

ДЕЛЕЦИОННЫЕ ВАРИАНТЫ
АУТОТРАНСПОРТЕРА *Psychrobacter cryohalolentis*
ПОВЫШАЮТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭКСПОНИРОВАНИЯ ¹⁰FN3
НА ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК *Escherichia coli*

© 2022 Л.Н. Шингарова^{1*}, Л.Е. Петровская¹, Е.А. Крюкова¹, С.Ш. Гапизов^{1,2},
Е.Ф. Болдырева¹, 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 16.06.2022

После доработки 11.07.2022

Принята к публикации 11.07.2022

Аутоотранспортер AT877 *Psychrobacter cryohalolentis* относится к семейству белков внешней мембраны, содержащих *N*-концевой пассажирский и *C*-концевой транслокаторный домены и составляющих основу для конструирования систем дисплея на поверхности клеток бактерий. Ранее мы показали, что пассажирский домен AT877 может быть заменен холодоактивной эстеразой EstPc или 10-м доменом фибронектина III-го типа (¹⁰Fn3). С целью повышения эффективности поверхностного дисплея ¹⁰Fn3 в клетках *Escherichia coli* получены 4 делеционных варианта гибридного аутоотранспортера Fn877. Установлено, что все варианты обнаруживаются в мембране бактериальных клеток и обеспечивают связывание специфических к ¹⁰Fn3 антител на поверхности клетки. Наиболее высокий уровень связывания обеспечивают варианты Δ239 и Δ310, содержащие 4 и 7 бета-тяжей из 12, составляющих структуру транслокаторного домена. С помощью электрофореза в полунативных условиях продемонстрировано наличие тепловой модифицируемости полноразмерного Fn877 и его делеционных вариантов, что указывает на сохранение бета-структуры в их молекулах. Полученные результаты могут быть использованы для оптимизации систем бактериального дисплея ¹⁰Fn3, а также других гетерологичных пассажирских доменов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: секреция, аутоотранспортер, делеционные варианты, 10-й домен фибронектина человека III-го типа, бактериальный дисплей.

DOI: 10.31857/S0320972522090044, **EDN:** BALEXT

ВВЕДЕНИЕ

Аутоотранспортеры (АТ) представляют собой семейство белков внешней мембраны грамотрицательных бактерий, использующих в процессе экспорта систему секреции V-го типа [1]. Они играют важную роль в процессах вирулентности и выживания различных микроорганизмов, включая патогенные. Молекулы зрелых АТ состоят из *N*-концевого пассажирского и *C*-концевого транслокаторного доменов, соединенных альфа-спиральным сегментом (линкером). Общей чертой строения

транслокаторных доменов АТ является наличие структуры типа бета-бочонка, который включает в себя 12 амфипатических бета-тяжей [2, 3].

Транспорт АТ в периплазматическое пространство осуществляется с участием Sec-аппарата бактериальной клетки. АТ синтезируются в виде предшественников, содержащих *N*-концевую сигнальную последовательность, которая отщепляется в процессе транспорта. В процессе секреции компетентное состояние АТ поддерживается благодаря взаимодействию с шаперонами (SurA, Skp и др.), а также характерной для них низкой скорости сворачивания [4, 5]. Встраивание АТ во внешнюю мем-

Принятые сокращения: АТ – аутоотранспортер; ¹⁰Fn3 – 10-й домен фибронектина человека III-го типа; IPTG – изопропил-β-D-тиогаляктопиранозид; PBS – фосфатно-солевой буфер.

* Адресат для корреспонденции.

брану происходит с участием белков Bam-комплекса, который включает в себя интегральный белок BamA и липопротеины BamB–E [6, 7].

Установлено, что природный пассажирский домен АТ в ряде случаев может быть заменен другим белком. Такой подход лежит в основе конструирования систем дисплея рекомбинантных белков на поверхности клеток бактерий [8–10], которые могут быть использованы в ряде биотехнологических и промышленных областей, включая разработку живых вакцин, конструирование и скрининг комбинаторных библиотек, получение биоадсорбентов для удаления из окружающей среды вредных химических веществ и тяжелых металлов, получение цельноклеточных биокатализаторов для диагностических, промышленных приложений и биоремедиации окружающей среды [11, 12].

Нами была сконструирована система клеточного дисплея на поверхности клеток *Escherichia coli* на основе аутопортера АТ877 грамотрицательной бактерии *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T [13]. Природный пассажирский домен АТ877, представляющий собой липазу семейства GDSL, был заменен холодоактивной эстеразой EstPc *P. cryohalolentis* [13, 14], а также доменом 10 фибронектина III-го типа человека (¹⁰Fn3) [15]. ¹⁰Fn3 является популярным каркасным белком, на основе которого могут быть получены искусственные связывающие молекулы – аналоги антител, обладающие небольшим размером и высокой стабильностью [16–18]. Установлено, что рекомбинантные пассажирские домены экспонированы на поверхности клеток и демонстрируют характерные каталитические свойства (в случае EstPc) или связывание специфических антител (в случае ¹⁰Fn3).

