

Биология

УДК: 577.216.3, 577.218

A.K. БИСЕНБАЕВ, С.М.ТАЙПАКОВА

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ЦЕЛЛОБИОГИДРОЛАЗЫ CEL7A ГРИБА *LENTINULA EDODES* В *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДВУХ РАЗЛИЧНЫХ ПРОМОТОРОВ

Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии
КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

Впервые ген, кодирующий целлобиогидролазу CEL7A гриба L. edodes, экспрессирован под контролем регулируемого промотора GAL10 и конститутивного промотора GAPDH в S. cerevisiae штамм YPH501a/a. Показано, что CEL7A под контролем индуцируемого галактозой промотора GAL10 не подвергается O-гликозилированию из-за присутствия глицина на N-конце потенциальных сайтов O-гликозилирования. Выявлено, что N-гликозилирование рекомбинантной CEL7A ингибируется галактозой, тогда как под контролем конститутивного GAPDH промотора фермент подвергается N-гликозилированию из-за отсутствия галактозы. Показано, что CEL7A экспрессированные в E. coli и S. cerevisiae расщепляют ацицел, фильтровальную бумагу, нитрофенил β-D-лактопранозид (pNP-Lac) и p-нитрофенил β-D-целлобиозид (pNP-Cel). Установлено, что в дрожжевой системе температурные профили активности N-гликозилированной CEL7A L. edodes сдвинуты в область более высоких температур (60-70°C) по сравнению с негликозилированными формами этого фермента.

Лигноцеллюлоза является наиболее распространенным возобновляемым биологическим ресурсом [1]. Биомасса, в зависимости от вида растений, состоит на 40-55% из целлюлозы, 25-50% гемицеллюлозы и 10-40% из лигнина [2]. По некоторым данным возобновляемые запасы растительной биомассы, только в виде отходов или вторичных продуктов промышленной и сельскохозяйственной переработки растений и древесины составляет 4-5 млрд. т., а общие запасы растительной биомассы на Земном шаре оцениваются в 800-1000 млрд. т.

В настоящее время основа процесса биоконверсии растительной биомассы состоит в ферментативном гидролизе целлюлозы до глюкозы с последующим сбраживанием ее в этанол, или получении иных продуктов микробного синтеза. Природная древесина, отходы ее переработки, сельскохозяйственные целлюлозосодержащие отходы представляют потенциальный интерес как дешевое и возобновляемое сырье для получения различных химических продуктов и топлива [3].

Деструкция целлюлозы с образованием растворимых сахаров осуществляется под действием полиферментной системы целлюлаз, включающей в себя эндо-1,4-β-глюканазы (КФ 3.2.1.4), экзо-1,4-β-глюканазы (КФ 3.2.1.91), экзо-1,4-β-глюкозидазы (КФ 3.2.1.74) и целлобиазы (КФ 3.2.1.21). Свойства индивидуальных ферментов, а также их взаимодействие в составе целлюлазного комплекса определяют эффективность гидролиза целлюлозосодержащих субстратов [4]. Процесс глубокого ферментативного гидролиза целлюлозы достигается за счет синергизма между этими целлюлитическими ферментами [5]. Эффективность гидролитического действия целлюлазных комплексов, а также стоимость предобработки сырья являются основными факторами, влияющими на рентабельность процессов биоконверсии лигноцеллюлозной биомассы. Следовательно, значительное снижение стоимости ферментного препарата является определяющим фактором для их коммерческого использования в переработке биомассы.

Экзо-1,4-β-глюканазы или целлобиогидролазы (ЦБГ) 7-го и 6-го семейства гликозид-гидролаз являются ключевыми ферментами целлюлазного комплекса грибов [6].

Целлюлитические грибы могут содержать различные гликоформы ЦБГ, отличающиеся длиной и составом олигосахаридных цепей, что, возможно, является результатом их посттрансляционной модификации путем протеолитического расщепления эндогенными ферментами и/или гликозилирования [7].

Гликозилирование белков являются наиболее сложной посттрансляционной модификацией, которые включает N- и O-гликозилирование [8]. Оба типа гликозилирования широко распространены в молекуле ЦБГ. O-связанное гликозилирование происходит по гидроксильным группам остатков серина (S) и треонина (T). N-гликозилированию может подвергаться остаток аспарагина (N) при условии, что за ним через одну аминокислоту следует остаток серина или треонина, т.е. в белке имеются характеристические последовательности аминокислот N_Xaa_S/T, где Xaa не может быть пролином [9].

Сайты и характер N-гликозилирования целлюлаз активно изучаются у *Trichoderma reesei*. Выявлены изоформы ЦБГ семейства CEL7A у *Trichoderma reesei*. Показаны, что эти изоформы являются результатом случайного замещения гликанов на сайтах N-гликозилирования [10]. Большой объем информации по характеру гликозилирования белков дрожжей и грибов были получены с помощью гетерологичной экспрессии генов соответствующих белков. Тем не менее, характер и эффект гликозилирования на функционирование белков /ферментов остаются недостаточно изученными.

ЦБГ ответственны за глубокий гидролиз кристаллической целлюлозы, основным продуктом действия которых является целлобиоза. Показано, что ЦБГ катализирует образование до 80% целлобиозы из кристаллической целлюлозы [11]. Кроме того, CEL7A и другие целлюлазы являются важным объектом белковой инженерии для промышленных целей. Это требует поиска эффективной системы экспрессии генов ЦБГ, которые позволили бы синтезировать функционально активный фермент.

