

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ И СИСТЕМЫ ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЯ

УДК 579.66

СВЯЗЬ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ S-СЛОЯ ШТАММОВ РОДА *LACTOBACILLUS* С ХАРАКТЕРНЫМ МОТИВОМ В ДОМЕНЕ САМОСБОРКИ

© 2023 г. С. В. Рыков^{1,*}, А. А. Войтенко^{1,2}, А. И. Селимзянова^{1,3}, О. В. Березина¹

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

²МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия

³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Москва, Россия

*E-mail: enterru@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.10.2023 г.

После доработки 27.10.2023 г.

Принята к публикации 27.10.2023 г.

Белки, формирующие поверхностный слой (S-слой) штаммов *Lactobacillus brevis* ATCC 367, ATCC 8287 и ATCC 14869, проверены на наличие гликозилирования. Впервые обнаружено гликозилирование белка S-слоя штамма ATCC 367. В составе поверхностного S-слоя штамма ATCC 367 имеются две формы белка SlpE, основная из которых с массой 56 кДа гликозилирована. Аминокислотная последовательность белка SlpE содержит мотив SASSAS, необходимый для гликозилирования и присутствующий у известных гликозилированных белков S-слоя лактобацилл. У двух других штаммов *L. brevis* гликозилирования белков S-слоя не обнаружено, а их последовательности не содержат характерного мотива.

DOI: 10.56304/S2782375X23030154

ВВЕДЕНИЕ

Лактобактерии – грамположительные облигатные или факультативные анаэробные бактерии, роль которых в жизни человека трудно переоценить. Многие виды лактобактерий издревле используются в качестве заквасок и являются эффективными пробиотиками. Они неинвазивны, непатогенны и способны размножаться в организмах человека и животных, формируя нормальную сбалансированную микрофлору. Прикрепляясь к слизистым оболочкам, лактобактерии исключают или уменьшают адгезию патогенных микроорганизмов [1, 2]. Некоторые виды лактобактерий являются важной составляющей микрофлоры верхних дыхательных путей человека, могут ингибировать рост патогенов, вызывающих синусит [3, 4], и облегчают аллергические заболевания, например симптомы круглогодичного аллергического ринита [5].

Известно, что лактобактерии могут взаимодействовать с иммунными клетками слизистой оболочки или эпителиальными клетками, выстилающими слизистую оболочку, модулируя специфические функции иммунной системы [2]. У лактобактерий было выявлено несколько факторов, влияющих на иммунный ответ *in vitro* и *in vivo*, включая гликаны клеточной поверхности, фер-

менты, модифицирующие структуру липотейхоевых кислот и метаболиты [1, 2].

Лактобактерии повышают иммуногенность перорально вводимых вакцин, таких как ротавирусная [6], полиомиелитная [7], холерная [8] и вакцина против вируса гриппа [9]. Некоторые штаммы лактобацилл стимулируют выработку секреторных и сывороточных IgA-антител [10]. Адьювантное и иммуномодулирующее действие лактобактерий на иммунитет также очевидно из многих исследований, в которых молочнокислые бактерии использовались в качестве средств доставки вакцины для иммунизации слизистых оболочек [11, 12].

Поверхностный белковый слой (**S-слой**) лактобактерий – упорядоченная ячеистая белковая структура, состоящая из белков с малой молекулярной массой (25–71 кДа), обладающих уникальной способностью к самосборке на поверхности клеток [13]. S-слой не только способен к самосборке на растущей клеточной поверхности, но и может быть реконструирован на поверхности клеток того же или другого вида бактерий, с которого он был ранее удален. Гетерологичная реконструкция S-слоя возможна в случае совпадения механизмов взаимодействия между связывающими доменами Slp-белков и компонентами клеточной стенки у донорного и акцепторного

штаммов. При этом механизмы адсорбции и состав полисахаридных рецепторов белков S-слоя у разных штаммов лактобацилл и лактококков могут различаться [14, 15].