Следует отметить, что уровень экспрессии ¹⁰Fn3 в качестве пассажирского домена АТ877 на поверхности клеток *E. coli* оказался сравнительно низким [15], предположительно, вследствие высокой скорости сворачивания белка в цитоплазме клеток [19]. Размещение холодоактивной эстеразы EstPc на N-конце

пассажирского домена способствовало повышению эффективности поверхностного дисплея ¹⁰Fn3 [15], что позволило провести отбор библиотеки ФНО-связывающих вариантов данного каркасного белка [20]. Однако присутствие EstPc в составе пассажирского домена может оказаться нежелательным, например, в случае терапевтического использования полученных конструкций.

В данной работе нами получен и исследован ряд делеционных мутантов Fn877 и обнаружены варианты, демонстрирующие повышенную эффективность транспорта ¹⁰Fn3 на поверхности клетки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали реактивы фирм «Bio-Rad» США, «Merck» США, «Panreac» Испания; компоненты сред для культивирования бактерий («Difco», 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. Для конструирования делеционных вариантов Fn877 проводили ПЦР с праймерами, приведенными в таблице.

Фрагменты клонировали в вектор pET20b по сайтам *NcoI* и *XhoI*, аналогично гену исходного белка, и подтверждали последовательность вставки секвенированием («Евроген»).

Выделение мембранной фракции. Культуру клеток штамма *E. coli* C41(DE3) («Avidis SA», Франция), трансформированную одной из плазмид, выращивали в LB с ампициллином (100 мкг/мл) при 37 °С до значения ОП при 560 нм 0,5–0,7, индуцировали экспрессию белка добавлением 0,2 мМ изопропил-β-D-тио-галактопиранозид (IPTG), после чего продол-

Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для конструирования делеционных вариантов Fn877

Название	5'→3' последовательность праймеров	Длина, н.п.
D239rev	TTCTCCTCGAGCTGCACGCCCAAGCTT	29
D261rev	TTCTCCTCGAGGCCACCAAGTGTGACCGCA	30
D285rev	ACATCTCGAGCATCGGATATCCTGCCTGC	29
D310rev	TTCTCCTCGAGTTCTTTTAGCGCGTCCAATC	31

жали культивирование в течение 1,5 ч при 25 °С в присутствии 5 мМ MgCl₂. Клетки осаждали при 2700 g 10 мин при 5 °С, 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 обработкой ультразвуком с использованием Branson Digital Sonifier («Emerson», США). Суспензию центрифугировали 30 мин при 6000 g. Полученный супернатант центрифугировали 1 час при 100 000 g, и суспендировали осадок мембранной фракции в 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0).

Для анализа при помощи **Вестерн-блота** разделенные гель-электрофорезом в 10%-ном SDS-ПААГ по методу Лэммли белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad»). После инкубации в растворе 1%-го BSA в TBS (20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 150 мМ NaCl) в течение 1 ч при 37 °С 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).

Для проведения **ELISA** на целых клетках культуру выращивали, как описано выше. Клетки осаждали при 2700 g 6 мин при 5 °С, дважды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) в присутствии 5 мМ MgCl₂ и центрифугировали в тех же условиях. Доводили мутность суспензии до ОП = 1 при 560 нм и наносили по 100 мкл в лунки планшета для ELISA («Corning», США) в трех повторностях. Клетки высушивали 20 ч в термостате при 37 °С, блокировали 2%-ным BSA и промывали PBST (PBS + 0,1% (v/v) Tween-20).

Моноклональные антитела к ¹⁰Fn3 («Hybridoma Laboratories», Россия) добавляли в соотношении 1/1000 в PBS + 1% BSA, выдерживали 1 ч при 37 °С и перемешивании. После удаления антител промывали лунки 3 раза по 5 мин PBST. Для визуализации иммунных комплексов использовали конъюгат анти-мышь-HRP («Sigma», США) в соотношении 1/10 000. После отмытки в лунки добавляли по 100 мкл TMB, выдерживали 4 мин, затем останавливали реакцию добавлением 10%-ной H₂SO₄. Интенсивность окрашивания измеряли при 450 нм с помощью ридера Model 680 («Bio-Rad»).

Для анализа экспонированности His-тага проводили ELISA в одну стадию, используя конъюгат моноклональных антител к His-тагу с пероксидазой («Invitrogen»).

Выделение рекомбинантных белков проводили из культуры клеток *E. coli* C41(DE3), содержащей одну из полученных плазмид и выращенной в присутствии 0,2 мМ IPTG при 37 °С в LB с ампициллином в течение 3 ч. Биомассу суспендировали в буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 200 мМ NaCl и 1 мМ фенолметилсульфонилфторида (PMSF), и разрушали клетки обработкой ультразвуком на ледяной бане в течение 6 мин при 50% мощности. Осадок после центрифугирования растворяли в буфере, содержащем 8 М мочевины, 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 200 мМ NaCl в течение 2 ч при комнатной температуре. После отделения нерастворенного материала центрифугированием супернатант наносили на колонку Ni-Sepharose FastFlow («GE Healthcare», США), уравновешенную тем же буфером с 6 М мочевиной, промывали этим буфером и элюировали буфером с 6 М мочевиной в присутствии 250 мМ имидазола. Фракции, содержащие очищенный белок по результатам электрофореза, объединяли. Для рефолдинга очищенных белков раствор белка порциями по 50 мкл добавляли в 0,5 мл буфера, содержащего 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 200 мМ NaCl, 1% LDAO (оксид лаурилдиметиламина) и перемешивали 1 ч при комнатной температуре, затем диализовали 2 раза против 100 мл буфера, содержащего 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 200 мМ NaCl, 0,05% LDAO.