Известно, что дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* не способны синтезировать ЦБГ, способные гидролизовать различные целлюлозные субстраты. Такая особенность данной системы намного облегчает регистрацию рекомбинантных целлобиогидролаз в трансформированных клетках. Кроме этого, способность *Saccharomyces cerevisiae* сбраживать глюкозу до этанола [12], позволяет использовать рекомбинантные штаммы для превращения целлюлозы одностадийным процессом в ряд ценных продуктов (углеводы, этанол и т. п.).

В настоящей работе мы предлагаем результаты экспрессии гена ЦБГ CEL7A гриба *Lentinula edodes* в *Saccharomyces cerevisiae* под контролем индуцибельного и конститутивного промотора.

Материалы и методы

Материалы

Ферменты рестрикции, T4 ДНК-лигаза и Tag ДНК-полимераза фирмы Fermentas Life Sciences (Германия). Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора High Pure Plasmid Isolation Kit, фрагменты ДНК очищали набором Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche Diagnostics GmbH, Германия). Все другие химические вещества и реактивы были аналитически чистыми (Sigma-Aldrich Corp, США).

Штаммы и условия культивирования

Штамм *E. coli* DH5α использовали для наработки плазмиды. Штамм *E. coli* Rosetta (DE3) (Invitrogen, США) и YPH 501a/α *S.cerevisiae* использованы для экспрессии рекомбинантного CEL7A. Для экспрессии использовали вектор pET11d (Invitrogen, США), дрожжевые вектора pESC-Leu2 (Invitrogen, США) и YEplGAP. Дрожжевой вектор YEplGAP был любезно предоставлен доктором H. Kumagai (Division of Integrated Life Sciences, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Japan).

Конструкция и трансформация дрожжевого экспрессионного вектора

Рекомбинантный вектор pET11d/cel7A [13], содержащий кДНК ген CEL7A гриба *L. edodes* со своим сигнальным пептидом был использован в качестве донорной плазмиды. Для клонирования кДНК CEL7A в дрожжевой вектор pESC-Leu2, плазмиду pET11d/cel7A амплифицировали используя две пары праймеров: смысловой праймер cel7A Pr5'-TTA GCGGCCGCCATGGTCCGAACAGCAGCTCTCC-3', содержащий сайт узнавания рестриктазой *No*I и антисмысловой праймер cel7A Pr5'- CAGAGCTCCTACAAACATTG ACTGTAGTAAGG-3' содержащий сайт *Sac*I (подчеркнут). Продукты ПЦР использовали для последующего клонирования в дрожжевой вектор pESC-Leu2 под контроль индуцибельного GAL10 промотора. Полученный дрожжевой экспрессионный вектор назвали как pESC-Leu2/ cel7A.

Для клонирования кДНК CEL7A в дрожжевой вектор YEпGAP, плазмиду pET11d/cel7A амплифицировали используя две другие праймера: смысловой праймер cel7A Pr 5'-TTAGCGGCCG~~CATGGTCCGAACAGCAGCTCTCC-3'~~, и антисмысловой cel7A Pr5'-~~CAGGCCGC~~CTACAAACATTGACTGTAGTAAGG-3' содержащие сайты рестрикции NotI (подчеркнуты). Продукты ПЦР лигировали с дрожжевым вектором YEпGAP и получили рекомбинантную плазмиду YEпGAP/cel7A, где CEL7A находился под контролем конститтивного промотора гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH).

Рекомбинантные плазмиды pESC-Leu2/cel7A и YEпGAP/cel7A, несущие гены целлобиогидролаз CEL7A, были трансформированы в *S. cerevisiae* штамма YPH 501a/a. Скрининг трансформантов проводили на селективной среде SD DO Leu supplement и SD DO Trp supplement, соответственно. Индукцию экспрессии кДНК cel7A в трансформированных pESC-Leu2/cel7A вектором клетках проводили инкубированием в присутствии галактозы в течение 16 ч при 30°C и интенсивном перемешивании на качалке.

На селективной среде SD DO Leu supplement (для pESC-Leu2/cel7A клеток) и SD DO Trp supplement (YEпGAP/cel7A) отобрано по 20 клонов трансформантов. Индивидуальные колонии проверяли на наличие вставки с помощью ПЦР и рестрикционного анализа.

Иммуноблотинг с поликлональными антителами к CEL7A

Белки разделяли 10% ДСН-ПААГ электрофорезом. После завершения электрофореза белки окрашивали Кумасси R-250. Белковую полосу соответствующей молекулярной массе CEL7A вырезали из геля и использовали в качестве антигена. Кусок геля гомогенизировали в жидким азоте, эмульгировали в полном адьюванте Фрейнда (Sigma, США) и вводили подкожно кроликам. Вспомогательные инъекции антигена в неполном адьюванте Фрейнда проводились каждые две недели. У кролика брали образец крови до первой инъекции (преиммунная сыворотка), а затем через неделю после последней инъекции для получения иммунной сыворотки (анти-CEL7A антител). Вестерн blotting проводили по стандартному протоколу с использованием 1:400 анти-LeCEL7A поликлональных антител разведенных в PBS буфере, pH 7.4, и 1:10000 вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой.

