

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.15

### СВОЙСТВА ЧЕТЫРЕХ С-КОНЦЕВЫХ УГЛЕВОДСВЯЗЫВАЮЩИХ МОДУЛЕЙ (СВМ4) ЛАМИНАРИНАЗЫ Lic16A *Clostridium thermocellum*

© 2012 г. И. А. Дворцов<sup>1\*</sup>, Н. А. Лунина<sup>1</sup>, В. В. Зверлов<sup>1,2</sup>, Г. А. Великодворская<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва, 123182

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Technische Universität München, Freising, 85350 Germany

Поступила в редакцию 11.04.2012 г.

Принята к печати 27.04.2012 г.

На С-конце мультимодульной ламинариназы Lic16A *Clostridium thermocellum* расположен тандем из четырех углеводсвязывающих модулей (СВМ), относящихся к семейству 4. Получены изолированные СВМ: СВМ4\_1, СВМ4\_2, СВМ4\_3, СВМ4\_4 и тандем СВМ4\_(1-4). Ни один из рекомбинантных модулей не обладал сродством к растворимым  $\beta$ -1,3-1,4-глюканам – лихенану и ламинарину, основным субстратам Lic16A. Все модули, за исключением СВМ4\_4, обладали способностью связываться с бактериальной кристаллической целлюлозой, что нетипично для семейства СВМ4. У СВМ4 Lic16A обнаружено сродство к ксилану, хитину,  $\beta$ -глюкану клеточной стенки дрожжей и авицелу, а у СВМ4\_3 и СВМ4\_4 – к хитозану. Тандем СВМ4\_(1-4) обладал наиболее высоким сродством к  $\beta$ -глюкану клеточной стенки дрожжей, авицелу и пустилану. Константы связывания тандема на этих субстратах примерно в 100 раз выше, чем у отдельных модулей, что свидетельствует о наличии синергизма модулей в процессе адсорбции на перечисленных полисахаридах. Эти результаты помогают прояснить мультипликацию СВМ в процессе эволюции.

**Ключевые слова:** *Clostridium thermocellum*, ламинариназа, мультимодульные белки, углеводсвязывающие модули, бета-глюкан, сайты связывания, синергизм.

THE PROPERTIES OF FOUR C-TERMINAL CARBOHYDRATE-BINDING MODULES (CBM4) OF LAMINARINASE Lic16A OF *Clostridium thermocellum*, by I. A. Dvortsov<sup>1\*</sup>, N. A. Lunina<sup>2</sup>, V. V. Zverlov<sup>1,2</sup>, G. A. Velikodvorskaya<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123182 Russia; \*e-mail: dvortsov@img.ras.ru; <sup>2</sup>Department of Microbiology, Technische Universität München, Freising, 85350 Germany). At the C-terminus of multimodular laminarinase Lic16A *Clostridium thermocellum* four carbohydrate-binding modules (CBM), belonging to family 4, were found. The isolated CBM – CBM4\_1, CBM4\_2, CBM4\_3, CBM4\_4 and the tandem CBM4\_(1-4) were obtained. None of the recombinant proteins did have the affinity to soluble  $\beta$ -1,3-1,4-glucans – laminarin and lihenan – the main specific substrates of Lic16A. All modules, except CBM4\_4, had the ability to bind bacterial crystalline cellulose, that was atypical for the family 4 CBMs. We found that all CBMs 4 of Lic16A had affinity for xylan, chitin,  $\beta$ -glucan from yeast cell wall and Avicel, while CBM4\_3 and CBM4\_4 had additional affinity to chitosan. The tandem CBM4\_(1-4) had the highest affinity to yeast cell wall  $\beta$ -glucan, avicel and pustulan. The binding constants for these substrates were about 100 times higher than that of the individual modules, suggesting a synergy in the process of adsorption to these polysaccharides. This finding helps to explain the evolutionary process of CBM multiplication.

