

ПОЛУЧЕНИЕ ГАЛОФИЛЬНОЙ SS-N-АЦЕТИЛГЛЮКОЗАМИНИДАЗЫ АРХЕИ HALOMICROBIUM SP. LC1HM¹

1. RECOMBINANT EXPRESSION OF THE HALOPHILIC SS-N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE OF ARCHAEON HALOMICROBIUM SP. LC1HM

M. Shevchenko
V. Lisun
V. Skripskaya
M. Yakimov

Summary. Halophilic glycosyl hydrolases capable of degrading complex insoluble natural polysaccharides to soluble oligo- and monomers at high salinity are of great interest from the point of view of fundamental and applied science. Thanks to the screening of various highly saline habitats, many halophilic strains producing various extracellular hydrolases have been found. However, the main problem with using these enzymes is the difficulty in obtaining them. In this work, for the first time, archaeal extracellular glycosyl hydrolase of the GH20 family was successfully expressed using the *Haloferax volcanii* expression system.

Keywords: halophiles, halophilic glycoside hydrolases, cloning, shuttle vector, *Haloferax volcanii*.

Шевченко Маргарита Андреевна

Аспирант, Балтийский федеральный университет
им. И. Канта, Калининград
lionsorciere@gmail.com

Лисун Валерий Валерьевич

Балтийский федеральный университет
им. И. Канта, Калининград
lisun.valer@yandex.ru

Скрипская Виктория Валерьевна

Балтийский федеральный университет
им. И. Канта, Калининград
visknot@gmail.com

Якимов Михаил Михайлович

PhD, директор, Институт прибрежных морских
экосистем, Мессина, Италия
michailyakimov@iamc.cnr.it

Аннотация. Галофильные гликозил-гидролазы, способные к деградации сложных нерастворимых природных полисахаридов до растворимых олиго- и мономеров при повышенной солености, представляют высокий интерес с точки зрения фундаментальной и прикладной науки. Благодаря скринингу различных высокосолёных местообитаний найдено множество галофильных штаммов, продуцирующих различные внеклеточные гидролазы, однако главной проблемой использования данных ферментов, является сложность их получения. В данной работе впервые была успешно экспрессирована архейная внеклеточная гликозил-гидролаза класса GH20 с использованием системы экспрессии *Haloferax volcanii*.

Ключевые слова: галофилы, галофильные гликозид-гидролазы, клонирование, челночный вектор, *Haloferax volcanii*.

Введение

На сегодняшний день галофилы, населяющие местообитания с высоким уровнем солености остаются самыми мало изученными, но очень привлекательными с точки зрения биотехнологии экстремофильными микроорганизмами [15]. Их использование варьируется от получения осмопротекторов, различных биополимеров и каротиноидов, до биоремедиации окружающей среды [10, 17]. Однако наибольший интерес представляют галофильные ферменты, в том числе гликозил-гидролазы, способные к деградации

сложных нерастворимых природных полисахаридов, таких как хитин и целлюлоза, до растворимых олиго- и мономеров при повышенной солености [9, 13].

Галотолерантность/галофильность ферментов позволяет использовать более эффективные пути переработки полисахаридов, в том числе создает возможность для применения ионных жидкостей, которые осуществляют первичную декристаллизацию нерастворимых полисахаридов гораздо эффективнее щелочей [18]. Кроме того, экстремальные условия функционирования галофильных ферментов снижают риск нежелательной микроб-

¹ Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 18–34–00802)

ной контаминации при проведении биотехнологических процессов. Таким образом, галофильность ферментов может быть использована везде, где ферментативные превращения должны идти в присутствии органических растворителей и экстремумов содержания соли [4,7,16].

В последние несколько лет было реализовано большое число различных проектов по исследованию разнообразия галофильных микроорганизмов-гидролитиков [3]. Так, благодаря скринингу соленых озер и других местообитаний найдено множество галофильных штаммов, продуцирующих различные внеклеточные гидролазы, однако главной проблемой использования данных ферментов, является сложность их получения [11].

