

© И. В. Леппянен¹,
Т. О. Артамонова²,
С. А. Лопатин³, В. П. Варламов³,
И. А. Тихонович¹, Е. А. Долгих¹

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург;

² Санкт-Петербургский государственный политехнический университет;

³ Центр «Биоинженерия» РАН, Москва

✿ **Хитоолигосахариды находят широкое практическое применение, что определяет интерес к изучению возможности биосинтеза этих соединений. В данной работе осуществлен синтез гекса-N-ацетилхитогексаозы и пента-N-ацетилхитопентаозы в клетках *E. coli* с использованием уникального фермента N-ацетилглюкозаминилтрансферазы клубеньковых бактерий *Rhizobium* sp. GRN2 и *M. loti*. При культивировании бактерий *E. coli*, экспрессирующих рекомбинантные ферменты, в присутствии субстрата N-ацетилглюкозамина, уровень синтеза хитоолигосахаридов достигал нескольких миллиграмм на литр жидкой культуры. Анализ полученных соединений с помощью методов ВЭЖХ и масс-спектрометрии подтвердил их соответствие стандартам.**

✿ **Ключевые слова:** хитоолигосахариды; ферментативный синтез; N-ацетилглюкозаминилтрансфераза.

Поступила в редакцию 03.10.2012
Принята к публикации 06.03.2013

БИОСИНТЕЗ ГЕКСА- И ПЕНТАМЕРНЫХ ХИТООЛИГОСАХАРИДОВ С ПОМОЩЬЮ N-АЦЕТИЛГЛЮКОЗАМИНИЛТРАНСФЕРАЗЫ РИЗОБИАЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

ВВЕДЕНИЕ

Значительный интерес к изучению олигосахаридов (как конъюгированных, так и свободных) связан с их особой ролью в процессах межклеточного взаимодействия, в основе которых лежит узнавание этих соединений поверхностными рецепторами клеток у различных организмов (Gagneux, Varki, 1999). Конъюгированные олигосахариды входят в состав гликопротеинов и гликолипидов, углеводные части которых являются специфическими лигандами для многих рецепторов. Свободные олигосахариды также вовлечены в лиганд-рецепторные взаимодействия, выполняя во многих случаях функцию сигнальных молекул, регулирующих различные биохимические, иммунологические и морфогенетические процессы. Отдельную группу составляют олигосахариды, которые содержат в своем составе аминоксахара D-глюкозамин, D-галактозамин, а также N-ацетил-D-глюкозамин и N-ацетил-D-галактозамин. Эти соединения выполняют ряд важных функций у различных организмов, поэтому им будет уделено основное внимание в данной работе.

У человека и позвоночных животных конъюгированные с гликопротеинами и гликолипидами мембран эритроцитов олигосахариды, состоящие из остатков N-ацетил-D-галактозамина, определяют специфичность групп крови человека (ABO система). Олигосахариды грудного молока, содержащие в своем составе N-ацетил-D-глюкозамин, действуют как ростовые факторы для *Bifidobacterium bifidum* и вместе с тем участвуют в подавлении развития патогенной микрофлоры *Shigella* sp., *Helicobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella* sp. (подавление адгезии бактерий в результате лиганд-рецепторных взаимодействий) (Kunz et al., 2000). Состоящие из остатков аминоксахаров олигосахариды, а также полисахариды (гиалуроновая кислота, хондроитин-сульфаты, дерматансульфаты, гепарин, кератин) входят в состав межклеточного вещества почти всех видов соединительной, костной и хрящевой тканей позвоночных животных и человека, они обнаружены в эпителиальной и нервной тканях. Эти соединения участвуют в регуляции гидродинамики тканей, иммунных реакциях, в ионном обмене, а также процессах миграции и пролиферации клеток, морфогенезе тканей (McAuliffe, Hindsgaul, 2000).

У представителей высших растений семейства бобовых (сем. Leguminosae), олигосахариды, состоящие из трех — шести остатков N-ацетил-D-глюкозамина и декорированные жирной кислотой на невосстанавливаемом конце молекулы (Nod-факторы), выполняют роль сигнальных молекул. Олигосахаридная часть Nod-фактора представляет собой хитоолигосахарид, поскольку содержит в своем составе подобно полимеру хитину только остатки N-ацетил-D-глюкозамина. Синтезируемые симбиотическими бактериями Nod-факторы способны стимулировать развитие специализированных органов — азотфиксирующих корневых клубеньков, действуя в наномолярных концентрациях (Spaink et al., 1991). В результате связывания этих соединений со специфичными рецепторами растений активируется целый комплекс регуляторных белков и гормонов, что приводит к органогенезу клубеньков.