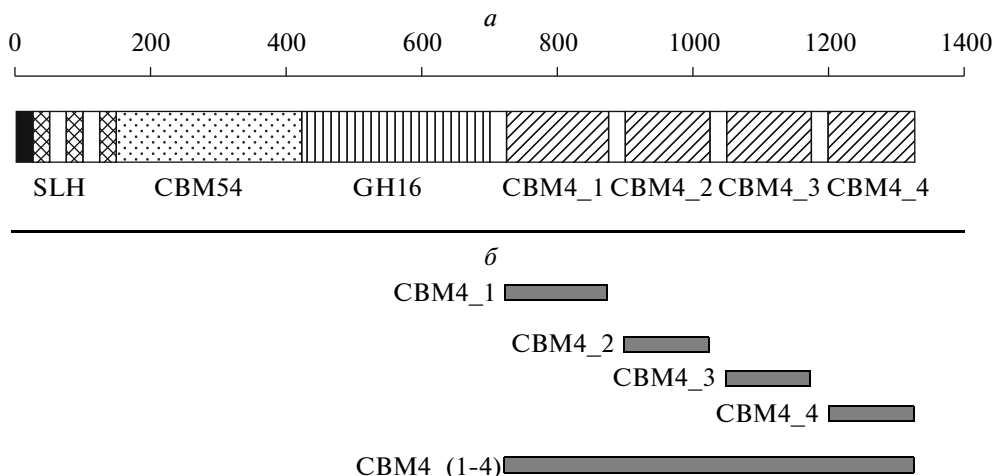
**Keywords:** *Clostridium thermocellum*, laminarinase, multimodular proteins, carbohydrate binding modules,  $\beta$ -glucan, binding sites, synergy.

Бактериальные ферменты, гидролизующие целлюлозу и гемицеллюлозу, часто имеют комплексную молекулярную структуру и содержат помимо каталитического модуля один или несколько углеводсвязывающих модулей (СВМ), соединенных линкерными последовательностями

[1, 2]. На основании анализа первичных структур СВМ подразделяются на семейства [3]. В настоящее время известно более 60 таких семейств (www.cazy.org). В работе Линдер и др. показано, что конструкция из двух ковалентно связанных СВМ семейства 1 адсорбируется на порядок луч-

Принятые сокращения: СВМ4 – углеводсвязывающий модуль 4-го семейства; ПААГ – полиакриламидный гель; ВСС – бактериальная кристаллическая целлюлоза; SLH – модули, гомологичные белкам S-слоя стенки клетки бактерий; ЭФ – электрофорез; а.о. – аминокислотный остаток.

\* Эл. почта: dvortsov@img.ras.ru



**Рис. 1.** Структура лихеназы Lic16A *Clostridium thermocellum* и ее делеционных производных. *а* – Модульная структура ламинариназы Lic16A; SLH – модули, гомологичные белкам S-слоя клеточной стенки бактерий; CBM54 – субстрат-связывающий модуль семейства 54; CBM4<sub>n</sub> – С-концевые CBM семейства 4; GH16 – каталитический модуль семейства 16 гликозил-гидролаз. *б* – Генно-инженерные конструкции индивидуальных С-концевых CBM и тандема.

ше на кристаллической целлюлозе, чем индивидуальные CBM [4]. В данном случае наблюдали синергизм CBM. Аналогичный эффект показан для двух CBM семейства 2b ксиланазы 11A [5].

Бактерия *Clostridium thermocellum* давно привлекает внимание исследователей как источник термостабильных ферментов, предназначенных для деградации целлюлозы [6, 7]. Этот организм утилизирует, главным образом, целлюлозу, целлодекстрины и  $\beta$ -1,3(1,6; 1,4)-глюканы с помощью целлюлосомной и вспомогательной систем ферментов. Основная – целлюлосомная [8–10]. К вспомогательной системе относят свободные ферменты [11], например ламинаразу Lic16A [12]. Этот белок (1323 а.о., мол. масса – 148 кДа) состоит из 9 дискретных модулей, 5 из которых – углеводсвязывающие (рис. 1). Свойства фермента и N-концевого CBM54 исследованы нами ранее [12–14]. На растворимых субстратах с  $\beta$ -1,3-связями – лихенане и ламинарине – он высоко активен, а на нерастворимых глюканах с  $\beta$ -1,3 и  $\beta$ -1,6-связями (пахимане и курдлане) – мало активен. Фермент не проявлял активности в отношении нерастворимого  $\beta$ -1,3-1,4-глюкана клеточной стенки дрожжей, ксилана и хитина. Он умеренно термостабилен (оптимум при 60–70°C) и локализован на поверхностном слое клеточной стенки *C. thermocellum*.

На С-конце Lic16A расположен тандем четырех гомологичных углеводсвязывающих модулей, относящихся к семейству CBM4, свойства и функции которых неизвестны. Работа посвящена изучению субстрат-связывающих свойств CBM4, расположенных на С-конце ламинариназы, а так-

же влиянию С-концевых модулей на свойства Lic16A.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Бактериальные штаммы и векторы.** В работе использовали штамм *E. coli* XL-1 Blue, рекомбинантную плазмиду pCU309, несущую ген *lic16A* *C. thermocellum* (GenBank, Acc. No. CAA61884.2, CAC27412.2) [12] и вспомогательную плазмиду pACYC-ryl для эффективной трансляции клостридиального гена в клетках *E. coli*. Клетки *E. coli* культивировали при 37°C в среде LB с добавлением необходимых антибиотиков.