Белковый электрофорез в полунативных условиях проводили, как описано ранее [21], с модификациями. Аликвоты очищенных белков после рефолдинга прогревали при 37 °С или 95 °С в течение 10 мин и наносили на гель в буфере для образцов, не содержащем SDS. Электрофорез проводили в системе MiniProtean («Bio-Rad») при 4 °С с использованием электрода буфера, не содержащего SDS.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Конструирование и экспрессия делеционных вариантов Fn877. Поскольку пространственная структура AT877 в настоящее время неизвестна, для локализации элементов вторичной структуры данного белка мы провели выравнивание аминокислотной последовательности его транслокаторного домена с последовательностью AT эстеразы EstA *Pseudomonas aeruginosa* [22]. Мы запланировали получение четырех делеционных вариантов, содержащих, соответственно, 4–7 бета-тяжей из 12, предположительно, имеющих в полноразмерном белке AT877 (рис. 1). Соответственно, в каче-

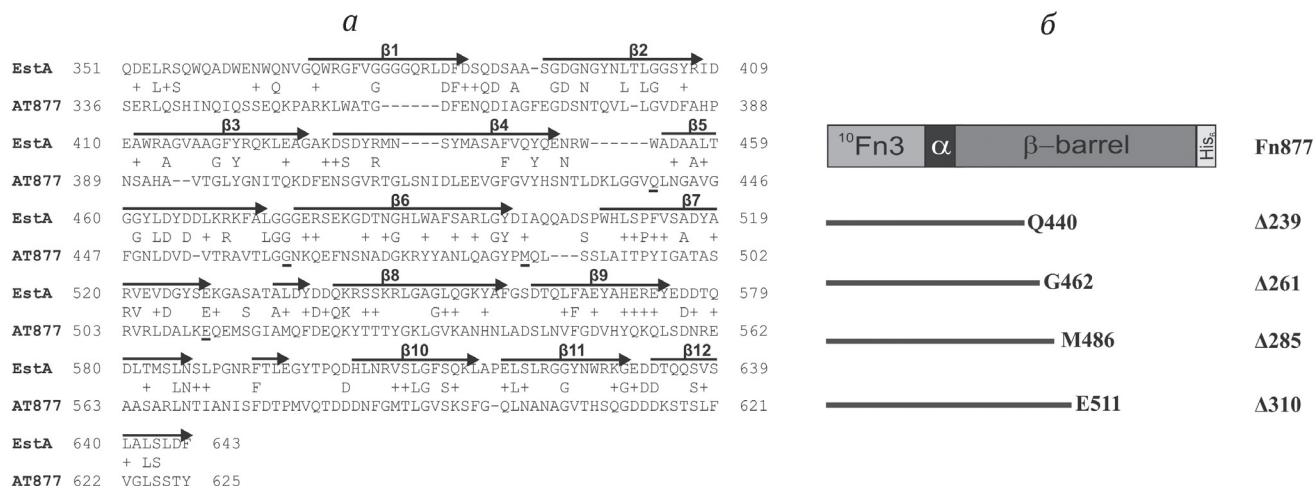


Рис. 1. Структура делеционных вариантов Fn877. *а* – Выравнивание аминокислотных последовательностей транслокаторных доменов AT877 и EstA *P. aeruginosa* с помощью Protein Blast. Расположение бета-тяжей в транслокаторном домене EstA (PDB: 3KVN) обозначено стрелками. С-концевые остатки делеционных вариантов Fn877 ($\Delta 239$, $\Delta 261$, $\Delta 285$ и $\Delta 310$ соответственно) подчеркнуты. *б* – Схемы Fn877 и делеционных вариантов. $^{10}\text{Fn3}$ – 10-й домен фибронектина человека III-го типа; α – альфа-спиральный линкер; β -barrel – транслокаторный домен AT877