Дегликозилирование рекомбинантной CEL7A

Дегликозилирование белка проводили с использованием гликозидазы Endo H (Эндо-β-N-ацетилглюказамиnidаза H, New England Biolabs, Великобритания). 100 мкг тотального белка в виде грубого гомогената трансформированных клеток *S.cerevisiae* денатурировали при 100°C в течение 10 мин. в присутствии 1x буфера для денатурации гликопротеинов (5% ДСН и 10% 2-мэркаптоэтанол). Далее, остынув содержимое пробирки на льду, добавили 500 ед. Endo H и 10x реакционного буфера G5 (0.5M цитрат натрия pH 5.5) до конечной 1x концентрации. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 24 часов. Продукт реакции анализировали с помощью иммуноблоттига.

Определение активности белка

Содержание белка определяли по методу Брэдфорда [14]. Ферментативную активность определяли с использованием ацицепт, карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) и фильтровальной бумаги (Ватман № 1, 1 x 6см) в качестве субстрата. Концентрацию восстанавливющих сахаров в растворе регистрировали спектрофотометрически методами динитросалициловой кислоты (DNS-метод) и методом Шомоди-Нельсона [15,16,17]. За единицу активности ЦБГ принимали количество фермента, которое образует 1 мкМ восстанавливающих сахаров за 1 мин на 1 мг тотального белка.

Хромогенные субстраты р-нитрофенил β-D-лактопиранозид (pNP-Lac) и р-нитрофенил β-D-целлобиозид (pNP-Cel) так же были использованы в качестве субстрата. За единицу активности принимали количество фермента, которое освобождает из субстрата pNP-Cel или pNP-Lac 1мкМ п-нитрофенола (pNP) за 1мин на мг тотального белка при данных условиях реакции.

Результаты и обсуждение

Ранее нами выделены кДНК гены целлобиогидролазы I (*cel7A*) и целлобиогидролазы II (*cel6B*) гриба *L. edodes* и экспрессированы в *E. coli* [13,18]. ЦБГ CEL7A экспрессированная в *E.coli* проявляла достаточно высокую активность по отношению к фильтровальной бумаге и имела

сравнительно одинаковую активность с рекомбинантным ферментом экспрессированным в *S.cerevisiae* при pH 7,0 и температуре 50°C [19]. Тогда как рекомбинантная CEL6B в *E.coli* накапливалася в виде телец включения. С применением химического метода рефолдинга белка и хроматографической очистки восстановлена каталитическая активность CEL6B. Установлено, что удельная активность рекомбинантного белка CEL6B значительно ниже по сравнению с рекомбинантной CEL7A экспрессированной в *E.coli* [13]. Для клонирования кДНК гена *cel7A* в дрожжевые векторы, использовали созданную нами в этих работах рекомбинантную плазмиду pET11d/*cel7A* в качестве матрицы для его амплификации. Далее продукты ПЦР клонировали в две разные дрожжевые вектора:

1. pESC-Leu2, содержащий индуцируемый *GAL10* промотор, который индуцируются галактозой.

2. YEpGAP, содержащий сильный дрожжевой конститутивный промотор GAPDH, обеспечивающий высокий уровень синтеза соответствующей мРНК.

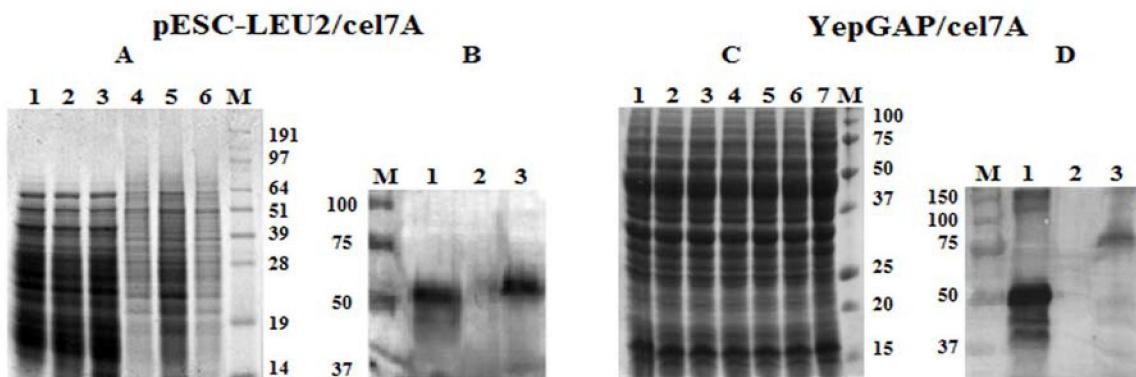
Созданные рекомбинантные плазмиды pESC-Leu2/ *cel7A* и YEpGAP/ *cel7A*, несущие ген целлобиогидролазы CEL7A, по отдельности были трансформированы в *S. cerevisiae* штамм YPH 501a/a. В результате получили две рекомбинантные штаммы *S. Cerevisiae*, экспрессирующие ген ЦБГ CEL7A: YPH/*cel7A*^{GAL10} и YPH/*cel7A*^{GAPD}. Экспрессию гена *cel7A* в трансформированных клетках выявляли с помощью ДСН-ПААГ электрофореза, иммуноблотинга с поликлональными антителами, а также путем определения активности фермента.

По данным анализа аминокислотной последовательности с помощью программы SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/service/SignalP>), этот фермент должен секретироваться из клеток гриба, поскольку имеет на N-конце сигнальный пептид, который должен отщепляться между аминокислотами Gly18 и Gln19. Несмотря на эти данные, CEL7A *L. Edodes*, экспрессированная под контролем двух разных промоторов накапливалася внутри клеток *S.cerevisiae*. Эти данные указывают на то, что нативный сигнальный пептид CEL7A *L. edodes* не распознается секреторной системой *S.cerevisiae*. В связи с этим в последующих экспериментах экспрессию рекомбинантного фермента анализировали на грубом экстракте клеток *S.cerevisiae*.

