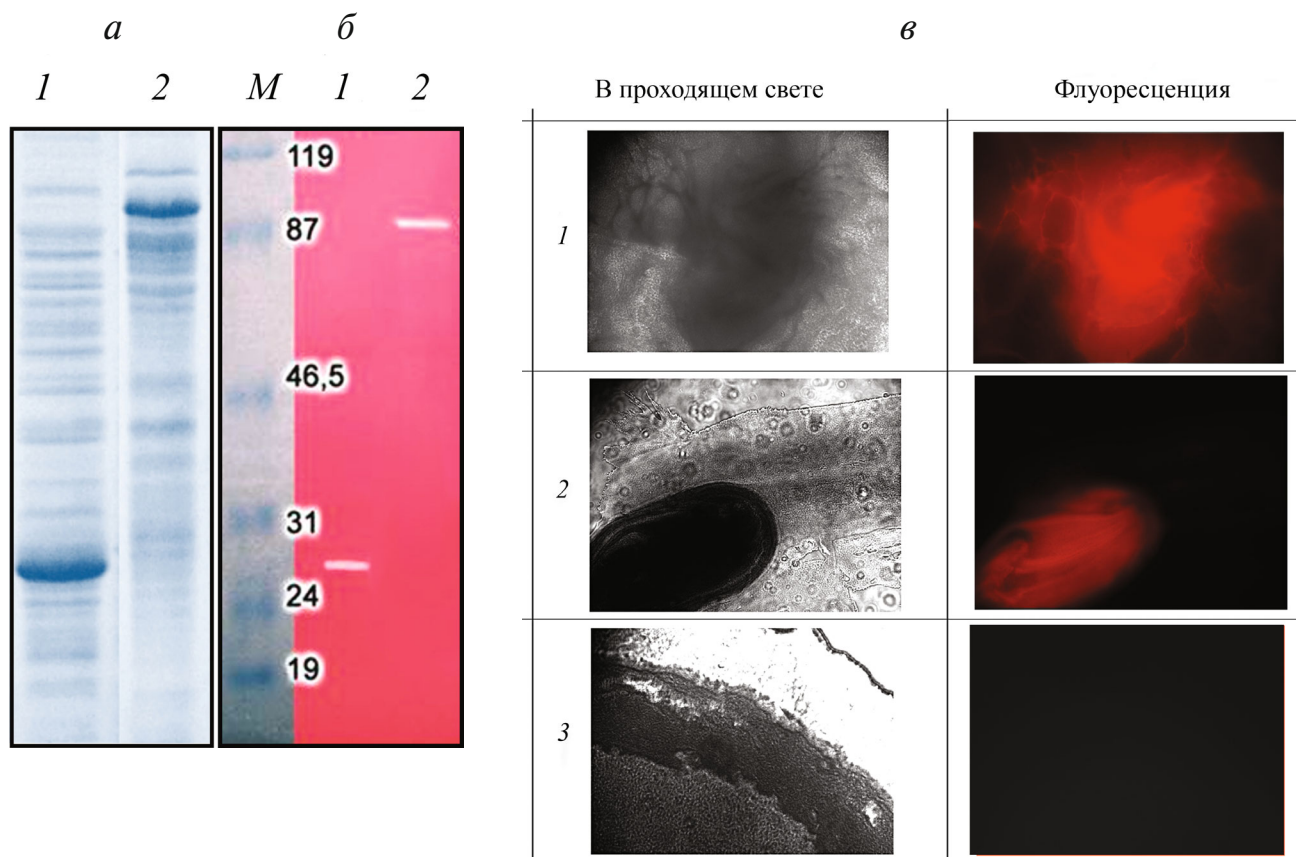


Рис. 3. Характеристика исходного варианта лихеназы (LicB-M) и варианта лихеназы с inserциями EGFP и TagRFP (LicB/53EGFP/99RFP). а – Электрофореграмма сырых белковых лизатов LicB-M (1), LicB/53EGFP/99RFP (2). б – Энзимограма очищенных белков LicB-M (1), LicB/53EGFP/99RFP (2). М – маркер молекулярных масс. в – Флуоресцентная микроскопия бактериальных трансформантов. Бактериальные трансформанты, экспрессирующие нативный TagRFP (1), бактериальные трансформанты, экспрессирующие LicB/53EGFP/99RFP (2), бактериальные трансформанты, с пустым pQE вектором (3). I – бактериальные клетки в проходящем свете; II – визуализация флуоресценции RFP в бактериальных клетках. С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