Некоторые белки S-слоя лактобактерий, а также другие поверхностные белки, прикрепленные к клеточной стенке, гликозилированы [16, 17]. Гликановые структуры, связанные с Slp-белками, могут связываться с рецепторами распознавания образцов и таким образом участвовать в активации иммунного ответа, поэтому исследование структурных и биохимических особенностей гликанов S-слоя, а также молекулярных механизмов гликозилирования белков S-слоя является фундаментальной основой для разработки нового инструментария для молекулярного конструирования на основе S-слоя.

Лактобактерии *Lactobacillus brevis* – перспективная платформа для экспонирования модифицированных белков на поверхности клеток с перспективой создания новых живых вакцин [13]. Цель настоящей работы – поиск гликозилированных белков S-слоя у штаммов *L. brevis*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы лактобацилл *Lactobacillus brevis* ВКПМ В-5563 (=АТСС 367), *L. brevis* ВКПМ В-10405 (=АТСС 8287) и *L. brevis* ВКПМ В-10903 (=АТСС 14869) получены в Национальном биоресурсном центре “Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов” НИЦ “Курчатовский институт”.

Культуры штаммов лактобацилл выращивали на среде MRS (HiMedia Laboratories) при температуре 28°C без качания в течение 1–2 сут.

Белки S-слоя экстрагировали с помощью додецилсульфата натрия. Клетки штаммов лактобактерий осаждали из жидкой культуры центрифугированием на 3000 об./мин. Осадок ресуспендировали в растворе, содержащем 2% додецилсульфата натрия и 1 мМ меркаптоэтанол. Суспензию инкубировали при 70°C в течение 10 мин, после чего клетки собирали центрифугированием при 13000 об./мин и анализировали супернатант на присутствие белков S-слоя.

Препараты белков S-слоя анализировали методом электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) по Лэммли в денатурирующих условиях.

Идентификацию белков S-слоя проводили по масс-спектрометрическим пептидным картам специфического протеолитического гидролиза. Трипсинолиз проводили во фрагментах геля, содержащих полосы целевых белков. Масс-спектры регистрировали на времяпролетном MALDI масс-спектрометре BRUKER Ultraflex TOF/TOF MS (Bruker Daltonics GmbH, Германия) в режиме

положительных ионов. Регистрацию MALDI масс-спектров осуществляли в ЦКП Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича. Анализ полученных спектров проводили с помощью программного обеспечения FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics GmbH, Германия). Идентификацию белков по спектру проводили с помощью базы Mascot Server (Matrix Science).

Анализ гликозилирования белков S-слоя штаммов лактобацилл проводили методом окрашивания гликопротеинов в реакции с периодной кислотой и основанием Шиффа с помощью набора Pierce Glycoprotein Staining Kit (№ 24562, Thermo Scientific) в соответствии с инструкцией производителя.

Последовательности полных геномов штаммов *L. brevis* АТСС 367, АТСС 8287 и АТСС 14869 получены из базы данных GenBank. Модели пространственных структур белков S-слоя *L. brevis*, сконструированные с помощью алгоритма глубокого машинного обучения AlphaFold2, получены из базы данных UniProt. Выравнивание аминокислотных последовательностей и филогенетический анализ выполняли в программе ClustalX версии 2.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Препараты белков S-слоя были получены из клеток штаммов *L. brevis* ВКПМ В-5563 (АТСС 367), *L. brevis* ВКПМ В-10405 (АТСС 8287) и *L. brevis* ВКПМ В-10903 (АТСС 14869), представленных коллекцией ВКПМ. С помощью электрофореза в денатурирующем ПААГ экспериментально подтверждено наличие поверхностных белков в данных штаммах. Сравнительный анализ препаратов белков S-слоя показал значительное различие их состава у разных штаммов одного вида *L. brevis*. Так, на электрофореграмме препарата штамма В-5563 обнаружены полосы размером 48, 52 и 56 кДа, тогда как препарату штамма В-10903 соответствуют белковые полосы размером 45 и 52 кДа, а препарату штамма В-10405 – только одна полоса размером 48 кДа (рис. 1а).