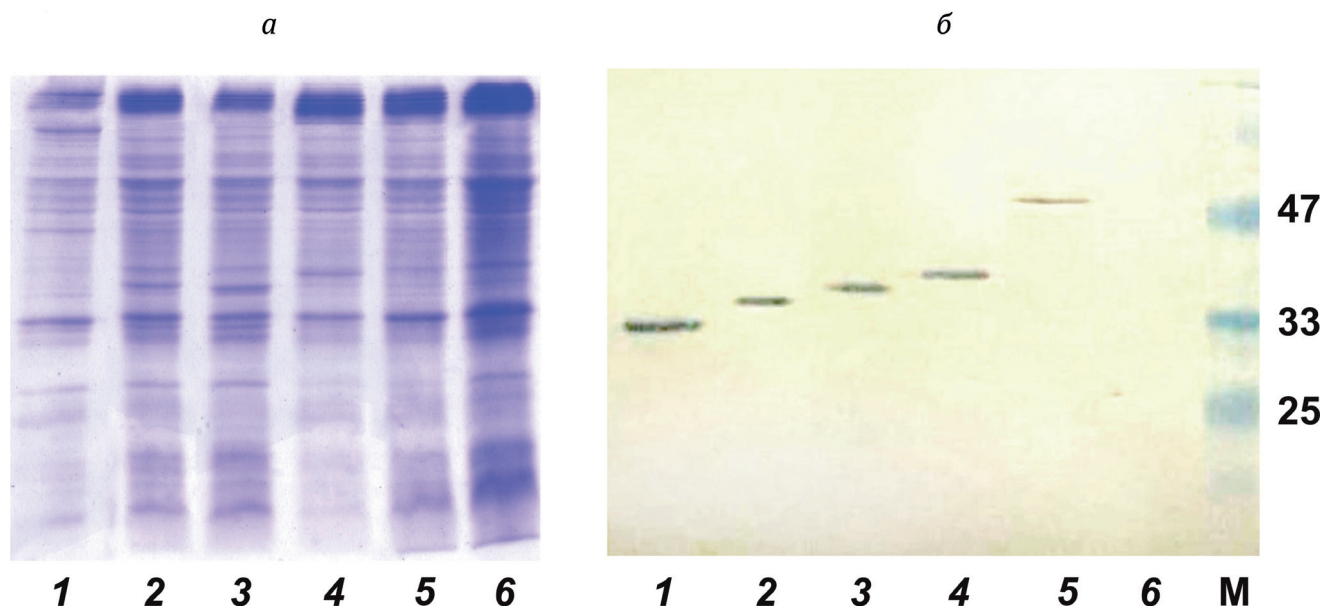


Рис. 2. Белковый электрофорез в 10%-ном ПААГ-SDS (*а*) и Вестерн-блот с анти-Нис конъюгатом (*б*) образцов мембранной фракции клеток С41(DE3), экспрессирующих делеционные варианты Fn877. Дорожки: 1 – $\Delta 239$; 2 – $\Delta 261$; 3 – $\Delta 285$; 4 – $\Delta 310$; 5 – Fn877; 6 – Fn877 без индукции (отрицательный контроль). М – маркеры молекулярного веса белков (кДа)

стве С-концевых были выбраны аминокислотные остатки, находящиеся на границе бета-тяжей – Q440, G462, M486 и E511.

Гены делеционных вариантов Fn877 $\Delta 239$, $\Delta 261$, $\Delta 285$ и $\Delta 310$ (цифра обозначает число аминокислотных остатков в рекомбинантном АТ после отщепления сигнального пептида) были получены с помощью ПЦР и клонированы в вектор pFn877, содержащий кодирующие последовательности $^{10}\text{Fn3}$, альфа-спирального линкера и транслокаторного домена AT877 под контролем промотора T7lac [15]. Экспрессию полученных генов осуществляли в клетках

E. coli штамма С41(DE3), оптимизированного для синтеза мембранных белков [23]. Для определения локализации полученных гибридных АТ проведено исследование мембранных фракций клеток *E. coli* с помощью белкового электрофореза и Вестерн-блота с антителами к гексагистидиновой последовательности. Установлено, что все укороченные варианты АТ обнаруживаются в мембранной фракции, при этом уровень их мембранной локализации превышает таковой в случае полноразмерного Fn877 (рис. 2). Необходимо отметить, что продолжительное культивирование приводило

к накоплению рекомбинантных АТ в нерастворимой фракции клеток в составе телец включения, как ранее было описано для Fn877 [15] и АТ877 [24]. Это было использовано в дальнейшем для получения белков в очищенном виде и рефолдинга (см. ниже).

Анализ экспонирования $^{10}\text{Fn3}$ на поверхности клеток *E. coli*. Для доказательства экспонирования пассажирского домена на поверхности клеток *E. coli*, экспрессирующих различные варианты Fn877, был проведен их анализ методом ELISA с использованием моноклональных антител к $^{10}\text{Fn3}$. Продемонстрировано, что все варианты обеспечивают связывание антител на клеточной поверхности, при этом наиболее высокий уровень связывания и, соответственно, экспонирования, в 3,3 раза превышающий контрольный (для клеток, экспрессирующих Fn877), демонстрирует вариант $\Delta 310$ (рис. 3, а). Делеционные варианты $\Delta 239$ и $\Delta 285$ обеспечивали в 2 раза более высокий уровень связывания по сравнению с Fn877, а вариант $\Delta 261$ практически не отличался от контроля.

Для того чтобы убедиться в целостности клеток в процессе выращивания и иммуноферментного анализа, мы провели аналогичный эксперимент с использованием антител к гексагистиридиновой последовательности. Поскольку С-конец АТ877, предположительно, ориентирован в периплазматическое пространство, в случае сохранения интактной клеточной мембраны взаимодействие с антителами к His-тагу должно быть гораздо ниже, чем при ее разрушении. Действительно, уровень сигнала, обеспечиваемый клетками с экспрессией $\Delta 239$ и $\Delta 310$ после обработки лизоцимом, оказался примерно в 4 раза выше, чем у клеток, не подвергавшихся такой обработке (данные не приведены), что доказывает отсутствие существенного лизиса.

Мы также получили делеционные варианты $23\Delta 239$ и $23\Delta 310$ гибридных АТ, содержащих

холодоактивную эстеразу EstPc на N-конце пассажирского домена [15], и изучили эффективность экспонирования $^{10}\text{Fn3}$ на поверхности клеток с помощью аналогичного подхода. Подобно 23Fn877 , содержащему полноразмерный транслокаторный домен, делеционные варианты обеспечивали существенно более высокий (в 4–6 раз выше) уровень сигнала по сравнению с Fn877. При этом, как выяснилось, делеции оказывают незначительное влияние на связывание антител к $^{10}\text{Fn3}$ клетками, экспрессирующими такие варианты, по сравнению с вариантом 23Fn877 (рис. 3, б).