Возможность активации внеклеточными олигосахаридами рецепторов самого растения указывает на наличие у них сходных по структуре эндогенных соединений, влияющих на морфогенез и дифференцировку тканей. Поиск таких олигосахаридов в растении в настоящее время продолжается.

Олигосахариды, состоящие из остатков N-ацетил-D-глюкозамина, играют важную роль в эмбриогенезе позвоночных животных (Semino et al., 1996; Bakkers et al., 1997). В геноме пресноводных рыб *Danio rerio* семейства карповых Cyprinidae, а также в геноме мышей были выявлены близкие гомологи гена *DG42 Xenopus*, контролирующего синтез олигосахаридов, состоящих из остатков N-ацетил-D-глюкозамина (Semino et al., 1996; Kamst et al., 1999). Было показано, что выявленные гены влияли на раннее развитие эмбрионов. Сравнительный анализ показал гомологию между белком DG42 *Xenopus*, белком-ферментом ризобий *NodC* (N-ацетилглюкозаминилтрансферазой, контролирующей синтез хитоолигосахаридных молекул Nod-факторов) (Sargent, Dawid, 1983; Geremia et al., 1994) и ферментом грибов хитинсинтазой (Bulawa, Wasco, 1991). Более того, введение гена ризобий *NodC* в эмбрионы рыб и мышей оказывало значительное влияние на их развитие, что подтвердило предположение об участии хитоолигосахаридов в контроле эмбриогенеза.

У низших растений, грибов и беспозвоночных животных (в основном членистоногих — насекомых и ракообразных) выявлены как олигосахариды, так и полисахариды, состоящие из остатков аминокислот. Полисахариды представлены главным образом такими соединениями как хитин и его деацетилированное производное хитозан, мономерными единицами которых являются N-ацетил-D-глюкозамин и D-глюкозамин, связанные между собой β -1,4-гликозидными связями. Эти соединения выполняют опорные и механические функции в организмах низших растений, грибов и беспозвоночных животных. Под влиянием целого комплекса ферментов полимеры хитин и хитозан могут быть расщеплены до низкомолекулярных производных, включая хитоолигосахариды (олигомеры хитина и хитозана).

Хитоолигосахариды обладают рядом уникальных свойств, оказывая специфичное воздействие на бактерии, высшие растения, человека и позвоночных животных. Известно, что некоторые хитоолигосахариды обладают противовоспалительным, антибактериальным и противоопухолевым действием (Harish Prashanth, Tharanathan, 2005; Xu et al., 2008; Simunek et al., 2010; Venkatesan et al., 2010). Олигомеры хитозана ($n = 10-30$) используются в качестве носителей для транспортировки белков, ДНК и лекарственных соединений через мембрану (Thanou et al., 2002; Koping-Hoggard et al., 2004). Кроме того, хитоолигосахариды способны индуцировать защитные реакции при взаимодействии с растениями (являются сигнальными молекулами — элиситорами)

(Albersheim et al., 1983; Khan et al., 2003), а также обладают ростстимулирующим действием по отношению ко многим растениям. Применение этих соединений и их модифицированных аналогов для развития устойчивости растений к фитопатогенам и стимуляции роста является перспективным направлением в практике защиты растений. При этом хитоолигосахариды не токсичны в высоких концентрациях и легко утилизируются, что делает их применение предпочтительным по сравнению с химическими соединениями. Известно, что элиситорная и ростстимулирующая активность хитоолигосахаридов по отношению к растениям проявляется при степени полимеризации молекул не менее 5–6 остатков N-ацетил-D-глюкозамина.