Анализ геномов *L. brevis* АТСС 367, АТСС 8287 и АТСС 14869 и сопоставление с результатами [13] позволили идентифицировать гены белков S-слоя этих штаммов (табл. 1). Расчетная масса белков S-слоя штаммов АТСС 8287 и АТСС 14869 соответствовала экспериментальной (табл. 2). Однако мажорный белок S-слоя штамма АТСС 367 имел массу 56 кДа, что не соответствует ни одному из белков, обнаруженных в этом штамме в результате анализа генома. Тем не менее данный белок идентифицирован пептидным фингерпринтом как SlpE и, по-видимому, является его формой, кото-

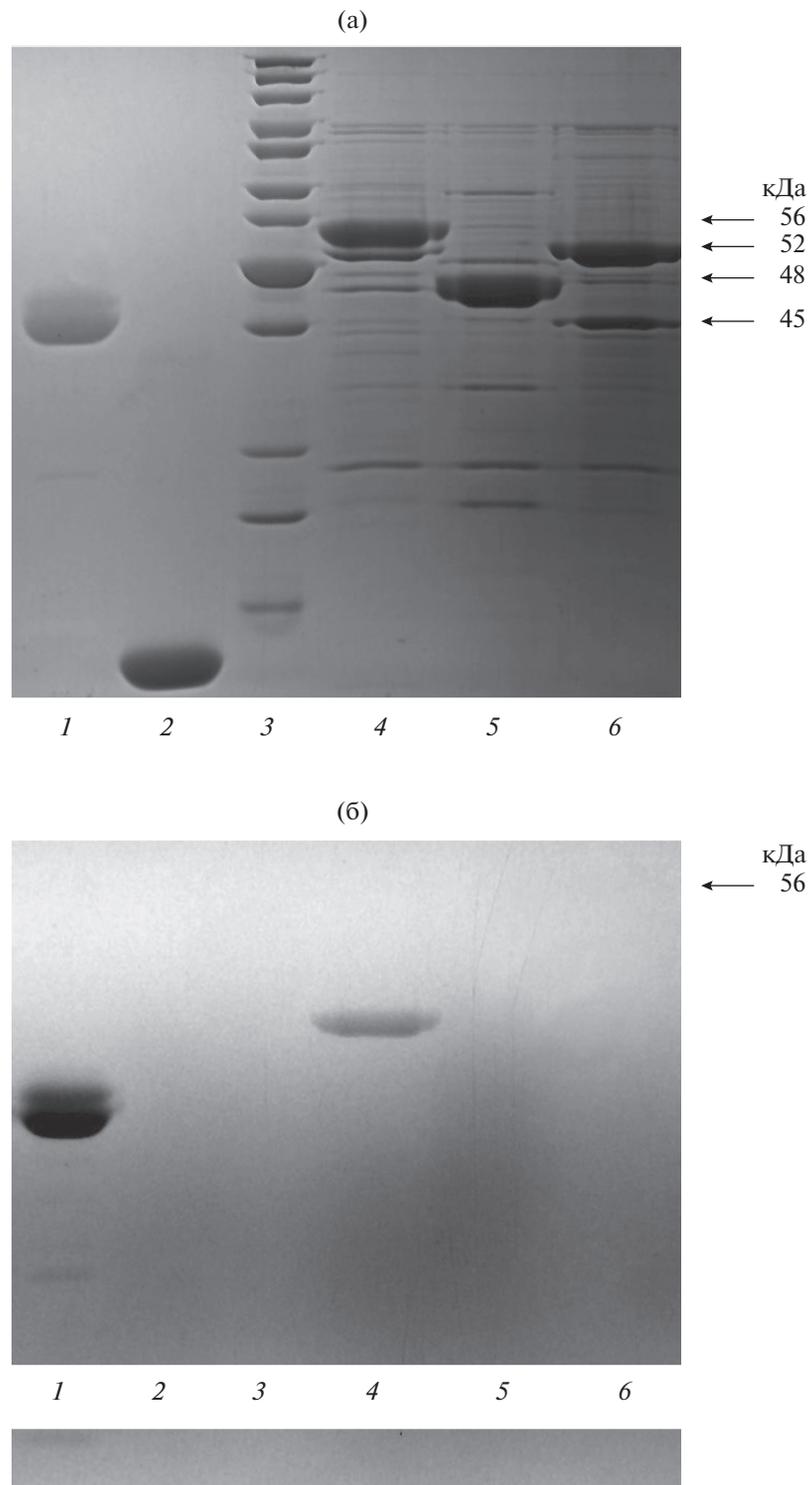


Рис. 1. Электрофореграмма экстрактов белков поверхностного S-слоя клеток штаммов *L. brevis*: а – окрашивание красителем Кумасси голубой, б – окрашивание периодной кислотой и основанием Шиффа. Номера дорожек: белок пероксидазы хрена, положительный контроль на гликозилирование (1), белок соевого ингибитора трипсина, отрицательный контроль на гликозилирование (2), маркер PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific) (3), экстракты белков поверхностного S-слоя клеток штаммов *Lactobacillus brevis* ATCC 367 (4), ATCC 8287 (5) и ATCC 14869 (6).

Таблица 1. Идентификация генов, кодирующих белки S-слоя, в геномах штаммов *L. brevis* ATCC 367, *L. brevis* ATCC 8287 и *L. brevis* ATCC 14869

Штамм ATCC	Slp-ген	Slp-белок (UniProt), кДа	Slp-ген	Slp-белок (UniProt), кДа	Slp-ген	Slp-белок (UniProt), кДа
367	LVIS_2083	Q03NT3 48			KY273133	SlpE 52
8287	slpA	Q05044 48				
14869	slpB	Q8GFE5 52	slpC	Q8GFE4 49	slpD	Q8GFE3 45