**Процедуры работы с ДНК.** Выделение и очистку плазмидной ДНК, клонирование, рестрикцию, ПЦР проводили по стандартным методикам. Для амплификации отдельных модулей CBM4 использовали следующие олигонуклеотидные праймеры: CBM4\_1: прямой – 5'-aag gga gga tcc aaa gat aaa tat cct cac agg gaa-3', обратный – 5'-tta caa aag ctt tta tgt ttt aat cag ttt aac att-3'; CBM4\_2: прямой – 5'-ttc tag gga tcc gaa gat gcg ccg gtt ata gat cct-3', обратный – 5'-tta cag aag ctt tta tac tct ttt cat aac gac att-3'; CBM4\_3: прямой – 5'-gta caa gga tcc acc gat gaa gtt gaa gga aac ctg-3', обратный – 5'-tta caa aag ctt tta aac ttt tct tac tac aac att-3'; CBM4\_4: прямой – 5'-gtc gcg gga tcc gcg act cct tct gcg ctg-3', обратный – 5'-tga tga aag ctt tta aag ata gac agt agt-3'; CBM4\_(1-4): прямой – 5'-aag gga gga tcc aaa gat aaa tat cct cac agg gaa-3', обратный – 5'-cta taa aag ctt tta ctg ttg ttc cag caa aat atc-3'. Полученные фрагменты ДНК клонировали в экспрессионном векторе pQE30 (“Qiagen”). Идентич-

ность клонированных последовательностей подтверждали секвенированием.

**Очистка белков.** Клетки *E. coli*, содержащие рекомбинантные клоны после культивирования в LB-среде с добавлением ампициллина (100 мг/л) и хлорамфеникола (50 мг/л), собирали центрифугированием, ресуспендировали в 50 мМ Na-фосфатном буфере и разрушали ультразвуком. Белковые фракции очищали на Ni-NTA-агарозе по методикам, рекомендованным производителем (“GE Healthcare”). Концентрации белков определяли по методу Брэдфорд [11]. Молекулярный вес белков и степень очистки определяли с помощью электрофореза (ЭФ) в денатурирующих условиях в полиакриламидном геле (ПААГ) по Лэммли [15]. Анализ олигомерной организации СВМ4\_4 проводили с помощью гель-проникающей хроматографии на колонке Superdex HR 10/30 (50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7.5, расход 0.4 мл/мин), используя белки-маркеры.

**Связывание белков с нерастворимыми полисахаридами.** Белки в связывающем буфере (50 мМ Трис-HCl, pH 7.0, 0.05%-ный Твин-20) инкубировали вместе с нерастворимыми полисахаридами в течение 3 ч при 4°C с перемешиванием. Затем пробы центрифугировали, надосадочную жидкость отбирали и измеряли концентрацию в ней несвязавшегося белка по методу Брэдфорд. Количество связавшегося белка определяли, вычитая количество свободного из добавленного в пробу. Константы связывания и субстратные емкости определяли с помощью уравнения:

$$[B] = \frac{N_0[F]}{\frac{1}{K} + [F]}$$

где  $[B]$  – количество связавшегося белка на единицу массы субстрата,  $[F]$  – концентрация свободного белка,  $N_0$  – субстратная емкость (число сайтов посадки субстрат-связывающего модуля на поверхности субстрата на единицу массы субстрата),  $K$  – константа связывания модуля с субстратом.

**Полисахариды.** СВМ4 связывали со следующими субстратами: пстулан (“Roth”), хитин, хитозан, ксилан, бактериальная кристаллическая целлюлоза, авицел CFI (“Sigma-Aldrich”). Нерастворимый  $\beta$ -D-глюкан дрожжевой стенки *Saccharomyces cerevisiae* получали по методу, описанному в работе [16].

**Связывание белков с растворимыми полисахаридами.** Связывание с растворимыми субстратами проводили с помощью аффинного ЭФ по известной методике [18]. В нативные полиакриламидные гели (ПААГ, 10%) перед полимеризацией добавляли растворимые полисахариды до кон-

центрации 1 мг/мл. ЭФ проводили при 4°C одновременно для геля с добавленными полисахаридами и без них. В качестве отрицательного контроля использовали бычий сывороточный альбумин. Белковые зоны окрашивали с помощью Coomassie brilliant blue R-250.