Исследование фолдинга делеционных вариантов АТ877. Известно, что белки внешней мембраны, обладающие нативной конформацией, демонстрируют способность к так называемой «тепловой модифицируемости» [20, 25]. При соблюдении определенных условий наличие SDS в составе геля для электрофореза не приводит к денатурации таких белков благодаря высокой стабильности бета-структуры, содержащей большое количество водородных связей. Однако инкубация при высокой температуре разрушает эту структуру, в результате чего их электрофоретическая подвижность меняется. Таким образом, определение тепловой модифицируемости с помощью белкового электрофореза представляет собой стандартный тест для оценки правильного фолдинга белков внешней мембраны [25]. При этом в каждом случае требуется индивидуальный подбор методики подготовки образцов (состава буфера для нанесения, времени и температуры прогрева и т.п.), позволяющей различать нативное и денатурированное состояние.

Для того чтобы проверить наличие нативной конформации у полученных делеционных вариантов, мы провели очистку в денатурирующих условиях и рефолдинг белков $\Delta 239$, $\Delta 310$ и Fn877 из телец включения (рис. 4, а), после

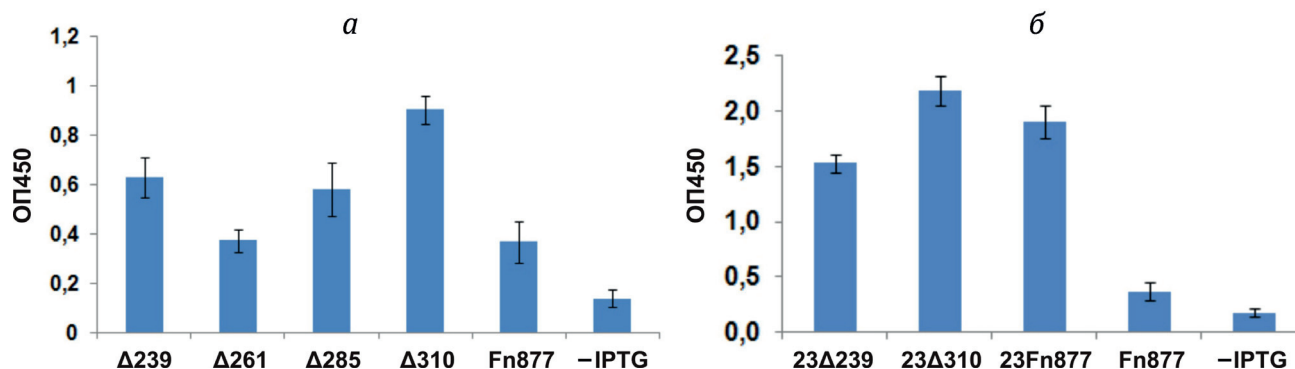


Рис. 3. Анализ методом ELISA с антителами к $^{10}\text{Fn3}$ экспонирования пассажирского домена на поверхности клеток *E. coli* C41(DE3), экспрессирующих варианты Fn877 (а) и варианты 23Fn877 (б). -IPTG – клетки, выращенные в тех же условиях без добавления IPTG (отрицательный контроль)

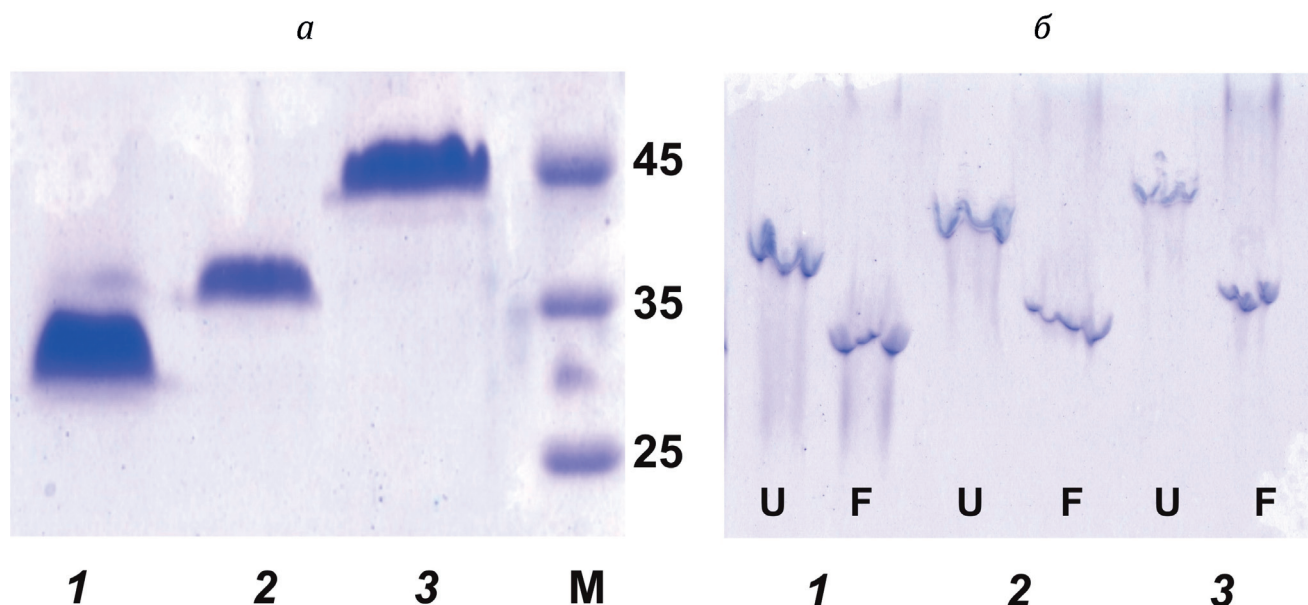


Рис. 4. Анализ фолдинга делеционных вариантов AT877. Белковый электрофорез в 10%-ном SDS-ПААГ в денатурирующих (а) и полунативных (б) условиях выделенных и рефолдированных белков $\Delta 239$ (дорожка 1), $\Delta 310$ (дорожка 2) и Fn877 (дорожка 3). Перед нанесением на гель образцы были прогреты при 37 °C (F) или 95 °C (U)