Таблица 2. Экспериментальная идентификация белков S-слоя в клетках штаммов *L. brevis* ВКПМ В-5563 (ATCC 367), *L. brevis* ВКПМ В-10405 (ATCC 8287) и *L. brevis* ВКПМ В-10903 (ATCC 14869) из коллекции ВКПМ

В-5563 (ATCC 367)		В-10405 (ATCC 8287)		В-10903 (ATCC 14869)	
Белок	ММ, кДа	Белок	ММ, кДа	Белок	ММ, кДа
SlpE_glyc	56			SlpB	52
SlpE	52				
LVIS_2083	48	SlpA	48	SlpD	45

Примечание. ММ – молекулярная масса.

рая образуется в процессе посттрансляционной модификации.

Впервые проведен анализ гликозилирования белков S-слоя штаммов *L. brevis* ATCC 367, ATCC 8287 и ATCC 14869. Устойчивое специфическое окрашивание в геле приобретал только белок с молекулярной массой 56 кДа штамма *L. brevis* ATCC 367 (рис. 16). Таким образом, различие расчетной и фактической массы белка SlpE действительно объясняется гликозилированием.

Известны случаи гликозилирования белков S-слоя среди штаммов рода *Lactobacillus*. Достоверно определено и детально исследовано гликозилирование белков S-слоя у штаммов *L. buchneri* 41021/251, CD034, NRRL В-30929 [18] и *L. kefir* CIDCA 83111 [19].

Основной белок S-слоя SlpB штамма *L. buchneri* CD034 гликозилирован по O-типу по четырем сериновым остаткам в последовательности: S(152)-A-S(154)-S(155)-A-S(157). Каждый сериновый остаток содержит гликановый хвост, состоящий в среднем из семи глюкоз, связанных последовательно $\alpha(1-6)$ -гликозидной связью. Белок S-слоя SlpN штамма *L. buchneri* NRRL В-30929 содержит идентичный мотив и также гликозилирован по типу штамма CD034. Было обнаружено, что белки LbGH25B (*L. buchneri* CD034) и LbGH25N (*L. buchneri* NRRL В-30929) содержат тот же мотив S-A-S-S-A-S и гликозилируются подобным образом.