Необходимость изучения олигосахаридов, состоящих из остатков аминокислот, а также широкие возможности для практического использования этих соединений, определяют необходимость разработки подходов к их получению в достаточно больших количествах. Химический и ферментативный гидролиз полимеров малоэффективен для получения олигосахаридов с необходимой степенью полимеризации и определенными химическими модификациями, так как в результате этого процесса получают смесь соединений, часто с неопределенной структурой, что предполагает дальнейшие очистку и анализ структуры полученных соединений. Химический синтез олигосахаридов является очень сложной задачей, так как в процессе синтеза необходимо проводить стабилизацию и защиту активных групп на всех этапах, что делает синтез соединений со степенью полимеризации больше трех нецелесообразным (Voops, 1996; Кочетков, 2000; Chang et al., 2004). Ряд преимуществ может иметь ферментативный синтез олигосахаридов (Ruffing et al., 2006a, b). В процессе биосинтеза могут быть решены такие проблемы синтеза олигосахаридов как региоспецифичность (формирование олигомеров, состоящих только из одного типа аномеров) и стереоспецифичность (образование только β -1,4-гликозидной связи между мономерами), что позволяет получать соединения со строго определенной структурой. Для биосинтеза преимущественно используют ферменты гликозилтрансферазы, контролирующие образование гликозидной связи в результате трансгликозилирования, при этом донорами гликозильных остатков могут быть нуклеотиды и фосфаты сахаров (Endo, 2000; Perugino et al., 2004; Murata, Usui, 2006). Основные трудности при проведении ферментативного синтеза связаны с выделением ферментов из природных источников. Однако эффективная продукция гликозилтрансфераз в гетерологичных системах (клетках микроорганизмов, животных или растений) может решить проблему биосинтеза олигосахаридов (Ruffing et al., 2006).

Основной целью нашей работы являлась разработка подходов для биосинтетического получения хитоолигосахаридов — соединений, имеющих важное практическое применение в медицине, биотехнологии, сельском хо-

зайстве и других областях. Ранее у широкого круга микроорганизмов (бактерий, грибов) были выявлены ферменты гликозилтрансферазы, способные синтезировать полимер хитин. В частности, охарактеризована и наиболее полно изучена хитинсинтаза дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и некоторых других грибов (*Candida albicans*, *Neurospora crassa* и др.) (Silverman, 1989; Bowen, 1992). Клонирование гена хитинсинтазы и его гетерологичная экспрессия позволили осуществить биосинтез хитина в трансгенных растениях (Dhugga et al., 2000). Другая уникальная гликозилтрансфераза — N-ацетилглюкозаминилтрансфераза, контролирующая синтез хитоолигосахаридных молекул Nod-факторов, была выявлена у бактерий семейства *Rhizobiaceae* (ризобий) (Spaink et al., 1991; Geremia, 1994; Kamst et al., 1995; Mergaert et al., 1995). Фермент способен катализировать синтез хитоолигосахаридов, состоящих из определенного числа остатков N-ацетил-D-глюкозамина ($n = 4-6$), что может быть удобным для получения хитоолигосахаридов с необходимой степенью полимеризации. Как было отмечено ранее, хитоолигосахариды со степенью полимеризации 5 и 6 остатков N-ацетил-D-глюкозамина проявляют элиситорную и ростстимулирующую активность по отношению к растениям. Фермент N-ацетил-глюкозаминилтрансфераза некоторых штаммов *Rhizobium* способен осуществлять синтез гекса- и пентамерных хитоолигосахаридов, что можно использовать для биосинтетических целей. Для синтеза таких соединений мы предложили использовать фермент N-ацетилглюкозаминилтрансферазу двух видов ризобияльных бактерий — *Rhizobium* sp. GRH2 (симбионт акации) и *Mesorhizobium loti*. *Rhizobium* sp. GRH2 является единственным видом ризобий, который способен осуществлять синтез Nod-факторов, состоящих из шести остатков N-ацетилглюкозамина (наряду с пентамерами), а *M. loti* синтезирует только пентамерные молекулы (Lopez-Lara et al., 1993, 1995). Ранее была осуществлена гетерологичная экспрессия фермента N-ацетилглюкозаминилтрансферазы ризобий, синтезирующих преимущественно тетра- и пентамерные молекулы (Kamst et al., 1997; Samain et al., 1997; Bettler et al., 1999; Koizumi, 2003). Такие исследования позволили детально изучить свойства отдельных ферментов и показали, что биосинтез олигосахаридов в *E. coli* может быть эффективным (Samain et al., 1997; Bettler et al., 1999). В нашей экспериментальной работе впервые была предпринята попытка синтезировать гексамерные хитоолигосахариды, поскольку они непосредственно могут быть использованы в качестве эффективных элиситоров и стимуляторов для развития растений. Нами были изучены эффективность использования ферментов двух видов *Rhizobium* и количественный выход синтезируемых олигомеров хитина, состоящих из пяти и шести остатков N-ацетил-D-глюкозамина. Применение рекомбинантных технологий для получения ферментов, обладающих синтетической активностью, позволило решить