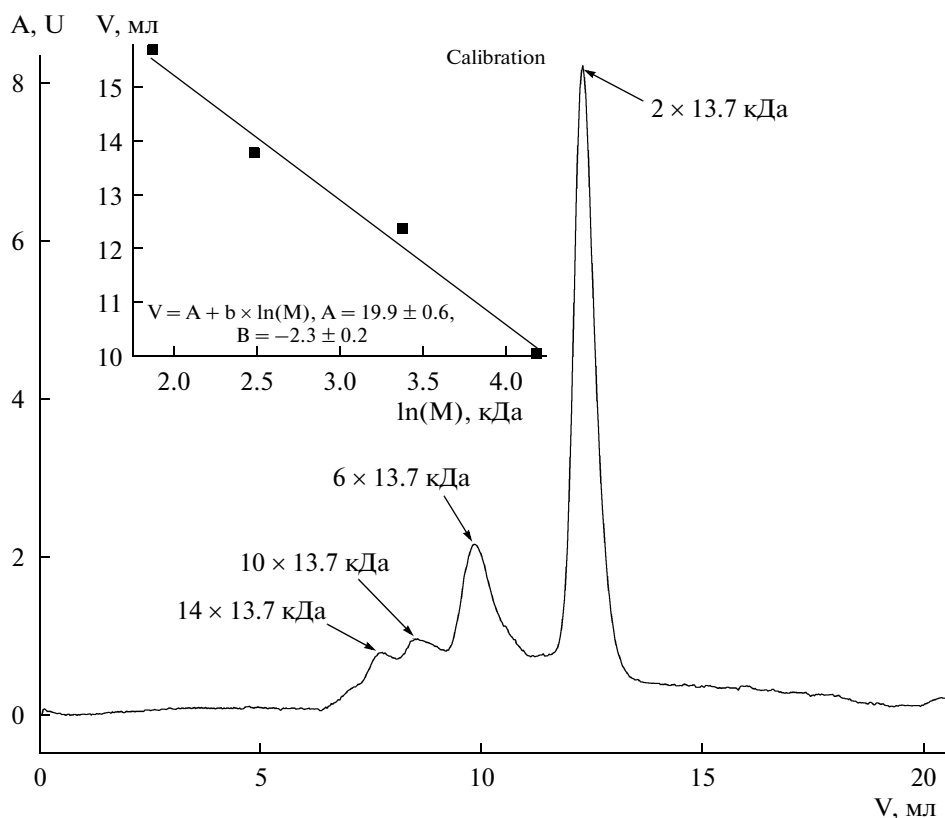
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Клонирование и экспрессия СВМ, расположенных в С-концевой области Lic16A*

Ранее показано, что мультимодульная лихеназа Lic16A из *C. thermocellum* содержит 8 вспомогательных модулей помимо каталитического (рис. 1). В С-концевой области Lic16A расположен тандем из четырех гомологичных СВМ, относящихся к семейству СВМ4 углеводсвязывающих модулей и обозначенных как СВМ4\_1, СВМ4\_2, СВМ4\_3, СВМ4\_4. Удаление этих модулей не приводило к изменению активности фермента [13]. С целью изучения данного участка Lic16A получены индивидуальные СВМ и тандем СВМ4\_(1-4) из четырех модулей (рис. 1). Соответствующие белки экспрессировали в клетках *E. coli* с использованием рекомбинантных плазмид pQE, содержащих последовательности СВМ с добавленными His6-tag, что позволило провести одноступенчатую очистку белков с помощью аффинной хроматографии. Полученные белки гомогенны по данным ЭФ в денатурирующих условиях (данные не представлены) и имели следующие молекулярные массы: СВМ4\_1 (17.7 кДа), СВМ4\_2 (17.7 кДа), СВМ4\_3 (16.7 кДа) и СВМ4\_(1-4) – 67.6 кДа, что соответствовало рассчитанным значениям по аминокислотной последовательности. В случае СВМ4\_4 при ЭФ-ПААГ в денатурирующих условиях обнаружили ряд белковых зон, соответствующих мономеру (13.7 кДа), димеру и мультимерам СВМ4\_4. Поэтому молекулярная масса нативного белка определена нами с помощью гель-фильтрации (рис. 2). В нативных условиях мономер не обнаружен, в основном белок представлен в виде димера.