Гликозилирование белка S-слоя *L. kefir* CIDCA 83111 происходит схожим с *L. buchneri* образом: четыре сериновых остатка в последова-

тельности SSASSASSA гликозилируются по O-типу. Гликановый хвост состоит из пяти–восьми остатков глюкозы и оканчивается галактуроновой кислотой (до трех остатков). Кроме того, обнаружен гликозилированный пептид с последовательностью TTTSAE и характерным гликановым хвостом в пять–восемь остатков глюкозы и галактуроновой кислотой (1–2 остатка). Также открыто гликозилирование белка S-слоя *L. kefir* CIDCA 83111 по N-типу.

Филогенетический анализ последовательностей белков штаммов *L. brevis* LVIS_2083, SlpE (ATCC 367), SlpA (ATCC 8287), SlpB, SlpC и SlpD (ATCC 14869) подтверждает низкий уровень гомологии в данной группе (рис. 2). Гомологичными оказываются только N-концевые последовательности, приходящиеся на консервативный сигнальный пептид и домен присоединения к клеточной стенке. С-концевые последовательности, которые формируют домен самосборки, существенно различаются. Мотив SASSAS, специфичный для гликозилированных белков *L. buchneri* и *L. kefir*, присутствует только у SlpE штамма ATCC 367 (рис. 3а). Множественное выравнивание последовательностей белков SlpE *L. brevis* ATCC 367, SlpB *L. buchneri* CD034 (NCBI Accession number – AFS00631.1) и Slp *L. kefir* CIDCA 83111 (NCBI Accession number – SCA78675.1) указывает на разное положение мотива SASSAS. У SlpE мотив располагается на краю С-конца последовательности, в то время как у SlpB и Slp мотив располагается ближе к N-концу в районе 150 остатка (рис. 3б). Такое расположение сайтов гликозилирования