чего разработали протокол их анализа методом полунативного белкового электрофореза. Электрофоретическая подвижность образцов выделенных белков, прогретых при 95 °C, оказалась существенно ниже, чем у выдержанных при 37 °C (рис. 4, б), что указывает на присутствие нативной бета-структуры в молекулах исследованных вариантов AT.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Биогенез AT включает ряд последовательных стадий – синтез белка-предшественника в цитоплазме клеток, транспорт в периплазматическое пространство с отщеплением сигнальной последовательности и встраивание во внешнюю мембрану [1–4]. Структура природных AT оптимизирована таким образом, чтобы обеспечить координированное протекание различных этапов данного процесса с участием многочисленных клеточных факторов (аппарата трансляции, секреторного комплекса, шаперонов в цитоплазме и периплазме, Bam-комплекса и др.). Важную роль в нем играют свойства пассажирского и транслокаторного доменов.

Большинство пассажирских доменов AT обладает β -спиральной пространственной структурой [2]. Согласно принятой в настоящее время модели секреции, пассажирский домен преодолевает внешнюю мембрану в развернутой конформации. Сворачивание его C-концевого фрагмента, обладающего повышенной стабильностью (так называемого «аутошаперо-

на»), на клеточной поверхности предотвращает обратный транспорт в периплазму, в результате чего процесс приобретает необратимый характер [26, 27]. Эксперименты по фолдингу *in vitro* ряда пассажирских доменов AT показали, что стабильность их C-концевых фрагментов превышает стабильность N-концевых [27, 28].

Известно, что домен фибронектина обладает высокой скоростью сворачивания и стабильной структурой [20]. Мы предполагаем, что быстрый фолдинг гибридных AT, содержащих $^{10}\text{Fn3}$ в качестве пассажирского домена, является причиной низкого уровня его экспонирования на клеточной поверхности. Ранее нами был предложен оригинальный подход для оптимизации системы дисплея $^{10}\text{Fn3}$, который фактически представляет собой создание искусственного градиента стабильности с повышением ее в направлении C-конца этого домена [15]. Полученные в данной работе результаты открывают перспективы альтернативного подхода с использованием укороченных вариантов AT877. Мы показали, что наличие в составе транслокаторного домена 4 бета-тяжей из 12 достаточно для дисплея $^{10}\text{Fn3}$ в качестве пассажирского домена на поверхности клетки. При этом уровень экспонирования данного варианта в 2 раза превышает уровень Fn877. Увеличение числа бета-тяжей до 7 дополнительно повышает количество белка на поверхности клеток (более чем в 3 раза по сравнению с полноразмерным белком).

Необходимо отметить, что укорочение транслокаторных доменов AT, содержащих

эстеразу EstPc в составе пассажирского домена, не сопровождалось увеличением экспонированности $^{10}\text{Fn3}$ по сравнению с полноразмерным белком 23Fn877. Таким образом, два предложенных нами подхода повышения эффективности клеточного дисплея, вероятно, опосредуются различными механизмами и не дополняют друг друга.

Механизм секреции АТ на клеточную поверхность в настоящее время до конца не изучен, поэтому можно лишь предполагать, каким образом укорочение транслокаторного домена АТ877 способствует повышению эффективности клеточного дисплея $^{10}\text{Fn3}$ в *E. coli*. Известно, что размер центральной поры транслокаторного домена составляет 1–2 нм, что не позволяет разместить в ней свернутые белки [29]. Новейшие данные свидетельствуют о том, что в процессе транспорта BamA ассоциирует с транслокаторным доменом АТ с образованием гибридного бета-бочонка [30]. Таким образом, транслокация пассажирского домена происходит через пору, образованную BamA, что в результате может обеспечивать транспорт пассажирских доменов, содержащих структурированные элементы [2]. В этом случае решающим фактором, определяющим эффективность поверхностного дисплея, является взаимодействие транслокаторного домена с BamA, которое может происходить с разной эффективностью в случае различных вариантов Fn877.

Узнавание субстратов BamA происходит благодаря С-концевому мотиву АТ, включающему ароматический остаток (бета-сигнал) [31]. Известно, что подавляющее большинство белков внешней мембраны грамотрицательных бактерий в качестве С-концевого аминокислотного остатка содержит триптофан [32], в то время как аминокислотная последовательность АТ877 заканчивается остатком тирозина. В то же время установлено наличие в последовательности АТ альтернативных бета-сигналов, например, в составе 8-го бета-тяжа в случае EstA [33]. Конфигурация таких сигналов в составе транслокаторных доменов, полученных нами делеционных вариантов Fn877, может отличаться от полноразмерного, что, в свою очередь, должно оказывать влияние на их взаимодействие с BamA и эффективность дисплея пассажирского домена.