Использование в промышленных процессах непосредственно микроорганизмов-продуцентов в качестве биореакторов не представляется возможным в связи со сложностью процесса культивирования, более того, многие потенциальные продуценты ферментов не культивируются вовсе. Современные технологии позволяют получать подобные ферменты путем клонирования и экспрессии рекомбинантных белков в гетерологичной системе *E. Coli* [5, 14]. Однако, в большинстве случаев, проявляющие высокую активность в условиях повышенной ионной силы ферменты, относящиеся к редким семействам и представляющие наибольший интерес с точки зрения биотехнологии, не экспрессируются в классических мезофильных организмах.

Это связано с неправильным фолдингом фермента, в результате чего он теряет свою активность. В случае внеклеточных ферментов, данный факт объясняется также необходимостью осуществления протеолитических пост-трансляционных модификаций для транспорта фермента через мембрану [2]. Данные модификации, как правило, возможны только в клетках хозяина, либо родственного организма.

Наиболее трудозатратными являются исследования в области получения архейных ферментов. Это объясняется использованием ограниченного числа генетических инструментов на основе архей, так как представители данного домена проявляют высокую устойчивость к элементарным генетическим манипуляциям [1]. Данный и вышеописанные факты обуславливают необходимость поиска и разработки новых систем экспрессии. В настоящей работе была предпринята попытка экспрессии галоархейной внеклеточной гликозил-гидролазы в архее семейства *Halobacteriaceae*.

Материалы и методы

Объектом исследования стала предполагаемая внеклеточная гликозил-гидролаза семейства GH20

Hmb_0796, аннотируемая в геноме новой галоархеи *Halomicrobium sp.* LC1Hm [8] как β -N-ацетилглюкозаминидаза (EC3.2.1.52).

Для исследования была выбрана система гиперэкспрессии и очистки галофильных белков на основе археи *Haloferax volcanii*. Данный микроорганизм имеет простые требования к росту (аэробные условия, оптимальная температура 45 °C) и легко культивируется в лаборатории. Кроме того, он чрезвычайно устойчив к контаминации, что является значительным преимуществом, поскольку значительно снижает требования по стерильности для роста.

В качестве экспрессионного был выбран челночный плазмидный вектор pTA 1392, способный реплицироваться как в клетках *E. coli*, что необходимо для эффективной наработки достаточных количеств рекомбинантной ДНК, так и в клетках *Haloferax volcanii*, что, в свою очередь, обеспечивает экспрессию активного фермента. Кроме того, важной особенностью данного вектора является возможность присоединения стрептавидин-связывающего пептида (SBP-tag) на C-конце рекомбинантного белка, так как высокое содержание гистидина в белках галофильных микроорганизмов усложняет процесс классического выделения с помощью His6-тага путем металлафинной хроматографии.

Подбор праймеров для амплификации генов, кодирующих гликозил-гидролазы, проводился с помощью программы CLC Genomics Workbench (QIAGEN, США) с добавлением сайтов рестрикции (NdeI и NheI) на 5' и 3' концы кодирующей последовательности для клонирования в вектор pTA 1392. Амплификация генов-кандидатов осуществлялась с помощью набора реактивов Encyclo Plus PCR kit (Евроген, Россия). Выбор данной полимеразы обусловлен возможностью клонирования продуктов ПЦР в TA-векторы за счет выступающих на концах амплифицированных фрагментов ДНК дезоксиаденозиновых остатков. Продукты реакции были очищены с помощью набора Cleanup Mini (Евроген, Россия) и клонированы в промежуточный вектор pAL2-T (Евроген, Россия). Скрининг трансформированных колоний *E. coli* DH5alpha производился с помощью комбинированных пар праймеров (прямой M13 и обратный праймер, использованный для амплификации гена-кандидата), что позволило исключить клоны с неправильно ориентированной последовательностью гена.