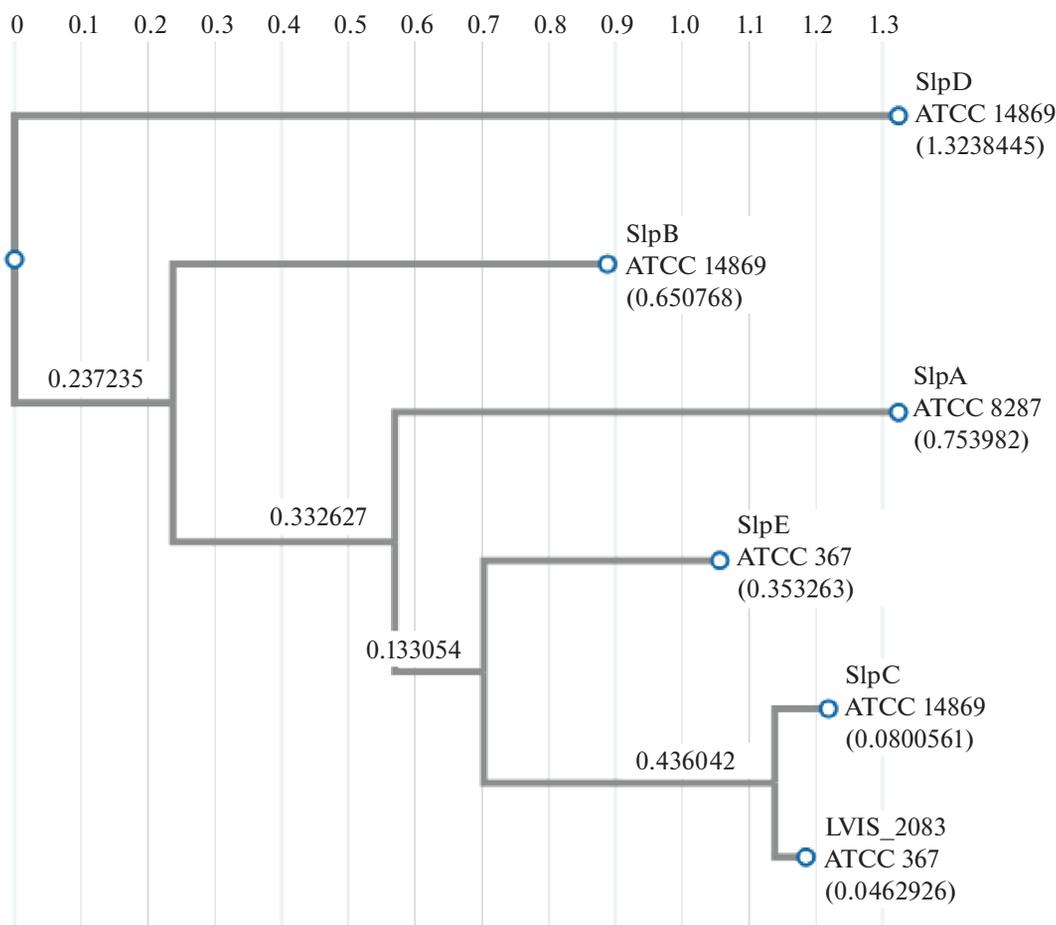


Рис. 2. Филогенетический анализ последовательностей белков штаммов *L. brevis* LVIS_2083, SlpE (ATCC 367), SlpA (ATCC 8287), SlpB, SlpC и SlpD (ATCC 14869).

может быть связано с различной архитектурой белков S-слоя, для которых положение домена самосборки может быть как у *L. brevis* с C-конца, так и как у *L. crispatus* и *L. acidophilus* с N-конца. Таким образом, присутствие мотива SASSAS в последовательности белка S-слоя ассоциировано с посттрансляционным гликозилированием.

Функционализация белков S-слоя с помощью гликоинженерии является перспективным направлением фундаментальных и прикладных исследований белков S-слоя и может быть использована как для анализа процесса гликозилирования белков S-слоя, так и для их искусственного оснащения функциональными мотивами гликозилирования для (нано)биотехнологических или биомедицинских целей [20]. Успешность стратегии закрепления гликозилированных белков S-слоя на клеточной поверхности была продемонстрирована на примере *E. coli*, на поверхности которой были реконструированы рецепторы токсина Шига, способного адсорбировать и нейтрализовать этот токсин с очень высокой эффективностью [21]. Возможность рекристаллизации S-слоя *in vitro* на широ-

ком спектре подложек позволяет воспользоваться уникальным преимуществом кристаллической, регулярной “иммобилизационной матрицы”, обеспечивающей контролируемое отображение на поверхности “функциональных” мотивов гликозилирования [20].

Использование гликозилированных белков S-слоя создает новую стратегию для функционализации поверхностей. Эта стратегия обладает большим биотехнологическим потенциалом, включающим в себя разработку аффинных матриц, биосовместимых поверхностей и мукозальных вакцин. Экспонирование гликозилированных белков S-слоя на клеточной стенке бактерий можно использовать для адресной доставки антигенов, скрининга библиотек пептидов, разработки биокатализаторов и диагностики [22–24]. Белки S-слоя лактобацилл, в том числе впервые обнаруженный нами белок SlpE из *L. brevis*, являются потенциальными кандидатами для использования в системах экспонирования и доставки антигенов. Применение пробиотических лактобацилл, несущих гликозилированные белки S-слоя, для направ-

(a)

```

LVIS_2083  SDKYYTEYTLVSLPGTYGVTTKAFYVASEKTNPSVSPVVSAGTTGYYTNK-----
SlpC      SDKYYTEYTLVSLPGTYGVTTKAFYVASEKTNPSMSPVVSAGTTGYYHTN-----
SlpE      YYIKYTLSTAEDGTYGAKSAATLVYTASDKIKGESPASTTSNGDNGSVWGSTSTSSSSSTSS SAASASSTEASTSSSASSAS
SlpA      GKAYHYTYTYNKDSAASSNASTQFGSNVTGTLTATLVMGKSTATANGTTWFN-----
SlpB      SVTYQWVLTSPQAFAGQYGS PFSAIYTAARKTVVPATGSNDMNTDNP IANGVVSTPTANPTDTTK
SlpD      THYGDQLKLAYKLDNTNLYYKPVISLGLTNTNADGYAALPVQLNAMNTLWGLLYQ-----