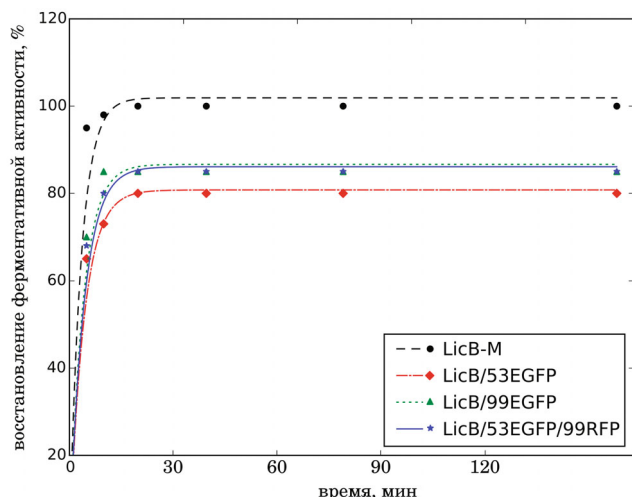


Рис. 4. Способность лихеназы к рефолдингу *in vitro*. Кинетика рефолдинга *in vitro* лихеназы LicB-M и белков с инсерцией доменов LicB/53EGFP, LicB/99EGFP и LicB/53EGFP/99RFP после денатурации мочевиной. С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

тель, который позволяет однозначную дискриминацию функциональной укладки этого белка.

Для определения кинетики рефолдинга *in vitro* лихеназы LicB-M и белков с инсерцией доменов LicB/53EGFP, LicB/99EGFP и LicB/53EGFP/99RFP использовали концентрацию мочевины и условия инкубации, ранее указанные для EGFP [33]. Способность этих белков складываться *in vitro* первоначально исследована за счет определения степени восстановления активности лихеназы. Так, исходный вариант лихеназы (LicB-M) повторно сворачивается *in vitro* с практически полной обратимостью, восстановленная активность после проведения цикла рефолдинга *in vitro* для вариантов белков с

инсерцией доменов (LicB/53EGFP, LicB/99EGFP и LicB/53EGFP/99RFP) составляет 80–85% от начальной активности лихеназы у этих белков (рис. 4). Рефолдинг вариантов лихеназы с инсерцией доменов измерен и по восстановлению флуоресценции EGFP и TagRFP в конечной точке – 160 мин. Оказалось, что белки LicB/53EGFP, LicB/99EGFP и LicB/53EGFP/99RFP проявляли флуоресценцию с максимумами возбуждения / эмиссии, характерными для EGFP (488 и 507 нм) (рис. S1 в Приложении), а вариант LicB/53EGFP/99RFP – для TagRFP (555 и 584 нм).

Дополнительно оценена и возможность рефолдинга *in vitro* лихеназы после осаждения этанолом всех вариантов белков с инсерциями доменов. Показано, что как для исходного варианта (LicB-M), так и для всех вариантов белков с инсерцией домена, ферментативная активность лихеназы не только сохраняется, но достоверно увеличивается ($\geq 10\times$) (табл. 2). Такое увеличение уровня ферментативной активности может быть объяснено значительным уменьшением доли прочих суммарных растворимых белков (от 10 до 20 раз) в образцах белков после осаждения этанолом (табл. 2). При этом вставленные домены (EGFP и TagRFP) у LicB/53EGFP, LicB/99EGFP и LicB/53EGFP/99RFP также способны к рефолдингу *in vitro* после денатурации этанолом (данные не показаны).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В этом исследовании мы определили влияние инсерции домена(ов) размером более чем 200 а.о. в две области термостабильной лихеназы на способность к укладке в функциональную конформацию лихеназы и модельных флуоресцентных белков, использованных как «guest»-домены.