Данные ДСН-ПААГ электрофореза рекомбинантного штамма *S. cerevisiae* YPH/*cel7A*^{GAL10} показали белковые полосы с молекулярной массой приблизительно 53,5 кДа в растворимой фракции, что соответствует рассчитанной молекулярной массе LeCEL7A. Аналогичная белковая полоса в следовых количествах обнаруживалась и в осадке. Однако с такой же молекулярной массой белковая полоса обнаруживалась в нетрансформированных клетках *S. cerevisiae* (рисунок 1 А). Это указывает на то, что дрожжевые клетки содержат конститутивные белки с молекулярной массой аналогичной целлобиогидролазе CEL7A *L. edodes*. В последующих экспериментах для доказательства экспрессии рекомбинантного CEL7A *L. edodes* использовали иммуноблоттинг с поликлональными антителами анти-CEL7A *L. edodes*. Для этого белки из ДСН-ПААГ перенесли на PVDF мембранию и инкубировали с поликлональными анти-LeCEL7A антителами. В качестве положительного контроля использовали рекомбинантный LeCEL7A экспрессированный в *E. coli* [14]. Иммуноблотинг выявил мажорную белковую полосу с молекулярной массой незначительно большей, чем рассчитанная молекулярная масса CEL7A (рисунок 1 Б).

ДСН-анализ экспрессии гена ЦБГ CEL7A в YPH/*cel7A*^{GAPD} клетках *S.cerevisiae* представлены на рисунке 1С. Белковые фракции трансформированных и нетрансформированных клеток *S. cerevisiae* имели вытянутые размытые очертания на ДСН-ПААГ (рисунок 1С). Результаты иммуноблотинга выявили мажорные белковые полосы молекулярной массой значительно большей, чем рассчитанная молекулярная масса CEL7A *L.edodes* (рисунок 1Д). Эти данные указывают на то, что CEL7A экспрессированная под контролем конститутивного промотора представлена формой с более высокой молекулярной массой, чем CEL7A экспрессированная в *E.coli* и дрожжевых клетках YPH/*cel7A*^{GAL10} (рисунок 1 В и Д).

Подобное увеличение молекулярной массы свойственно гликозилированным белкам, так как они часто представлены в виде набора различных по молекулярной массе гликоформ, отличающихся длиной и составом олигосахаридных цепей. Поскольку гликозилирование является распространенной посттрансляционной модификацией секретируемых белков, мы предположили, что рекомбинантный CEL7A также может содержать углеводные остатки.



А и С – ДСН-ПААГ электрофорез клеточного экстракта *S. cerevisiae*, несущий рекомбинантный вектор. М- маркер молекулярной массы белков; 1- экстракт *YPH 501a/a* несущий пустой вектор; 2-3- экстракт клонов несущих рекомбинантный вектор; 4- мембрана связанные белки *YPH 501a/a* несущий пустой вектор; 5-6-мембрана связанные белки клонов несущих рекомбинантный вектор; **В и Д** – Иммуноблоттинг клеточного экстракта *S. cerevisiae*, несущий рекомбинантный вектор. М- маркер молекулярной массы белков; 1- экстракт *YPH 501a/a* несущий вектор; 2- экстракт *E. coli* несущий pET11d/cel7A после 12 ч индукции с ИПГ; 3- экстракт *YPH 501a/a* несущий рекомбинантный вектор.

Рис. 1. Анализ экспрессии рекомбинантного белка CEL7A.

Следует отметить, что рекомбинантные ЦБГ экспрессированные под контролем конститутивного и индуцируемого промотора отличались по степени гликозилирования. Например, рекомбинантная CEL7A, экспрессированная под контролем индуцируемого GAL10 промотора (индуцируется галактозой) гликозилировалась лишь частично. При клонировании *cet7A* под контролем конститутивного промотора, CEL7A была представлена в гипергликозилированном виде.

На основании анализа первичной структуры CEL7A мы обнаружили один потенциальный сайт N-гликозилирования в каталитическом домене в позиции 75 с N-конца белка (рисунок 2). В то же время O-гликозилирование CEL7A потенциально может происходить в линкерной части по двум сайтам (451 серин и 472 треонин), а также в каталитическом домене по треонину в положений 419.