```

(б)

SlpE ATCC 367

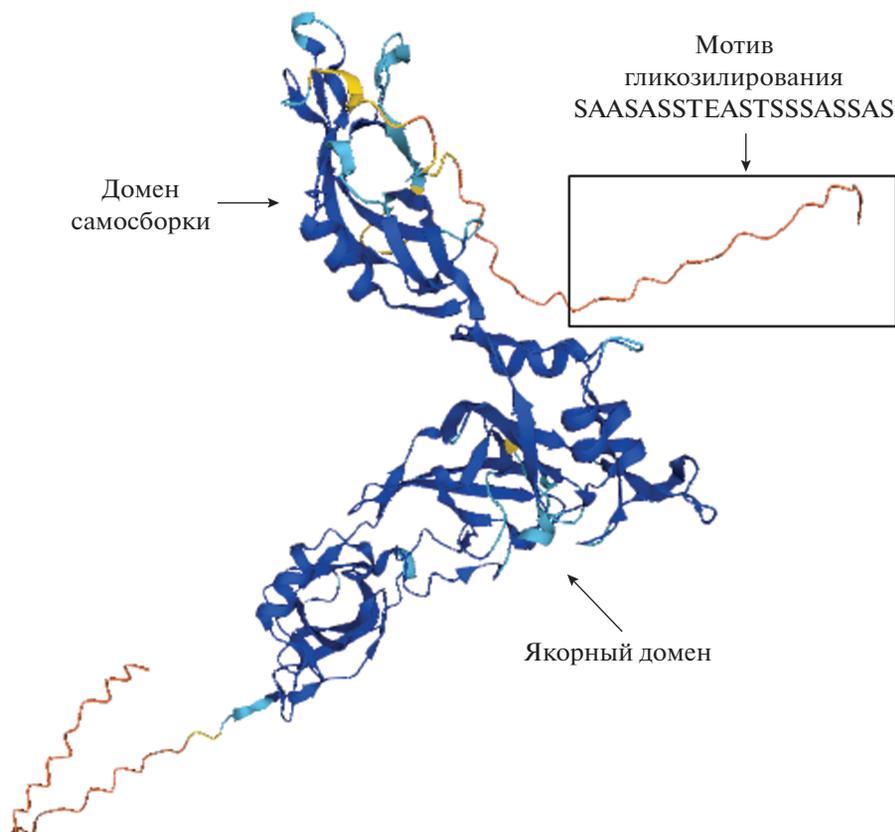


Рис. 3. Положение мотива гликозилирования у белка SlpE штамма *Lactobacillus brevis* ATCC 367: а – множественное выравнивание С-концевых последовательностей белков штаммов *L. brevis* LVIS_2083, SlpE (ATCC 367), SlpA (ATCC 8287), SlpB, SlpC и SlpD (ATCC 14869), мотив гликозилирования выделен цветом и обведен в рамку, б – пространственная модель белка SlpE штамма *L. brevis* ATCC 367 и позиция мотива гликозилирования.

ленной доставки антигенов является перспективным способом разработки новых вакцин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен анализ гликозилирования белков S-слоя штаммов *L. brevis* ATCC 367, ATCC 8287 и ATCC 14869 методом окрашивания гликопротеинов в реакции с периодной кислотой и основанием Шиффа. Впервые обнаружено гликозилирование белка S-слоя штамма *L. brevis* ATCC 367. В со-

ставе поверхностного S-слоя штамма *L. brevis* ATCC 367 имеются две формы белка SlpE, основная из которых с массой 56 кДа гликозилирована. Гликозилирование белков S-слоя у двух других штаммов *L. brevis* не обнаружено. Анализ аминокислотных последовательностей белков S-слоя штаммов *L. brevis* и известных гликозилированных белков штаммов *L. buchneri* CD034 и *L. kefir* CIDCA 83 111 показал, что наличие гликозилирования ассоциировано с присутствием мотива SASSAS в последовательности белка.