Таблица 2. Активность лихеназы и уровень суммарных растворимых белков до и после осаждения этанолом

Название белка	Активность лихеназы, ед/мкгСРБ		Уровень СРБ, мкг/мкл	
	До осаждения этанолом	После осаждения этанолом	До осаждения этанолом	После осаждения этанолом
NC-L-53-99	25,46 ± 2,11	267,76 ± 1,58	0,75 ± 0,05	0,03 ± 0,01
EGFP	n/d	n/d	n/d	n/d
RFP	n/d	n/d	n/d	n/d
NC-EGFP-53	21,25 ± 1,23	211,48 ± 1,42	0,55 ± 0,05	0,06 ± 0,01
NC-EGFP-99	11,35 ± 1,31	115,31 ± 1,85	0,65 ± 0,05	0,04 ± 0,01
NC-EGFP-53-RFP-99	12,45 ± 1,51	106,55 ± 1,43	0,35 ± 0,05	0,03 ± 0,01

СРБ – суммарный растворимый белок.

Положения вставок в лихеназе, в целом, были выбраны с опорой на общий критерий: они расположены на поверхности петель и не принимают непосредственное участие в формировании каталитического сайта. Согласно экспериментальным данным, только правильно выбранные петлевые участки могут выдерживать вставки без драматической потери функциональной укладки [39–41]. Например, для PGK показано, что только две петлевые области из четырех апробированных допускают вставку двух разных «guest»-доменов в двух разных областях [12]. Нами ранее продемонстрировано, что только две петлевые области 53 и 99 а.о. из трех экспериментально апробированных допускали введение круговых перестановок и толерантны к интеграции небольших пептидов [28].

Сохранение ферментативной активности у вариантов лихеназы со вставками крупных доменов (рис. 1–3) демонстрирует, что крупные структурированные вставки могут быть введены в лихеназу в двух экспериментально выбранных областях. Отметим, что каталитический домен лихеназы имеет классическую структуру домена типа β -«jelly roll», характерную для семейства гликозид гидролаз 16 (GH16), которая удивительно устойчива к изменениям аминокислотной последовательности и топологии цепи [5, 42], что, вероятно, способствует образованию стабильной и функциональной укладки лихеназы при inserции крупных доменов в двух экспериментально подобранных областях.

Нами отмечено и отсутствие значимых различий в продукции нативных белков и белков с inserцией домена(ов) (рис. 2, в и 3, а). Известно, что в случае, когда *N*- или *C*-концевые области «guest»-домена достаточно далеки друг от друга, это сокращает число степеней свободы в динамике белков, и может вызвать нежелательные последствия, такие как неправильный фолдинг белков, низкий уровень продукции белков и нарушение биологической активности за счет стерических затруднений [12]. EGFP и TagRFP, использованные нами в качестве «guest»-доменов, характеризуются относительной близостью *N*- и *C*-концевых областей [36–39], что, вероятно, сопутствовало успеху конструирования стабильных и функционально активных вариантов лихеназы с inserцией доменов. Таким образом, нами показана толерантность белковой структуры лихеназы для больших встроек (рис. 2 и 3), которые не вызывают стерических затруднений для функциональной укладки лихеназы [16].

Флуоресцентные белки имеют уникальный хромофор, и характеристики флуоресценции чувствительны к структуре белка, а перенос энергии к хромофору в нейтральном состоянии

существует только в нативном состоянии белка [37]. Для мониторинга функциональной укладки флуоресцентных белков мы применили методы, которые подтвердили, что флуоресцентные белки, как «guest»-домены, способны к образованию функциональной конформации при одиночной и tandemной inserции в термостабильную лихеназу (рис. 2, б и д; 3, в и рис. S1 в Приложении).