На следующем этапе исследования, полученные путем рестрикции рекомбинантного вектора pAL2-T последовательности, были переклонированы в челночный вектор pTA 1392. Очистка плазмид проводилась с исполь-

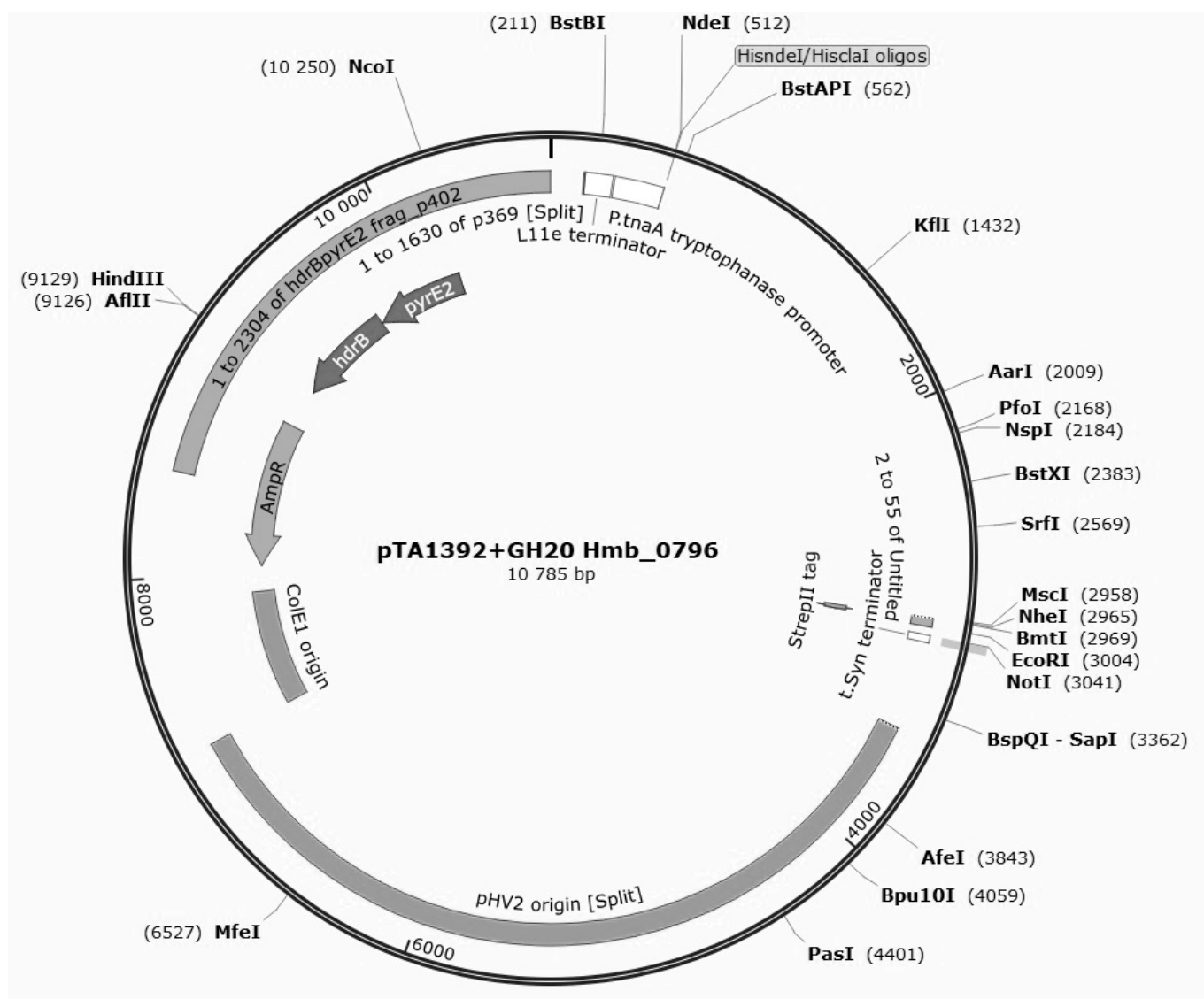


Рис. 1. Конструкция рекомбинантного вектора рТА 1392+GH20 Hmb_0796

зованием набора Plasmid Miniprep (Евроген, Россия). PEG 600-опосредованная трансформация *Haloferax volcanii* и триптофан-зависимая экспрессия рекомбинантных ферментов были осуществлены по протоколам Thorsten Allers Laboratory [1]. Оценка эффективности экспрессии внеклеточных ферментов проводилась методом диффузии концентрированного супернатанта в агаризованную питательную среду HV-YPC с добавлением аморфного хитина [12] и хитодекстринов длиной 2–6 остатков N-ацетилглюкозамина.

Результаты и обсуждение

Фермент β -N-ацетилглюкозаминидаза семейства GH20 (EC 3.2.1.52), аннотируемый в геноме галоархеи *Halomicrobium sp.* LC1Hm [8], представляет собой экзо-

хитодекстриназу, которая осуществляет гидролиз низкомолекулярных хитодекстринов до N-ацетилглюкозамина (GlcNAc). Данный фермент является внеклеточным и содержит N-концевой сигнал секреции Tat, хитин-связывающий домен ChtBD3 и PKD домен.

Культура *Haloferax volcanii* была успешно трансформирована рекомбинантным вектором рТА 1392+GH20 Hmb_0796 (Рис. 1.).

Подтверждением активности экспрессированного фермента явилась выраженная зона гидролиза (обесцвечивания мутной питательной среды) вокруг лунки с концентрированным супернатантом. Проверка активности на питательной среде HV-YPC с добавлением аморфного хитина дала отрицательный результат.

В ходе данного исследования впервые была успешно экспрессирована ахрейная внеклеточная гликозил-гидролаза класса GH20 с использованием системы экспрессии *Haloferax volcanii*. До настоящего момента данная система использовалась только для получения внутриклеточных галофильных ферментов [6]. На сегод-

няшний день известны примеры получения галофильной хитиназы, выделенной из морской археи *Halobacterium salinarum* [5] и первой кренархейной галофильной хитиназы микроорганизма *Sulfolobus tokodaii* [14], однако их экспрессия осуществлялась в гетерологичной системе *E. Coli*.