### *Субстратсвязывающие свойства С-концевых СВМ4A Lic16A*

Ни один из полученных нами рекомбинантных белков не обладал сродством к растворимым субстратам – лихенану и ламинарину, полисахаридам содержащим  $\beta$ -1,3-связи и являющимися основными субстратами для Lic16A. Не обнаружено связывания концевых СВМ с карбоксиметилцеллюлозой и растворимым ксиланом (данные не представлены).



**Рис. 2.** Гель-фильтрация нативного рекомбинантного SVM4\_4. Кривая поглощения SVM4\_4 при гель-фильтрации в нативных условиях. На вставке показана калибровка с помощью которой оценены массы белков, соответствующих пикам. Теоретическая масса SVM4\_4 – 13.7 кДа.

Результаты связывания SVM4\_1, SVM4\_2, SVM4\_3 и тандема SVM4\_(1-4) с нерастворимыми субстратами представлены в таблице. В связи с гетерогенностью препарата SVM4\_4 его связывание с субстратами изучали только качественно. Сродство к субстратам проявлял только димер SVM4\_4. Димер связывался с авицелом, хитоза-

ном, ксиланом и слабо с пстуланом. С бактериальной кристаллической целлюлозой (ВСС), хитином,  $\beta$ -глюканом клеточной стенки дрожжей связывания обнаружено не было (данные не представлены). Все конструкции, за исключением SVM4\_4, обладали сродством к ВСС, нетипичным для семейства SVM4. Все белки обладают

#### Константы связывания и субстратные емкости С-концевых SVM4 LicA *C. thermocellum*

|            |       | Ксилан            | ВСС               | Авицел            | $\beta$ -Глюкан дрожжей | Пстулан           | Хитин             | Хитозан           |
|------------|-------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| SVM4_1     | $K$   | $1.3 \times 10^6$ | $3.4 \times 10^5$ | —                 | $2.1 \times 10^6$       | —                 | $3.8 \times 10^4$ | —                 |
|            | $N_0$ | 15                | 14                | —                 | 18                      | —                 | 18                | —                 |
| SVM4_2     | $K$   | $2 \times 10^6$   | $7.3 \times 10^4$ | —                 | $3.5 \times 10^5$       | —                 | $3.4 \times 10^4$ | —                 |
|            | $N_0$ | 12                | 15                | —                 | 13                      | —                 | 14                | —                 |
| SVM4_3     | $K$   | $3.8 \times 10^6$ | $4.9 \times 10^5$ | $2.2 \times 10^3$ | $3.2 \times 10^5$       | $2.4 \times 10^5$ | $4.5 \times 10^4$ | $1.8 \times 10^3$ |
|            | $N_0$ | 21                | 19                | 19                | 13                      | 17                | 15                | 7                 |
| SVM4_(1-4) | $K$   | $8.3 \times 10^6$ | $7.9 \times 10^5$ | $5.3 \times 10^6$ | $5.1 \times 10^7$       | $3.7 \times 10^7$ | $2.8 \times 10^4$ | —                 |
|            | $N_0$ | 12                | 11                | 17                | 11                      | 12                | 14                | —                 |

Примечание.  $K$  – константа связывания,  $M^{-1}$ .  $N_0$  – субстратная емкость,  $\mu\text{моль} \times \text{г}^{-1}$ . Погрешность измерения  $\leq 10\%$ .

сродством к ксилану, хитину,  $\beta$ -глюкану клеточной стенки дрожжей и аморфной целлюлозе, а SVM4\_3 и SVM4\_4 – к хитозану. Полученные результаты свидетельствуют о широкой субстратной специфичности SVM4, расположенных на С-конце Lic16A. Сродство к авицелу и пустулану обнаружили у SVM4\_3 и SVM4\_4. Тандем SVM4\_(1-4) обладал наиболее высоким сродством к  $\beta$ -глюкану клеточной стенки дрожжей, авицелу и пустулану. Константы связывания тандема на этих субстратах примерно в 100 раз выше, чем у отдельных модулей, что свидетельствует о синергизме между SVM, включенными в единую полипептидную цепь, в процессе адсорбции на перечисленных полисахаридах. На ксилане, ВСС, хитине константы связывания тандема совпадают по порядку с отдельными модулями. Сродства к хитозану у тандема не обнаружено. Вероятно, это связано со взаимодействием ковалентно связанных SVM, в процессе которого происходит перекрывание сайта связывания хитозана. У всех полисахаридов субстратная емкость тандема SVM ниже, чем у индивидуальных белков, что скорее всего обусловлено большей длиной тандема и конкуренцией за места посадки на субстрате. Повышение сродства к субстратам у тандема SVM по сравнению с индивидуальными модулями показывает эволюционную целесообразность мультипликации SVM. Такая мульти- или чаще дубликация SVM, относящихся к одному семейству, обнаружена у многих мультимодульных гликозилгидролаз. Их синергизм приводит к значительному повышению сродства к субстрату [4, 5].