Таким образом, сохранение ферментативной активности лихеназы и флуоресценции EGFP и TagRFP у вариантов лихеназы с inserцией доменов позволяет предположить, что: (i) расстояния между структурными элементами могут быть не критичными для формирования функционально активного домена лихеназы типа «jelly roll»; (ii) EGFP и TagRFP могут быть вставлены в выбранные области лихеназы и иметь независимые единицы укладки и функционирования, в том числе и за счет близости их *N*- и *C*-концевых областей.

Продemonстрировано, что как лихеназа, так и флуоресцентные белки, которые выступают в роли «host»- и «guest»-белков соответственно, не теряют способность к повторной укладке *in vitro* после воздействия денатурирующих факторов. Прежде всего мы отметили, что у всех вариантов лихеназы сохраняется способность к ренатурации до активной формы фермента в геле после электрофореза в денатурирующих условиях (рис. 2, г и 3, б). Полученные результаты позволяют судить о том, что повторная укладка этих белков возможна после денатурации, но не позволяют сделать заключение о том, насколько она эффективна. Другими словами, на основании анализа энзимогамм невозможно оценить относительную скорость процесса рефолдинга лихеназы и пропорцию фракции белка в нативном и денатурированном состояниях на пути укладки белков с inserцией доменов при рефолдинге.

Сравнение кривых кинетики рефолдинга у исходного варианта лихеназы и всех вариантов с inserцией доменов демонстрирует относительно высокую эффективность повторной укладки белков (рис. 4). Известно, что денатурация флуоресцентного белка, как правило, нарушает флуоресценцию [43], и изменения в структуре флуоресцентного белка могут быть оценены по отклонениям спектра его возбуждения [38]. Отсутствие отклонений в спектрах возбуждения свидетельствует о том, что флуоресцентные белки, как «guest»-домены, при их inserции в лихеназу также не теряют способность к повторной укладке *in vitro* (рис. S1 в Приложении). Учитывая, что полупериод рефолдинга EGFP на порядок выше, чем таковые у вариантов лихеназы с ин-

серцией доменов, можно предположить потенциально возможный путь укладки этих белков — это путь укладки в начале принимающего белка, а затем белка вставки. Это подтверждает гипотезу о том, что если сложенное состояние белка стабильно, то процесс укладки не сильно сдерживается и не требует строгого упорядочения или координации [18, 24, 42].

Следует отметить несколько примечательных свойств термостабильной лихеназы при использовании ее в качестве принимающего белка. Во-первых, белок сохраняет функциональную укладку при значительных размерах встраиваемых доменов (рис. 1, 2, 3), хотя, как правило, при использовании подхода инсерции встраиваемый домен короче, чем принимающий белок [12]. Во-вторых, метод энзимогамм позволяет точно определять молекулярные массы белков, сконструированных с использованием лихеназы (рис. 2, *г* и 3, *б*), и характеризуется высокой чувствительностью [13, 28]. Дополнительно метод энзимогамм позволяет быстро оценить белки на способность к ренатурации *in vitro* (рис. 2, *г* и 3, *б*). В-третьих, высокий уровень термостабильности лихеназы, а также сохранение лихеназой функциональной укладки после осаждения нецелевых белков этанолом могут быть использованы для быстрой и экономичной очистки белковых лизатов (табл. 2). Так, ранее показано, что за счет термообработки при 65 °C удаляется до 50% загрязняющих белков, оставляя слитые с лихеназой белки сохраненными [13]. В-четвертых, термостабильная лихеназа может быть использована для «guest»-белков, которые стабильны только в узком диапазоне pH и температур, поскольку сама функционирует в широком диапазоне температур и pH. Это свойство, в целом, может оказаться полезным и для увеличения стабильности белков, сконструированных с использованием лихеназы, и, в част-

ности, при длительном хранении белковых препаратов в контейнере закрытой системы, который подвержен изменениям температуры, что, как следствие, часто приводит к агрегации и деградации белкового препарата [5, 13]. В-пятых, слитые белки, сконструированные на основе термостабильной лихеназы, могут быть наработаны не только в бактериальной системе, но и на основе иных экспрессионных платформ — дрожжи, растения, клетки млекопитающих, как это было продемонстрировано в ряде работ [31, 44].