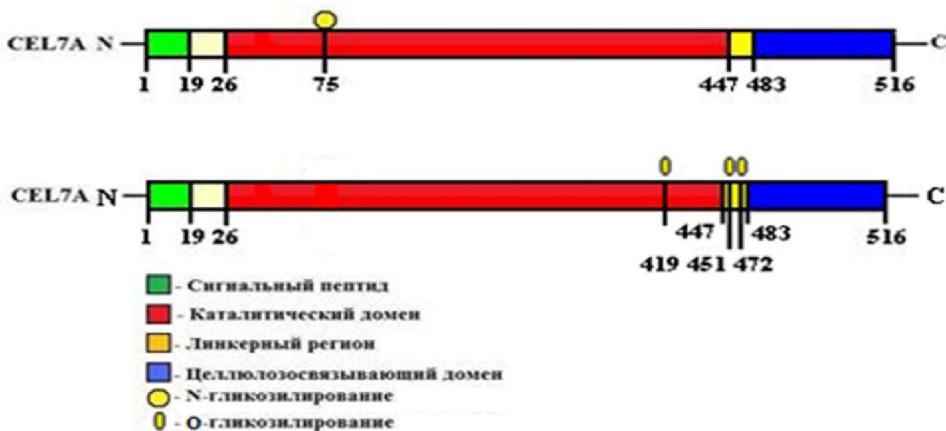


Рис. 2. Потенциальные сайты гликозилирование целлебиогидролазы CEL7A *L. edodes*

Следует отметить, что O-гликозилирование белков в *S. cerevisiae* отличается от других эукариотических систем. Во-первых, O-гликозилирование инициируется в эндоплазматическом ретикулуме с использованием промежуточного липида (Dol-P-Man) в первой реакции переноса маннозы к пептиду. Последующие реакции маннозилизации происходит в аппарате Гольджи с использованием в качестве донора сахаров GDP-маннозу. Во-вторых, треонин является лучшим субстратом гликозилирования, чем серин. В-третьих, природа аминокислот окружающих сайты гликозилирования играют важную роль в системе O-гликозилирования. Например, присутствие глицина на N-конце сайта O-гликозилирования (треонин) или карбоксиаминокислот в любой позиции полностью ингибирует гликозилирование (маннозилирование) [20].

Исходя из приведенных данных, мы проанализировали наличие глицина и карбоксиаминокислот вблизи сайтов О-гликозилирования. Как видно из таблицы, на N-конце всех трех сайтов О-гликозилирования (треонин) целлобиогидролазы CEL7A присутствует глицин. Эти данные полностью исключают возможность О-гликозилирования ЦБГ CEL7A в гетерологической системе *S.cerevisiae*.

Таблица 1. Сайты О-гликозилирование CEL7A *L. edodes*

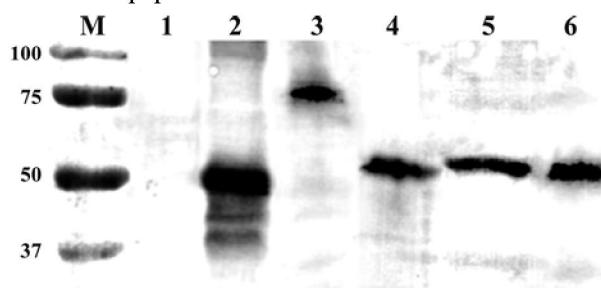
№	CEL7A		
	Положение	Сайты гликозилирования	Score
1	419	A-n-GTS-n-TT	0,78
2	451	A-n-GST-n-SS	0,86
3	472	G-n-GTT-n-SS	0,86

Таким образом, в экспрессионной системе *S.cerevisiae* рекомбинантная CEL7A может гликозилироваться только по одному сайту на N-конце полипептидной цепи (N-гликозилирование по аспарагину в позиции 75) и О-гликозилирование полностью исключается.

Можно предположить, что причиной частичного гликозилирования CEL7A экспрессированной под контролем GAL10 промотора и гипергликозилирования этого же фермента экспрессированного под контролем GAPDH промотора может быть присутствие и отсутствие в среде галактозы. В ряде исследований показано, что Д-галактоза частично ингибирует N-гликозилирование белков, но не О-гликозилирование [21]. Механизм ингибирования N-гликозилирования белков Д-галактозой до сих пор не ясен, в основном связывают с неизвестными промежуточными продуктами метаболизма Д-галактозы.

Происходит ли ингибирование гликозилирования CEL7A в присутствии Д-галактозы. Для выяснения этого вопроса нами были проведены специальные опыты по определению экспрессии гена ЦБГ CEL7A в трансформированных YepGAP/cel7A плазмидой клетках *S.cerevisiae*. Анализ экспрессии рекомбинантного CEL7A проводили с помощью иммуноблотинга. Результаты экспериментов представлены на рисунке 3.

Как видно из рисунка, в трансформированных пустым вектором YepGAP штаммах *S. cerevisiae* отсутствовала белковая полоса характерная для CEL7A (рисунок 3-1). Результаты иммуноблотинга клеточных экстрактов трансформированных плазмидой YepGAP/cel7A клеток *S. cerevisiae* выявили мажорную белковую полосу молекулярной массой большей, чем рассчитанная молекулярная масса CEL7A *L. edodes* (рисунок 3-3). Инкубация трансформированных YepGAP/cel7A плазмидой штаммов *S. cerevisiae* в присутствии 2мM Д-галактозы в течение 12 часов приводило к снижению молекулярной массы рекомбинантного фермента приблизительно до расчетной (рисунок 3-4). Действительно ли увеличение молекулярной массы рекомбинантного фермента происходит за счет N-гликозилирования? Для решения данного вопроса мы исследовали эффект Endo H на характер гликозилирования рекомбинантного фермента.



M – белковый маркер; 1- экстракт *S.cerevisiae*, несущий пустой YepGAP; 2- экстракт *E.coli*, несущий pET11d/cel7A через 12 ч индукции с ИППГ; 3- экстракт *S.cerevisiae*, несущий YepGAP/cel7A; 4- *S.cerevisiae*, несущий YepGAP/cel7A инкубированный в присутствии 2 мМ галактозы; 5- экстракт *S.cerevisiae*, несущий YepGAP/cel7A, обработанный ферментом Endo H; 6- экстракт *S.cerevisiae*, несущий pESC-LEU2/cel7A;