#### **Анализ представителей семейства SVM4**

SVM семейства 4 вместе с модулями семейств 9, 17, 28 и других входят в суперсемейство SVM, обладающих общей 3D-укладкой типа  $\beta$ -сандвич. Помимо этого, семейства 4 и 9 принято объединять в семейство SVM\_4\_9 ввиду того, что они принадлежат одному кластеру суперсемейства. Модули 9 семейства специализируются на связывании ксилана и обнаружены в составе исключительно ксиланаз, в то время как модули семейства 4 обладают более широкой субстратной специфичностью и шире распространены. Несколько SVM семейства 4 изучены, и для них получены 3D-структуры. Все они относятся к типу  $\beta$ -jelly-roll. Дендрограмма модулей семейства 4 представлена на рис. 3. Ее отличает веерообразная структура. Кластеры подсемейств выражены слабо. Можно предположить наличие не менее 3–4 подсемейств. Уровень гомологии между любыми 2 модулями не ниже 30%. По-видимому, эти 30% аминокислотных остатков обеспечивают существование общей 3D-укладки  $\beta$ -сандвича. SVM

семейства 4 – белки размером примерно 150 а.о., в основном входят в состав бактериальных гликозилгидролаз. Связываются с ксиланом,  $\beta$ -1,3-глюканом,  $\beta$ -1,3-1,4-глюканом,  $\beta$ -1,6-глюканом, аморфной, но не кристаллической целлюлозой. В целом специализация модулей семейства 4 – связывание растворимых субстратов. Способность связывать нерастворимые полисахариды – авицел, ксилан, хитин,  $\beta$ -глюкан клеточной стенки дрожжей – обнаружена у SVM ламинариаз *Thermotoga maritima* и *T. neapolitana* [17] и нами у модулей ламинариазы Lic16A. Также нами обнаружено, что по крайней мере 3 модуля из четырех – SVM4\_1, SVM4\_2, SVM4\_3 связываются с кристаллической целлюлозой – ВСС, что является необычным для модулей семейства 4. На дендрограмме модули с изученной структурой вместе с модулями из термогоя лежат в одном кластере. В этом же кластере локализован SVM4\_4. Можно предположить наличие у него схожих субстрат-связывающих свойств. SVM4\_2 и SVM4\_3 расположены в одном кластере, но результаты связывания не показывают у них схожих свойств, а остальные модули Lic16A – в других кластерах. Субстрат-связывающие свойства SVM4\_2 сходны со свойствами SVM4\_1, однако эти модули расположены в разных кластерах. Веерообразная структура дерева SVM4 и нечеткость деления на кластеры свидетельствует о том, что в данном случае природа разными способами использует структурную пластичность  $\beta$ -сандвич-укладки для связывания с разнообразными субстратами, не останавливаясь на каком-то единственном варианте. Распределенность SVM4\_n по всей дендрограмме также может свидетельствовать о том, что способность связываться с кристаллической поверхностью распространена среди углеводсвязывающих модулей семейства 4.

#### **Роль С-концевых углеводсвязывающих модулей в Lic16A**

Нами показано, что SVM4\_1 и SVM4\_2 не связываются с авицелом и пустуланом, в отличие от SVM4\_3 и SVM4\_4. Однако опираясь на структуру дерева, функционального сходства нужно скорее ожидать от пар SVM4\_2, SVM4\_3 и SVM4\_1, SVM4\_4. Наибольшее сродство С-концевые SVM проявляют к ксилану,  $\beta$ -глюкану клеточной стенки дрожжей и пустулану, не являющимися субстратами для Lic16A. Поскольку тандем С-концевых SVM4 показал синергизм в отношении авицела, нерастворимого  $\beta$ -глюкана клеточной стенки дрожжей и пустулана, то, вероятно, роль тандема SVM4 Lic16A – доставка фермента к лихенану и ламинарину, в природе локализованных в комплексе именно с этими углево-