Работа выполнена в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Новохионов А.А., Соколова Н.В.* // Эффективная фармакотерапия. Эпидемиология и инфекции. 2013. Т. 54. № 2. С. 20.
2. *Peters V.B.M., van de Steeg E., van Bilsen J., Meijerink M.* // *Benef. Microbes.* 2019. V. 10. № 3. P. 225. <https://doi.org/10.3920/BM2018.0066>
3. *De Boeck I., van den Broek M.F.L., Allonsius C.N. et al.* // *Cell Rep.* 2020. V. 31. № 2. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107674>
4. *Lee J.T., Frank D.N., Ramakrishnan V.* // *Am. J. Rhinol. Allergy.* 2016. V. 30. № 1. P. 3. <https://doi.org/10.2500/ajra.2016.30.4255>
5. *Ishida Y., Nakamura F., Kanzato H. et al.* // *Biosci. Biotech. Biochem.* 2005. V. 69. № 9. P. 1652. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.1652>
6. *Isolauri E., Joensuu J., Suomalainen H. et al.* // *Vaccine.* 1995. V. 13. № 3. P. 310. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(95\)93319-5](https://doi.org/10.1016/0264-410X(95)93319-5)
7. *De Vrese M., Rautenberg P., Laue C. et al.* // *Eur. J. Nutrition.* 2005. V. 44. № 7. P. 406. <https://doi.org/10.1007/s00394-004-0541-8>
8. *Paineau D., Carcano D., Leyer G.* // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2008. V. 53. № 1. P. 107. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00413.x>
9. *Kobayashi N., Saito T., Uematsu T. et al.* // *Int. Immunopharmacol.* 2011. V. 11. № 2 P. 199. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.11.019>
10. *Kotani Y., Shinkai S., Okamatsu H. et al.* // *Immunol. Ageing.* 2010. V. 7 № 11. P. 1. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-7-11>
11. *Wells J.M., Mercenier A.* // *Nat. Rev. Microbiol.* 2008. V. 6. № 5. P. 349. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1840>
12. *De Vuyst L., Degeest B.* // *FEMS Microbiol. Rev.* 1999. V. 23. № 2. P. 153. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00395.x>
13. *Rykov S.V., Yegorov Y.E., Vishnyakova H.S., Berezhina O.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2018. V. 44. № 2. P. 199. <https://doi.org/10.1134/S1068162018010156>
14. *Åvall-Jääskeläinen S., Kylä-Nikkilä K., Kahala M. et al.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. № 12. P. 5943. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.5943-5951.2002>
15. *Avall-Jääskeläinen S., Palva A.* // *FEMS Microbiol. Rev.* 2005. V. 29. № 3. P. 511. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.003>
16. *Mobili P., Serradell M. de L., Trejo S.A. et al.* // *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2009. V. 95. № 4. P. 363. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9322-y>
17. *Francius G., Lebeer S., Alsteens D. et al.* // *ACS Nano.* 2008. V. 2. № 9. P. 1921. <https://doi.org/10.1021/nn800341b>
18. *Anzengruber J., Pabst M., Neumann L. et al.* // *Glycoconjugate J.* 2014. V. 31. № 2. P. 117. <https://doi.org/10.1007/s10719-013-9505-7>
19. *Cavallero G.J., Malamud M., Casabuono A.C. et al.* // *J. Proteomics.* 2017. V. 162. P. 20. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.04.007>
20. *Messner P., Steiner K., Zarschler K., Schäffer C.* // *Carbohydr. Res.* 2008. V. 343. № 12. P. 1934. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.12.025>
21. *Paton A.W., Morona R., Paton J.C.* // *Nat. Med.* 2000. V. 6. № 3. P. 265. <https://doi.org/10.1038/73111>
22. *Leenhouts K., Buist G., Kok J.* // *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1999. V. 76. № 1–4. P. 367.
23. *Yu Q., Zhu L., Kang H., Yang Q.* // *Human Vaccin. Immunother.* 2013. V. 9. № 4. P. 805. <https://doi.org/10.4161/hv.23302>
24. *Hynönen U., Palva A.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 97. № 12. P. 5225. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4962-2>