Рис. 3. Экспрессия рекомбинантной CEL7A

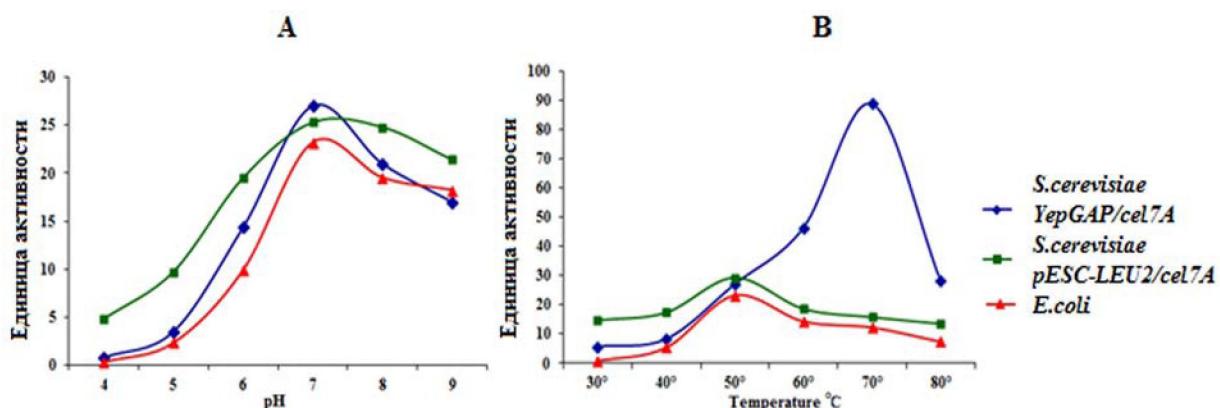
Endo H (КФ 3.2.1.96) – высокоспецифическая эндоглюкозидаза, которая расщепляет связанные с аспарагином олигосахариды (N-гликозилирование), но не O-связанные олигосахариды [22]. Эффект Endo H является важным признаком, позволяющим говорить о типе гликозилирования белка. Поэтому в последующих экспериментах клеточный экстракт трансформированного рекомбинантной плазмидой *YepGAP/cel7A* штамма *S. cerevisiae* инкубировали в присутствии 500ед Endo H в течении 24 часов. Затем Endo H, обработанный клеточным экстрактом, анализировали с помощью иммуноблоттига. Как видно из рисунка 3-5, дегликозилирование с помощью Endo H приводило к снижению молекулярной массы рекомбинантного CEL7A до расчетной молекулярной массы. Эти результаты подтверждают наше предположение о характере гликозилирования рекомбинантного CEL7A в экспрессионной системе *S. cerevisiae*.

В свете полученных нами данных, представляется вероятным, что во время экспрессии рекомбинантной CEL7A под контролем индуцируемого галактозой промотора GAL10 не происходит O-гликозилирование из-за присутствия глицина на N-конце всех имеющихся сайтов O-гликозилирования. При этом N-гликозилирование рекомбинантной CEL7A ингибируется галактозой. В ходе экспрессии рекомбинантной CEL7A под контролем конститутивного GAPDH промотора фермент подвергается N-гликозилированию из-за отсутствия галактозы, за счет чего происходит увеличение молекулярной массы фермента.

Каким образом характер гликозилирования рекомбинантной CEL7A сказывается на активности фермента? Для выяснения данного вопроса в последующих экспериментах сравнивали активность фермента в клеточных экстрактах *E. coli* (pET11d/cel7A, негликозилированная форма), *S. cerevisiae* YPH/cel7A^{GAL10} (частично N-гликозилированная, но не O-гликозилированная форма) и *S. cerevisiae* YPH/cel7A^{GAPD} (N-гликозилированная форма). Для этого клеточные экстракты инкубировали при 50°C в течение 1 ч при разных значениях pH. Затем концентрацию восстанавливющих сахаров в растворе регистрировали DNS-методом и методом Шомоди-Нельсона.

Как видно из рисунка 4А, оптимальная катализическая активность рекомбинантного фермента во всех клеточных экстрактах проявляется при pH 7. При этом необходимо отметить что, рекомбинантный фермент проявлял достаточно высокую активность в пределах значений pH от 8-9 как в *E. coli* так и в *S. cerevisiae* (рис. 4А).

В последние годы в связи с использованием целлюлазных препаратов для отбеливания бумаги, обработки текстильных изделий, производства моющих средств с биодобавками все более актуальной задачей становится получение целлюлаз с новыми технологическими свойствами, активных и стабильных при нейтральных и щелочных значениях pH среды.



А – Для определения pH зависимости были использованы: натрий ацетатный буфер pH 4-6,

натрий фосфатный буфер pH 7-8 и глициновый буфер pH 9.

В – Температурная зависимость измерялась в буфере с оптимальным значением pH.

Рис. 4. Влияние разных значений pH и температуры на активность рекомбинантной CEL7A

В наших экспериментах целлобиогидролаза CEL7A, экспрессированная в *E. Coli*, проявляла достаточно высокую активность по отношению к фильтровальной бумаге и имела сравнительно одинаковую активность с рекомбинантным ферментом, экспрессированным в *S. cerevisiae*

(YPH/cel7A^{GAPD} и YPH/cel7A^{GAL10}) при pH 7,0 и температуре 50°C (рисунок 4-А и Б). Иная картина наблюдалась при изучении температурной зависимости целлобиогидролазной активности рекомбинантного белка. Как видно из данных, представленных на рисунке 4-В, в рекомбинантных штаммах *S.cerevisiae* YPH/cel7A^{GAPD} температурные профили активности рекомбинантной CEL7A сдвинуты в область более высоких температур (60-70°C) по сравнению с рекомбинантными ферментами, клонированными в *E.coli* и *S.cerevisiae* YPH/cel7A^{GAL10}. При этом активность рекомбинантного CEL7A в YPH/cel7A^{GAPD} клетках при температуре 70°C приблизительно в 4 раза превышала активность фермента клонированного в *E.coli* и *S.cerevisiae* YPH/cel7A^{GAL10} клетках.