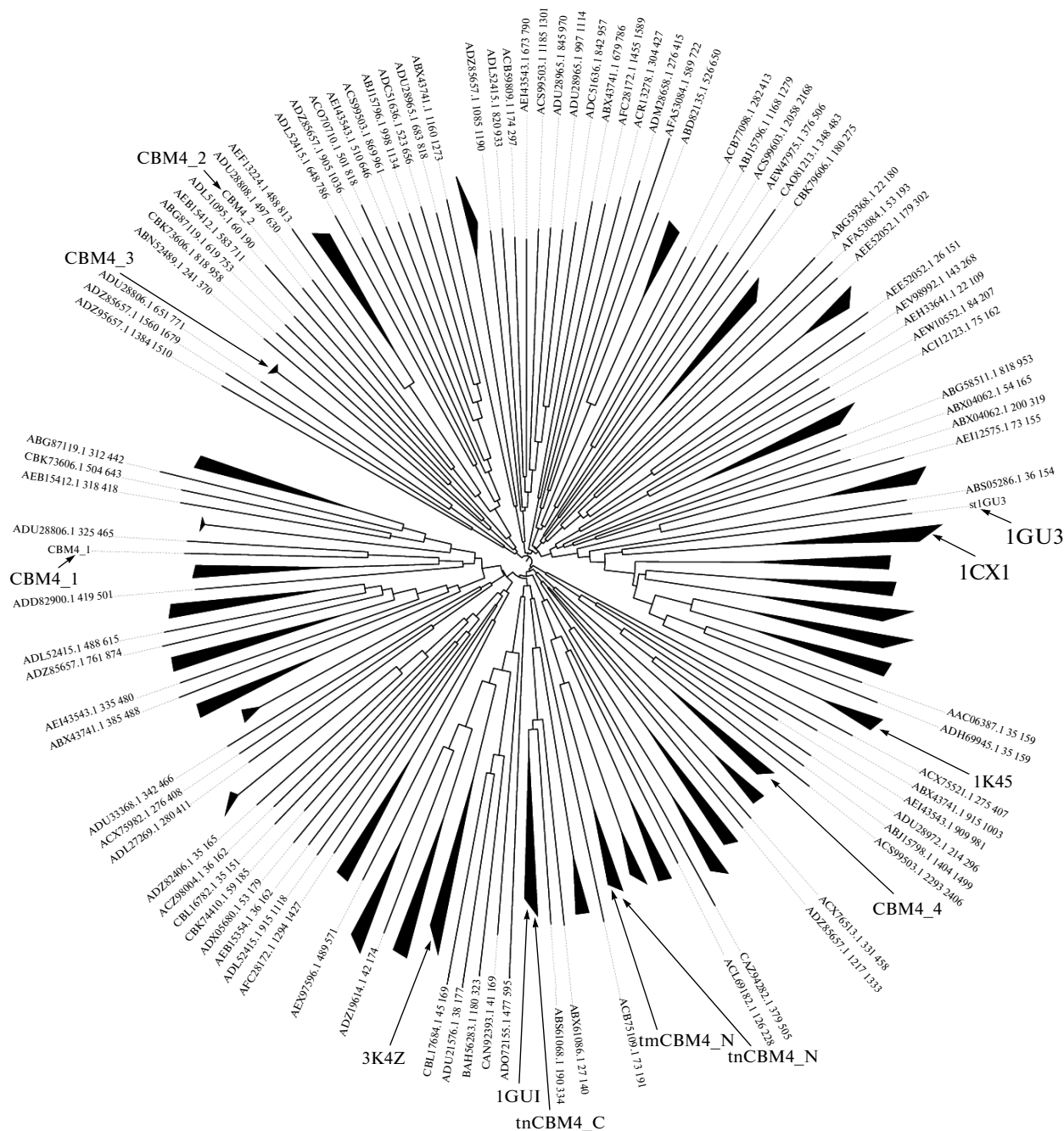


Рис. 3. Дендрограмма CBM 4-ого семейства построена с помощью сервиса iTOL (<http://itol.embl.de>) [20]. Отмечены C-концевые CBM ламинариназы Lic16A – CBM4\_n, модули ламинариназы LamA *Thermotoga neapolitana*, а также модули с известной 3D-структурой и идентификаторами ID из банка белковых структур PDB.