ЛИТЕРАТУРА

- Allers, T. Improved strains and plasmid vectors for conditional overexpression of His-tagged proteins in *Haloferax volcanii* / Allers, T., Barak, S., Liddell, S., Wardell, K., & Mevarech, M. // *Applied and environmental microbiology*. — 2010. — Vol. 76(6). — P. 1759–1769.
- DasSarma, S. Halophiles and their enzymes: negativity put to good use / DasSarma, S., and DasSarma, P. // *Current opinion in microbiology*. — 2015. — Vol. 25. — P. 120–126.
- De Lourdes Moreno, M. Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes / De Lourdes Moreno, M., Pérez, D., García, M. T., and Mellado, E. // *Life*. — 2013. — Vol. 3(1). — P. 38–51.
- Garg, R. Biochemical and structural characterization of a novel halotolerant cellulase from soil metagenome / Garg, R., Srivastava, R., Brahma, V., Verma, L., Karthikeyan, S., and Sahni, G. // *Scientific reports*. — 2016. — Vol. 6. — P. 39634.
- García-Fraga, B. Functional expression and characterization of a chitinase from the marine archaeon *Halobacterium salinarum* CECT 395 in *Escherichia coli* / García-Fraga, B., Da Silva, A. F., López-Seijas, J., & Sieiro, C. // *Applied microbiology and biotechnology*. — 2014. — Vol. 98(5). — P. 2133–2143.
- Haque, R. U. *Haloferax volcanii* as immobilised whole cell biocatalyst: new applications for halophilic systems. / Haque, R. U., Paradisi, F., & Allers, T. // *Applied microbiology and biotechnology*. — 2019. — Vol. 103(9). — P. 3807–3817.
- Johnson, J. Hydrolytic activities of hydrolase enzymes from halophilic microorganisms / Johnson, J., Sudheer, P.D., Yang, Y.H., Kim, Y.G., & Choi, K.Y. // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. — 2017. — Vol. 22(4). — P. 450–461.
- La Cono, V. Differential polysaccharide utilization is the basis for a nanohaloarchaeon: haloarchaeon symbiosis. / La Cono, V., Messina, E., Rohde, M., Arcadi, E., Giordia, S., Crisafi, F., Denaro, R., Ferrer, M., Giuliano, L., Golyshin, P. N., Golyshina, O.V., Hallsworth J. E., La Spada G., Mena M. C., Shevchenko M. A., Smedile F., Sorokin D. Y., Toshchakov S. V., Mushegian A., Yakimov M. M. // *BioRxiv:794461*—2019.
- Pasqualetti, M. High production of chitinolytic activity in halophilic conditions by a new marine strain of *Clonostachys rosea* / Pasqualetti, M., Barghini, P., Giovannini, V., and Fenice, M. // *Molecules*. — 2019. — Vol. 24(10). — P. 1880.
- Rodrigo-Baños, M. Carotenoids from Haloarchaea and their potential in biotechnology / Rodrigo-Baños, M., Garbayo, I., Vilchez, C., Bonete, M. J., & Martínez-Espinosa, R. M. // *Marine Drugs*. — 2015. — Vol. 13(9). — P. 5508–5532.
- Rohban, R. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran / Rohban, R., Amoozegar, M.A., and Ventosa, A. // *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. — 2009. — Vol. 36(3). — P. 333–340.
- Sorokin, D. Bacterial chitin utilisation at extremely haloalkaline conditions / Y. Sorokin, D.Y., Tourova, T.P., Sukhacheva, M.V., Mardanov, A.V., & Ravin, N.V. // *Extremophiles*. — 2012. — Vol. 16(6). — P. 883–894.
- Sorokin, D.Y. Halo (natrono) archaea isolated from hypersaline lakes utilize cellulose and chitin as growth substrates / Sorokin, D.Y., Toshchakov, S.V., Kolganova, T.V. and Kublanov, I.V. // *Frontiers in microbiology*. — 2015. -Vol. 6. — P. 942.
- Staufenberger, T. First crenarchaeal chitinase found in *Sulfolobus tokodaii* / Staufenberger, T., Imhoff, J.F., & Labes, A. // *Microbiological research*. — 2012. — Vol. 167(5). — P. 262–269.
- Tiquia-Arashiro, S. Halophiles in nanotechnology. *Extremophiles: Applications in Nanotechnology* / Tiquia-Arashiro, S., and Rodrigues, D. // Springer, Cham. — 2016. — P. 53–88.
- Uritskiy, G. Applying genome-resolved metagenomics to deconvolute the halophilic microbiome / Uritskiy, G., and DiRuggiero, J. // *Genes*. — 2019. — Vol. 10(3). — P. 220.
- Waditee-Sirisattha, R. Halophilic microorganism resources and their applications in industrial and environmental biotechnology / Waditee-Sirisattha, R., Kageyama, H., and Takabe, T. // *AIMS Microbiol.* — 2016. — Vol. 2(1). — P. 42–54.
- Yin, J. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology / Yin, J., Chen, J.C., Wu, Q., and Chen, G.Q. // *Biotechnology advances*. — 2015. — Vol. 33(7). — P. 1433–1442.

© Шевченко Маргарита Андреевна (lionsorcieri@gmail.com), Лисун Валерий Валерьевич (lisun.valer@yandex.ru),

Скрипская Виктория Валерьевна (visknot@gmail.com), Якимов Михаил Михайлович (michailiakimov@iamc.cnr.it)

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»