Эти результаты указывают на то, что термоустойчивость рекомбинантных ферментов, вероятно, достигается за счет N-гликозилирования.

Далее нами проведен анализ субстратной специфичности рекомбинантного фермента экспрессированных в бактериях и дрожжах. Результаты представлены на таблице 2.

Изучалась способность рекомбинантного CEL7A воздействовать на различные субстраты целлюлозной природы в оптимальных значениях pH. Рекомбинантный фермент экспрессированный как в *E.coli*, так и в *S.cerevisiae* расщеплял ацицел, фильтровальную бумагу, но по отношению к КМЦ проявлял низкую активность. Следовательно, наши данные указывают на то, что рекомбинантный белок CEL7A действительно является целлобиогидролазой. Рекомбинантный белок также расщеплял хромогенные субстраты pNP-Lac и pNP-Cell.

Таблица 2. Активность рекомбинантных целлобиогидролаз CEL7A и CEL6B на различных целлюлозных субстратах при pH 7,0 и оптимальных значениях температуры

Субстрат	Активность (ед мин/мг белка)		
	pET11d/cel7A <i>E.coli</i>	YEpGAP/cel7A <i>S.cerevisiae</i>	pESC-EU2/cel7A <i>S.cerevisiae</i>
Ацицел	21,38 ± 1,4	30,7±1,37	20,01±0,96
Фильтровальная бумага (Ватман №1, 1 x 6см)	23,2 ± 0,3	89±4,19	25,3±1,05
КМЦ	2,9 ± 0,09	5±0,28	0
pNP-Lac	4.1 ± 0,08	3,25±0,13	2,82±0,1
pNP-Cell	3,8 ± 0,1	1,05±0,04	1,44±0,04

Необходимо отметить, что активность гликозилированной формы фермента (экстракт клеток YPH/cel7A^{GAPD}) на фильтровальной бумаге значительно выше (4 раза) по сравнению с активностью негликозилированной формы фермента.

Известно, что по сравнению с эндолюканазами, целлобиогидролазы достаточно эффективно гидролизуют кристаллические субстраты, такие, как фильтровальная бумага. Следовательно, результаты экспериментов показывают, что рекомбинантные штаммы содержат активные ферменты – целлобиогидролазы, которые, как было отмечено, гидролизуют кристаллические субстраты в виде фильтровальной бумаги.

Рекомбинантный CEL7A *L. Edodes*, экспрессированный в дрожжах, может быть использован в качестве термоустойчивого фермента. Термоустойчивость фермента необходима для деградации целлюлозы при высоких температурах. Однако для более эффективного гидролиза целлюлозы при высоких температурах, необходима коэкспрессия гена CEL7A с генами термоустойчивых эндо-1,4-β-глюканаз и 1,4-β-глюкозидазы, что является предметом наших дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

- King A.J., Cragg S.M., Li Y., Dymond J., Guille M.J., Bowles D.J., Bruce N.C., Graham I.A., McQueen-Mason S.J. Molecular insight into lignocellulose digestion by a marine isopod in the absence of gut microbes // Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A. - 2010. -№ 107. -P. 5345–5350.
- Sun Y., Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production: a review // Bioresour. Technol.-2002.- № 83. -P.1–11.
- Кастельянос О.Ф. Каталитические биохимические и биотехнологические свойства целлюлазного комплекса *Penicillium verruculosum* и его компонентов: дис....канд. хим.наук. – МГУ,1995. -204с.