Таким образом, наши результаты убедительно свидетельствуют о том, что термостабильная лихеназа *C. thermocellum* может быть включена в список «host»-белков, способных допускать не только одиночные, но и тандемные вставки доменов, который ранее включал фосфоглицерат киназу (PGK) [12] и β -лактамазу (BLA) [27], и имеет преимущества, связанные с ее примечательными свойствами. Эти свойства делают термостабильную лихеназу крайне привлекательной в качестве нового принимающего «host»-белка при использовании подхода инсерционного слияния доменов для инженерии многофункциональных белков. Тем не менее в будущем требуется проверка сохранения функциональной укладки лихеназы с другими вставленными белками.

Финансирование. Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 16-34-00249; ААТ).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cota, J., Oliveira, L.C., Damasio, A.R., Citadini, A.P., Hoffmam, Z.B., Alvarez, T.M., Codima, C.A., Leite, V.B., Pastore, G., de Oliveira-Neto, M., Murakami, M.T., Ruller, R., and Squina, F.M. (2013) Assembling a xylanase-lichenase chimera through all-atom molecular dynamics simulations, *Biochim. Biophys. Acta*, **1834**, 1492–1500, doi: 10.1016/j.bbapap.2013.02.030.
2. Furtado, G.P., Ribeiro, L.F., Lourenzoni, M.R., and Ward, R.J. (2013) A designed bifunctional laccase/beta-1,3-1,4-glucanase enzyme shows synergistic sugar release from milled sugarcane bagasse, *Protein Eng. Des. Sel.*, **26**, 15–23, doi: 10.1093/protein/gzs057.
3. Liu, W.C., Lin, Y.S., Jeng, W.Y., Chen, J.H., Wang, A.H., and Shyur, L.F. (2012) Engineering of dual-functional hybrid glucanases, *Protein Eng. Des. Sel.*, **25**, 771–780, doi: 10.1093/protein/gzs083.
4. Rizk, M., Antranikian, G., and Elleuche, S. (2012) End-to-end gene fusions and their impact on the production of multifunctional biomass degrading enzymes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **428**, 1–5, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.09.142.
5. Goldenkova-Pavlova, I.V., Tyurin Acapital A.C., and Mustafae, O.N. (2018) The features that distinguish lichenases from other polysaccharide-hydrolyzing enzymes and the relevance of lichenases for biotechnological applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **102**, 3951–3965, doi: 10.1007/s00253-018-8904-x.
6. Faria, A.R., de Castro Veloso, L., Coura-Vital, W., Reis, A.B., Damasceno, L.M., Gazzinelli, R.T., and Andrade, H.M. (2015) Novel recombinant multiepitope proteins for the diagnosis of asymptomatic leishmania infantum-infected dogs, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **9**, e3429, doi: 10.1371/journal.pntd.0003429.