дами [19]. Известно, что в естественных условиях микроорганизм *Clostridium thermocellum* утилизирует полисахариды из остатков клеток растений и лишайников. Лихенан – компонент клеточной стенки водорослей; ламинарин – ее резервный полисахарид; ксилан, пустулан, β-глюкан, хитин – компоненты клеточной стенки растений, грибов и водорослей. Таким образом, наличие синергиз-

ма CBM фермента, вероятно, способствует тесному связыванию с полисахаридами, которые сопутствуют лихенану и ламинарину и обеспечивают их оптимальный гидролиз.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (09-04-00204).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tomme P., Warren R.A.J., Gilkes N.R. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microb. Physiol.* **37**, 1–81.
2. Boraston A.B., Bolam D.N., Gilbert H.J., Davies G.J. 2004. Carbohydrate-binding modules: fine tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J.* **382**, 769–781.
3. Coutinho P. M., Henrissat B. 1999. In: *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*. Eds Gilbert H.J., Davies G.J., Henrissat B., Svensson B. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, pp. 3–12.
4. Linder M., Salovuori I., Ruohonen L., Teeri T.T. 1996. Characterization of a double cellulose-binding domain. Synergistic high affinity binding to crystalline cellulose. *J. Biol. Chem.* **271**, 21268–21272.
5. Bolam D.N., Xie H., White P., Simpson P.J., Hancock S.N., Williamson M.P., Gilbert H.J. 2001. Evidence for synergy between family 2b carbohydrate binding modules in *Cellulomonas fimi* xylanase 11A. *Biochemistry*. **40**, 2468–2477.
6. Чувильская Н.А., Головченко Н.П., Белокопытов Б.Ф., Акименко В.К. 1986. Выделение, идентификация и некоторые физиологические свойства *Clostridium thermocellum*. *Прикл. биохим. микробиол.* **22**, 800–805.
7. Schwarz W.H., Zverlov V.V., Bahl H. 2004. Extracellular glycosyl hydrolases from clostridia. *Adv. Appl. Microbiol.* **56**, 215–261.
8. Belaich J.P., Tardif C., Belaich A., Gaudin C. 1997. The cellulolytic system of *Clostridium cellulolyticum*. *J. Biotechnol.* **57**, 3–14.
9. Zverlov V.V., Kellermann J., Schwarz W.H. 2005. Functional subgenomics of *Clostridium thermocellum* cellulosomal genes: identification of the major catalytic components in the extracellular complex and detection of three new enzymes. *Proteomics*. **5**, 3646–3653.
10. Bayer E.A., Lamed R. 1986. Ultrastructure of the cell surface cellulosome of *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.* **167**, 828–836.
11. Berger E., Zhang D., Zverlov V.V., Schwarz W.H. 2007. Two noncellulosomal cellulases of *Clostridium thermocellum*, Cel9I and Cel48Y, hydrolyse crystalline cellulose synergistically. *FEMS Microbiol. Lett.* **268**, 194–201.
12. Fuchs K.P., Zverlov V.V., Velikodvorskaya G.A., Lottspeich F., Schwarz W.H. 2003. Lic16A of *Clostridium thermocellum*, a non-cellulosomal, highly complex endo-1,3-glucanase bound to the outer cell surface. *Microbiology*. **149**, 1021–1031.
13. Dvortsov I.A., Lunina N.A., Chekanovskaya L.A., Schwarz W.H., Zverlov V.V., Velikodvorskaya G.A. 2009. Carbohydrate-binding properties of a separately folding protein module from  $\beta$ -1,3-glucanase Lic16A of *Clostridium thermocellum*. *Microbiology*. **155**, 2442–2449.
14. Дворцов И.А., Лунина Н.А., Зверлов В.В., Великодворская Г.А. 2010. Субстрат-связывающие свойства модуля СВМ54 ламинариказы Lic16A из *Clostridium thermocellum*. *Молекуляр. биология*. **44**, 671–676.
15. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680–685.
16. Bacon J.S.D., Farmer V.C., Jones D., Taylor I.F. 1969. The glucan components of the cell wall of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) considered in relation to its ultra-structure. *Biochem. J.* **114**, 557–567.
17. Zverlov V., Volkov I., Velikodvorskaya G., Schwarz W. 2001. The binding pattern of two carbohydrate binding modules of laminarinase Lam16A from *Thermotoga neapolitana*: differences in beta-glucan binding within family CBM4. *Microbiology*. **147**, 621–629.
18. Tomme P., Creagh A.L., Kilburn D.G., Hayens C.A. 1996. Interaction of polysaccharides with the N-terminal cellulose-binding domain of *Cellulomonas fimi* CenC. I. Binding specificity and calorimetric analysis. *Biochemistry*. **35**, 13885–13894.
19. Dictionary of carbohydrates. 2006. 2nd edition. Ed. Colins P.M. Boca Raton: CRC Press.
20. Letunic I., Bork P. 2006. Interactive tree of life: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics*. **23**, 127–128.