Нельзя исключить также существование механизма, включающего формирование олигомерных структур на основе укороченных вариантов транслокаторного домена АТ877. Типичные транслокаторные домены содержат 12 бета-тяжей, однако у представителей семейства тримерных АТ структура бета-бочонка

образуется за счет взаимодействия 4 бета-тяжей каждого из мономеров [34]. Мультимеризация бета-тяжей, по-видимому, представляет собой эволюционный механизм появления природных бета-структур [35] и может быть использована для их конструирования *in vitro*. Так, на основе белка внешней мембраны OmpX, содержащего 8 бета-тяжей, были получены белки, включающие до 16 бета-тяжей [36]. Показано, что OmpA может быть восстановлен из отдельно экспрессированных фрагментов, которые ассоциируются с образованием функционального белка в мембране [37] и *in vitro* [38]. Таким образом, точное установление механизма секреции вариантов Fn877 требует проведения дополнительных исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты свидетельствуют в пользу того, что укороченные варианты Fn877 обладают нативной бета-структурой и локализованы во внешней мембране *E. coli*, что обеспечивает экспонирование пассажирского домена на поверхности клеток. Белки семейства АТ являются одними из наиболее часто используемых для создания систем клеточного дисплея, однако его эффективность может варьировать в зависимости от природы пассажирского и транслокаторного доменов. Предложенный в данной работе подход к повышению эффективности транспорта гибридного АТ, включающего $^{10}\text{Fn3}$ в качестве пассажирского домена, может быть использован для оптимизации систем бактериального дисплея данного каркасного белка, а также других гетерологичных пассажирских доменов.

Вклад авторов. Л.Н. Шингарова, Л.Е. Петровская, М.П. Кирпичников – концепция и руководство работой; Л.Н. Шингарова, Е.А. Крюкова, С.Ш. Гапизов, Е.Ф. Болдырева – 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 при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1354 от 07.10.2021).