7. Jacquet, N., Navarre, C., Desmecht, D., and Boutry, M. (2014) Hydrophobin fusion of an influenza virus hemagglutinin allows high transient expression in *Nicotiana benthamiana*, easy purification and immune response with neutralizing activity, *PLoS One*, **9**, e115944, doi: 10.1371/journal.pone.0115944.
8. Schmidt, S. R. (2013) *Fusion protein technologies for biopharmaceuticals: applications and challenges*, John Wiley & Sons.
9. Schoeffler, A.J., May, A.P., and Berger, J.M. (2010) A domain insertion in *Escherichia coli* GyrB adopts a novel fold that plays a critical role in gyrase function, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 7830–7844, doi: 10.1093/nar/gkq665.
10. Betton, J.M., Jacob, J.P., Hofnung, M., and Broome-Smith, J.K. (1997) Creating a bifunctional protein by insertion of beta-lactamase into the maltodextrin-binding protein, *Nat. Biotechnol.*, **15**, 1276–1279, doi: 10.1038/nbt1197-1276.
11. Ay, J., Gotz, F., Borriss, R., and Heinemann, U. (1998) Structure and function of the Bacillus hybrid enzyme GluXyn-1: native-like jellyroll fold preserved after insertion of autonomous globular domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6613–6618, doi: 10.1073/pnas.95.12.6613.
12. Yu, K., Liu, C., Kim, B.G., and Lee, D.Y. (2015) Synthetic fusion protein design and applications, *Biotechnol. Adv.*, **33**, 155–164, doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.11.005.
13. Tyurin, A.A., Kabardaeva, K.V., Mustafaev, O.N., Pavlenko, O.S., Sadovskaya, N.S., Fadeev, V.S., Zvonova, E.A., and Goldenkova-Pavlova, I.V. (2018) Expression of soluble active interferon alphaA in *Escherichia coli* periplasm by fusion with thermostable lichenase using the domain insertion approach, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 259–269, doi: 10.1134/S0006297918030069.
14. Biondi, R.M., Veron, M., Baehler, P.J., and Raymond, C.D. (1998) Random insertion of GFP into the cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit from *Dictyostelium discoideum*, *Nucleic Acids Res.*, **26**, 4946–4952, doi: 10.1093/nar/26.21.4946.
15. Guntas, G., Mitchell, S.F., and Ostermeier, M. (2004) A molecular switch created by in vitro recombination of nonhomologous genes, *Chem. Biol.*, **11**, 1483–1487, doi: 10.1016/j.chembiol.2004.08.020.
16. Kanwar, M., Wright, R.C., Date, A., Tullman, J., and Ostermeier, M. (2013) Protein switch engineering by domain insertion, *Methods Enzymol.*, **523**, 369–388, doi: 10.1016/B978-0-12-394292-0.00017-5.
17. Simm, A.M., Baldwin, A.J., Busse, K., and Jones, D.D. (2007) Investigating protein structural plasticity by surveying the consequence of an amino acid deletion from TEM-1 beta-lactamase, *FEBS Lett.*, **581**, 3904–3908, doi: 10.1016/j.febslet.2007.07.018.
18. Edwards, W.R., Busse, K., Allemann, R.K., and Jones, D.D. (2008) Linking the functions of unrelated proteins using a novel directed evolution domain insertion method, *Nucleic Acids Res.*, **36**, e78, doi: 10.1093/nar/gkn363.
19. Bliven, S., and Prlic, A. (2012) Circular permutation in proteins, *PLoS Comput. Biol.*, **8**, e1002445, doi: 10.1371/journal.pcbi.1002445.
20. Jones, A.M., Mehta, M.M., Thomas, E.E., Atkinson, J.T., Segall-Shapiro, T.H., Liu, S., and Silberg, J.J. (2016) The structure of a thermophilic kinase shapes fitness upon random circular permutation, *ACS Synth. Biol.*, **5**, 415–425, doi: 10.1021/acssynbio.5b00305.
21. Selvam, R.A., and Sasidharan, R. (2004) DomIns: a web resource for domain insertions in known protein structures, *Nucleic Acids Res.*, **32**, D193–D195, doi: 10.1093/nar/gkh047.
22. Kufner, K., and Lipps, G. (2013) Construction of a chimeric thermoacidophilic beta-endoglucanase, *BMC Biochem.*, **14**, 11, doi: 10.1186/1471-2091-14-11.
23. Peng, Q., and Li, H. (2009) Direct observation of tug-of-war during the folding of a mutually exclusive protein, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 13347–13354, doi: 10.1021/ja903480j.
24. Pierre, B., Xiong, T., Hayles, L., Guntaka, V.R., and Kim, J.R. (2011) Stability of a guest protein depends on stability of a host protein in insertional fusion, *Biotechnol. Bioeng.*, **108**, 1011–1020, doi: 10.1002/bit.23039.
25. Ribeiro, L.F., Furtado, G.P., Lourenzoni, M.R., Costa-Filho, A.J., Santos, C.R., Nogueira, S.C., Betini, J.A., Polizeli Mde, L., Murakami, M.T., and Ward, R.J. (2011) Engineering bifunctional laccase-xylanase chimeras for improved catalytic performance, *J. Biol. Chem.*, **286**, 43026–43038, doi: 10.1074/jbc.M111.253419.
26. Elleuche, S. (2015) Bringing functions together with fusion enzymes – from nature’s inventions to biotechnological applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99**, 1545–1556, doi: 10.1007/s00253-014-6315-1.
27. Edwards, W.R., Williams, A.J., Morris, J.L., Baldwin, A.J., Allemann, R.K., and Jones, D.D. (2010) Regulation of beta-lactamase activity by remote binding of heme: functional coupling of unrelated proteins through domain insertion, *Biochemistry*, **49**, 6541–6549, doi: 10.1021/bi100793y.
28. Tyurin, A.A., Sadovskaya, N.S., Nikiforova, K.R., Mustafaev, O.N., Komakhin, R.A., Fadeev, V.S., and Goldenkova-Pavlova, I.V. (2015) Clostridium thermocellum thermostable lichenase with circular permutations and modifications in the N-terminal region retains its activity and thermostability, *Biochim. Biophys. Acta*, **1854**, 10–19, doi: 10.1016/j.bbapap.2014.10.012.
29. Schimming, S., Schwarz, W.H., and Staudenbauer, W.L. (1992) Structure of the Clostridium thermocellum gene licB and the encoded β -1,3-1,4-glucanase, *Eur. J. Biochem.*, **204**, 13–19, doi: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb16600.x.
30. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
31. Piruzian, E.S., Goldenkova, I.V., Musiychuk, K.A., Kobets, N.S., Arman, I.P., Bobrysheva, I.V., Chekhuta, I.A., and Glazkova, D. (2002) A reporter system for prokaryotic and eukaryotic cells based on the thermostable lichenase from Clostridium thermocellum, *Mol. Genet. Genomics*, **266**, 778–786, doi: 10.1007/s00438-001-0595-8.
32. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254, doi: https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.
33. Evdokimov, A.G., Pokross, M.E., Egorov, N.S., Zraisky, A.G., Yampolsky, I.V., Merzlyak, E.M., Shkoporov, A.N., Sander, I., Lukyanov, K.A., and Chudakov, D.M. (2006) Structural basis for the fast maturation of Arthropoda green fluorescent protein, *EMBO Rep.*, **7**, 1006–1012, doi: 10.1038/sj.embor.7400787.
34. Kanzow, C., Yamashita, N., and Fukushima, M. (2004) Levenberg–Marquardt methods with strong local convergence properties for solving nonlinear equations with convex constraints, *J. Comput. Appl. Math.*, **172**, 375–397, doi: 10.1016/j.cam.2004.02.013.
35. Arpino, J.A., Rizkallah, P.J., and Jones, D.D. (2014) Structural and dynamic changes associated with beneficial engineered single-amino-acid deletion mutations in enhanced green fluorescent protein, *Acta Crystallogr. D*, **70**, 2152–2162, doi: 10.1107/S139900471401267X.
36. Merzlyak, E.M., Goedhart, J., Shcherbo, D., Bulina, M.E., Shcheglov, A.S., Fradkov, A.F., Gaintzeva, A., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S., Gadella, T.W., and Chudakov, D.M. (2007)

- Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime, *Nat. Methods*, **4**, 555–557, doi: 10.1038/nmeth1062.
37. Subach, O.M., Malashkevich, V.N., Zencheck, W.D., Morozova, K.S., Piatkevich, K.D., Almo, S.C., and Verkhusha, V.V. (2010) Structural characterization of acylimine-containing blue and red chromophores in mTagBFP and TagRFP fluorescent proteins, *Chem. Biol.*, **17**, 333–341, doi: 10.1016/j.chembiol.2010.03.005.
 38. Stepanenko, O.V., Stepanenko, O.V., Kuznetsova, I.M., Verkhusha, V.V., and Turoverov, K.K. (2013) Beta-barrel scaffold of fluorescent proteins: folding, stability and role in chromophore formation, *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.*, **302**, 221–278, doi: 10.1016/B978-0-12-407699-0.00004-2.
 39. Zoldak, G., Carstensen, L., Scholz, C., and Schmid, F.X. (2009) Consequences of domain insertion on the stability and folding mechanism of a protein, *J. Mol. Biol.*, **386**, 1138–1152, doi: 10.1016/j.jmb.2008.12.052.
 40. Zverlov, V.V., and Schwarz, W.H. (2008) Bacterial cellulose hydrolysis in anaerobic environmental subsystems – *Clostridium thermocellum* and *Clostridium stercorarium*, thermophilic plant-fiber degraders, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1125**, 298–307, doi: 10.1196/annals.1419.008.
 41. Viguera, A.-R., and Serrano, L. (1997) Loop length, intramolecular diffusion and protein folding, *Nature Struct. Biol.*, **4**, 939–946, doi: 10.1038/nsb1197-939.
 42. Bloom, J.D., Labthavikul, S.T., Otey, C.R., and Arnold, F.H. (2006) Protein stability promotes evolvability, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 5869–5874, doi: 10.1073/pnas.0510098103.
 43. Ward, W.W. (2006) Biochemical and physical properties of green fluorescent protein, *Methods Biochem. Anal.*, **47**, 39–66, doi: doi: 10.1002/0471739499.ch3.
 44. Gerasymenko, I., Sheludko, Y., Frabel, S., Staniek, A., and Warzecha, H. (2019) Combinatorial biosynthesis of small molecules in plants: engineering strategies and tools, *Methods Enzymol.*, **617**, 413–442, doi: 10.1016/bs.mie.2018.12.005.