4. Скомаровский А.А. Компонентный состав и гидролитическая способность ферментного комплекса *Penicillium verruculosum*: дис.... канд. хим.наук.- М.,2006.-176 с.
5. Murashima K., Kosugi A., Doi R.H. Synergistic effects on crystalline cellulose degradation between cellulosomal cellulases from *Clostridium cellulovorans* // Journal of Bacteriology. – 2002. -Vol. 184. – № 18. -P. 5088-5095.
6. Cantarel B.L., Coutinho P.M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics // Nucleic Acids Res.-2009. -№ 37. -P. 233-238.
7. Garcia R., Cremata J.A., Quintero O., Montesino R., Benkestock K., Stehlberg, J. Characterization of protein glycoforms with N-linked is neutral and phosphorylated oligosaccharides: Studies on the glycosylation of endoglucanase 1 (Cel7B) from *Trichoderma reesei* // Biotechnol. Appl. Biochem. -2001. -№ 33. -P. 141-152.
8. Wong C.H. Protein glycosylation: New challenges and opportunities // JOC Perspective. -2005. -№ 70. -P.4219-4225.
9. Kasturi L., Chen H., Shakin-Eshleman S.H. Regulation of N-linked core glycosylation: use of a site-directed mutagenesis approach to identify Asn-Xaa-Ser/Thr sequins that are poor oligosaccharide acceptors // Biochem J. -1997. -Vol. 323. -P.415-419.
10. Qu Y.B., Gao P.J., Wang Z.N. Screening of catabolite repression-resistant mutants of cellulase producing *Penicillium spp.* // Acta Mycol. Sinica. -1984. -№ 3. -P.238-243.
11. van Zyl W.H., Lynd L.R., den Haan R., McBride J.E. Consolidated bioprocessing for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* in biofuels // Adv Biochem Eng Biotechnol. -2007. -Vol. 108. -P. 205-235.
12. Скиба Е.А., Будаева В.В., Митрофанов Р.Ю. Сбраживание нецелевых гидролизатов с помощью *Saccharomyces cerevisiae* (штамм Y-1693) // Ползуновский вестник. -2010. -№ 4-1. -С. 180-183.
13. Taipakova S.M., Smailov B.B., Stanbekova G., Bissenbaev A. K. Cloning and expression of *Lentinula edodes* cellobiohydrolase gene in *E. coli* and characterization of recombinant enzyme // Journal of Cell and Molecular biology.-Turkey, 2011. -Vol. 9. -№1. -P.53-63.
14. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding // Anal Biochem. -1976. -Vol.72. -P. 248-252.
15. Nelson N.J. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose // J Biol Chem. -1944. -Vol.153. -P. 375-380.
16. Somogyi M. Notes on sugar determination // J Biol Chem. -1952. -Vol.195. -P. 19-23.
17. Miller G.L. Using dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar // Anal. Chem. -1959. -Vol. 31. -P.426-428.
18. Taipakova S.M., Stanbekova G., Ischenko A., Saparbaev M., Bissenbaev A.K Cloning and expression of *Lentinula edodes* cellobiohydrolase CEL6B gene in *E. coli* // International Journal of chemistry and biology. -2011. -№1. -P.19-26.
19. Тайпакова С.М., Бисенбаев А.К. Клонирование и экспрессия кДНК целлобиогидролазы CEL7A гриба *Lentinula edodes* в про- и эукариотических системах и изучение физико-химических свойств рекомбинантного фермента // Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская. -2012. – №3, Vol. 291. -С. 39-46.
20. Lehle L. Protein glycosylation in yeast // Antonie van Leeuwenhoek. -1992. -Vol. 61, №2. -P.133-134.
21. Gross V., Hull W.E., Berger U., Andus T., Kreisel W., Gerok W., Keppler D. Inhibition of protein N-glycosylation by 2-deoxy-2-fluoro-D-galactose // Biochem J. -1992. -Vol. 285, №3. -P. 821-826.
22. Maley F. et al. Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases // Anal. Biochem. -1989. -Vol. 180. -P.195-204.

Бисенбаев А.К. Таипакова С.М.

**LENTINULA EDODES САҢЫРАУҚҰЛАҒЫНЫң ЦЕЛЛОБИОГИДРОЛАЗА CEL7A ГЕНИН
ЕКІ ТҮРЛІ ПРОМОТОРДЫҢ ҚОЛДАНЫЛУЫМЕН
SACCHAROMYCES CEREVISAIE ЖҮЙЕСІНДЕ ЭКСПРЕССИЯЛАУ**

Алғашкы рет, *L. edodes* саңырауқұлағының *CEL7A* целлобиогидролаза ферментін кодтайтын ген *S. cerevisiae* ашытқы клеткасының *YPH501a/a* штамында, реттелетін промотор *GAL10* мен конститутивті промотор *GAPDH* бақылауында клондалды. Потенциалды *O*-гликозилдену сайттарының *N*-соңында глициннің орналасуына байланысты, галактозамен индукцияланатын *GAL10* промоторы бақылауында, *CEL7A* белогының *O*-гликозилденуге ұзырамайтындығы көрсетілді. Рекомбинантты *CEL7A*-ның *N*-гликозилдену галактозамен тәжелетіндігі, ал конститутивті *GAPDH* промоторы бақылауында, ортада галактозаның болмауына байланысты, фермент *N*-гликозилденуге ұзырайтындығы анықталды. *S. cerevisiae* және *E. coli* клеткаларында экспрессияланған *rCEL7A* авишел, фильтрлеуші кағаз, *pNP-Lac* пен *pNP-Cell* гидролиздеуге кабілеттілігі көрсетілді. Ашытқы жүйесінде *N*-гликозилденген *L. edodes rCEL7A* белсенеңілігінің температуралық көрсеткіштері осы ферменттің *N*-гликозилденбеген формаларымен салыстыранда жоғары температура көрсеткіштері (60-70°C) ауданына ығысатындығы анықталды.

Bissenbaev A.K., Taipakova S.M.

EXPRESSION OF CELLOBIOHYDROLASE CEL7A GENE FROM
LENTINULA EDODES IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
WITH USE OF TWO DIFFERENT PRIMERS

Heterologous expression of *L. edodes* cellobiohydrolase CEL7A in *S. cerevisiae* strain YPH501 a/a was tested both under the control of the constitutive glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and inducible GAL10 promoters. It has been shown that CEL7A expressed under the control of the galactose-inducible GAL10 promoter is not exposed to O-glycosylation due to the presence of a glycine residue at the amino terminal side of the potential O-glycosylation sites. N-glycosylation of recombinant CEL7A is inhibited by galactose, whereas enzymes expressed under the control of the constitutive GAPDH promoter undergoes to N-glycosylation due to the lack of galactose. The recombinant CEL7A has an ability to hydrolyze Avicel, Filter paper, p-Nitrophenyl β -D-lactopyranoside (pNP-Lac) and p-Nitrophenyl β -D-celllobioside (pNP-Cel). Temperature profiles for enzymatic activity of N-glycosylated CEL7A from *L. edodes* are shifted to higher values (60-70°C) compared with non-glycosylated form of the enzyme.