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

- Dautin, N., and Bernstein, H. D. (2007) Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway, *Annu. Rev. Microbiol.*, **61**, 89-112, doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093233.
- 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.
- Grijpstra, J., Arenas, J., Rutten, L., and Tommassen, J. (2013) Autotransporter secretion: varying on a theme, *Res. Microbiol.*, **164**, 562-582, doi: 10.1016/j.resmic.2013.03.010.
- Leyton, D. L., Rossiter, A. E., and Henderson, I. R. (2012) From self sufficiency to dependence: mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis, *Nat. Rev. Microbiol.*, **10**, 213-225, doi: 10.1038/nrmicro2733.
- Selkrig, J., Leyton, D. L., Webb, C. T., and Lithgow, T. (2014) Assembly of β -barrel proteins into bacterial outer membranes, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1843**, 1542-1550, doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.10.009.
- Ieva, R., Tian, P., Peterson, J. H., and Bernstein, H. D. (2011) Sequential and spatially restricted interactions of assembly factors with an autotransporter β domain, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **108**, E383-E391, doi: 10.1073/pnas.1103827108.
- 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.
- Lee, S. Y., Choi, J. H., and Xu, Z. (2003) Microbial cell-surface display, *Trends Biotechnol.*, **21**, 45-52, doi: 10.1016/s0167-7799(02)00006-9.
- 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.
- 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.
- Jose, J., Maas, R. M., and Teese, M. G. (2012) Autodisplay of enzymes – molecular basis and perspectives, *J. Biotechnol.*, **161**, 92-103, doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.04.001.
- Wu, C. H., Mulchandani, A., and Chen, W. (2008) Versatile microbial surface-display for environmental remediation and biofuels production, *Trends Microbiol.*, **16**, 181-188, doi: 10.1016/j.tim.2008.01.003.
- Petrovskaya, L., Novototskaya-Vlasova, K., Kryukova, E., Rivkina, E., Dolgikh, D., et al. (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.
- 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.
- Petrovskaya, L., Zlobinov, A., Shingarova, L., Boldyreva, E., Gapizov, S. S., et al. (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.
- Gebauer, M., and Skerra, A. (2020) Engineered protein scaffolds as next-generation therapeutics, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **60**, 391-415, doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021118.
- Chandler, P. G., and Buckle, A. M. (2020) Development and differentiation in monobodies based on the fibronectin type 3 domain, *Cells*, **9**, 610, doi: 10.3390/cells9030610.
- Akkapeddi, P., Teng, K. W., and Koide, S. (2021) Monobodies as tool biologics for accelerating target validation and druggable site discovery, *RSC Med. Chem.*, **12**, 1839-1853, doi: 10.1039/d1md00188d.
- Plaxco, K. W., Spitzfaden, C., Campbell, I. D., and Dobson, C. M. (1997) A comparison of the folding kinetics and thermodynamics of two homologous fibronectin type III modules, *J. Mol. Biol.*, **270**, 763-770, doi: 10.1006/jmbi.1997.1148.
- Shingarova, L., Petrovskaya, L., Zlobinov, A., Gapizov, S. S., Kryukova, E., et al. (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.
- Noinaj, N., Kuszak, A. J., and Buchanan, S. K. (2015) Heat modifiability of outer membrane proteins from Gram-negative bacteria, *Methods Mol. Biol. (Clifton, N.J.)*, **1329**, 51-56, doi: 10.1007/978-1-4939-2871-2_4.
- Van den Berg, B. (2010) Crystal structure of a full-length autotransporter, *J. Mol. Biol.*, **396**, 627-633, doi: 10.1016/j.jmb.2009.12.061.
- Miroux, B., and Walker, J. E. (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels, *J. Mol. Biol.*, **260**, 289-298, doi: 10.1006/jmbi.1996.0399.
- Petrovskaya, L. E., Ziganshin, R. H., Kryukova, E. A., Zlobinov, A. V., Gapizov, S. S., et al. (2021) Increased synthesis of a magnesium transporter MgtA during recombinant autotransporter expression in *Escherichia coli*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **193**, 3672-3703, doi: 10.1007/s12010-021-03634-5.
- Burgess, N. K., Dao, T. P., Stanley, A. M., and Fleming, K. G. (2008) β -Barrel proteins that reside in the *Escherichia coli* outer membrane *in vivo* demonstrate varied folding behavior *in vitro*, *J. Biol. Chem.*, **283**, 26748-26758, doi: 10.1074/jbc.M802754200.
- 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.
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. 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.
 29. Oomen, C. J., van Ulsen, P., Van Gelder, P., Feijen, M., Tommassen, J., et al. (2004) Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter, *EMBO J.*, **23**, 1257-1266, doi: 10.1038/sj.emboj.7600148.
 30. Doyle, M. T., and Bernstein, H. D. (2021) BamA forms a translocation channel for polypeptide export across the bacterial outer membrane, *Mol. Cell*, **81**, 2000-2012, doi: 10.1016/j.molcel.2021.02.023.
 31. Robert, V., Volokhina, E. B., Senf, F., Bos, M. P., Gelder, P. V., et al. (2006) Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif, *PLoS Biol.*, **4**, e377, doi: 10.1371/journal.pbio.0040377.
 32. Struyvé, M., Moons, M., and Tommassen, J. (1991) Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein, *J. Mol. Biol.*, **218**, 141-148, doi: 10.1016/0022-2836(91)90880-f.
 33. Celik, N., Webb, C. T., Leyton, D. L., Holt, K. E., Heinz, E., et al. (2012) A bioinformatic strategy for the detection, classification and analysis of bacterial autotransporters, *PLoS One*, **7**, e43245, doi: 10.1371/journal.pone.0043245.
 34. Meng, G., Surana, N. K., St. Geme III, J. W., and Waksman, G. (2006) Structure of the outer membrane translocator domain of the *Haemophilus influenzae* Hia trimeric autotransporter, *EMBO J.*, **25**, 2297-2304, doi: 10.1038/sj.emboj.7601132.
 35. Dhar, R., and Slusky, J. S. (2021) Outer membrane protein evolution, *Curr. Opin. Str. Biol.*, **68**, 122-128, doi: 10.1016/j.sbi.2021.01.002.
 36. Arnold, T., Poynor, M., Nussberger, S., Lupas, A. N., and Linke, D. (2007) Gene duplication of the eight-stranded β -barrel OmpX produces a functional pore: a scenario for the evolution of transmembrane β -barrels, *J. Mol. Biol.*, **366**, 1174-1184, doi: 10.1016/j.jmb.2006.12.029.
 37. Koebnik, R. (1996) *In vivo* membrane assembly of split variants of the *E. coli* outer membrane protein OmpA, *EMBO J.*, **15**, 3529-3537.
 38. Debnath, D., Nielsen, K. L., and Otzen, D. (2010) *In vitro* association of fragments of a β -sheet membrane protein, *Biophys. Chem.*, **148**, 112-120, doi: 10.1016/j.bpc.2010.03.004.

DELETION VARIANTS OF AUTOTRANSPORTER FROM *Psychrobacter cryohalolentis* INCREASE THE EFFICIENCY OF ¹⁰FN3 EXPOSURE ON THE SURFACE OF *Escherichia coli* CELLS

L. N. Shingarova^{1*}, L. E. Petrovskaya¹, E. A. Kryukova¹, S. S. Gapizov^{1,2},
E. F. Boldyreva¹, 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, 119234 Moscow, Russia*

The autotransporter AT877 from *Psychrobacter cryohalolentis* belongs to the family of outer membrane proteins containing the N-terminal passenger and C-terminal translocator domains and forming the basis for the design of display systems on the surface of bacterial cells. Earlier we showed that the passenger domain of AT877 can be replaced by the cold-active esterase EstPc or the tenth domain of fibronectin type III (¹⁰F_n3). In order to increase the efficiency of the ¹⁰F_n3 surface display in *Escherichia coli* cells, four deletion variants of the F_n877 hybrid autotransporter were obtained. It was found that all variants are detected in the membrane of bacterial cells and provide binding of specific antibodies to ¹⁰F_n3 on the cell surface. The highest level of binding is provided by variants Δ 239 and Δ 310, containing four and seven beta-strands out of twelve that comprise the structure of the translocator domain. Using electrophoresis under semi-native conditions, the presence of thermal modifiability in full-size F_n877 and its deletion variants was demonstrated which indicates the preservation of the beta structure in their molecules. The results obtained can be used to optimize the bacterial display systems of ¹⁰F_n3, as well as other heterologous passenger domains.

Keywords: secretion, autotransporter, deletion variants, 10th human fibronectin type III domain, bacterial display