THE THERMOSTABLE LICHENASE FROM *Clostridium thermocellum* AS A HOST PROTEIN IN THE DOMAIN INSERTION APPROACH

O. S. Pavlenko^{1*}, O. A. Gra¹, K. V. Kabarbaeva¹, O. N. Mustafaev², N. S. Sadovskaya¹,
V. S. Fadeev¹, A. A. Tyurin¹, and I. V. Goldenkova-Pavlova^{1*}

¹ *K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, 127276 Moscow, Russia; E-mail: Helliga.p@gmail.com, irengold58@gmail.com*

² *Baku State University, Department of Biophysics and Molecular Biology, Baku, AZ 1148, Azerbaijan; E-mail: orkhan@bioset.org*

Received March 3, 2019

Revised April 29, 2019

Accepted April 30, 2019

The *Clostridium thermocellum* lichenase (endo- β -1,3;1,4-glucan-D-glycosyl hydrolase, EC 3.2.1.73 (P29716)) has been tested as a protein hosting insertion of two model fluorescent proteins (EGFP and TagRFP) in two regions. Functional folding of all domains is confirmed by preserved lichenase activity and fluorescence of EGFP and TagRFP. The results demonstrate that (i) these two experimentally tested loop regions of the lichenase permit protein insertions without damaging its folding *in vivo*, and (ii) the lichenase permits not only single but also tandem insertions of large protein domains. High activity, thermostability, and efficient *in vitro* refolding of lichenase make it attractive as a new host protein in the domain insertion approach.

Keywords: lichenase, fluorescent proteins, single and tandem protein insertions