задачу синтеза. В процессе контролируемого синтеза хитоолигосахаридов были получены вещества со степенями полимеризации пять и шесть остатков N-ацетилглюкозамина и изучены некоторые свойства этих соединений, сходных по структуре, но отличающихся числом мономерных остатков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ШТАММЫ И ПЛАЗМИДЫ. Для экспериментальной работы были использованы штамм ризобий *M. loti* 1803 (Ведомственная коллекция полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения Россельхозакадемии, WDCM 966, <http://www.ariam.spb.ru/rus/lab10/>), а также *Rhizobium* sp. GRH2, любезно предоставленный профессором Van Brussel (Нидерланды). Для стандартных процедур клонирования был использован штамм *Escherichia coli* DH5 α . Для экспрессии белков использовали мутантный штамм *E. coli* C41 (Miroux, Walker, 1996), полученный на основе штамма BL21 (DE3) (Novagene, США). Для получения генетических конструкций была использована плаزمида pRSET (Invitrogen, США), а также широко используемая для клонирования плазмида pUC19 (Invitrogen, США).

УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММОВ. Штаммы *E. coli* культивировали в жидкой среде LB (Bertani, 1951), содержащей ампициллин (100 мкг/мл) при 37 °C до достижения культурой необходимой плотности. Штаммы ризобий культивировали в жидкой среде TY (5 г/л триптона, 3 г/л дрожжевого экстракта, 0,5 г/л CaCl₂), содержащей необходимый антибиотик, при 28 °C.

ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ И ФЕРМЕНТЫ. Олигонуклеотиды были синтезированы компанией «Евроген» (Москва). Были использованы эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигаза фага T4, HF Phusion-полимераза производства компании Thermo Scientific (США).

ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ. Для клонирования гена *NodC* штамма *Rhizobium* sp. GRH2 (*RhGRH2NodC*), последовательность которого была неизвестна, был проведен сравнительный анализ последовательностей генов *NodC* близких видов ризобий и подобраны вырожденные праймеры (вариабельные позиции выделены) для амплификации фрагмента гена:

1. *RhGRH2NodC* F1: 5'-AYGTHGTYGAYGACGGTTC-3'
2. *RhGRH2NodC* R1: 5'-CGYGACARCCARTCGCTRTTG-3'

На следующем этапе для амплификации 5'-и 3'-концевых участков гена *NodC* штамма *Rhizobium* sp. GRH2 был использован адаптор Vectorsite (Thermo Scientific, США) и следующий набор полностью комплементарных (специфичных) праймеров:

3. C20 — универсальный праймер к адаптору: 5'-CTCTCCSTTCTCGAATCGTAA-3'
4. *RhGRH2NodC* F2: 5'-CCGTGCTTTCCTGTGCCAG-3'
5. *RhGRH2NodC* R2: 5'-TCCTTCATCCGCTGTCTCGTT-3'

После определения последовательности полноразмерного гена *NodC* штамма *Rhizobium* sp. GRH2, была проведена его амплификация методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью специфических праймеров, содержащих сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции *BamHI* и *EcoRI*:

6. *RhGRH2NodC* F0:

5'-GGGGATCCGATGGACCTGCTCAACACAATCG-3'

7. *RhGRH2NodC* R0:

5'-GGGAATTCCTCAGTCGTCGCTGTAGACACCG-3'

Последовательность полноразмерного гена *NodC* штамма *M. loti* 1803 (*MlNodC*) амплифицировали методом ПЦР с использованием вырожденных праймеров (вариабельные позиции выделены), в состав которых вводили сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции *BamHI* и *EcoRI* (отмечены подчеркиванием). Праймеры были подобраны на основании сравнительного анализа известных последовательностей генов *NodC* двух штаммов *M. loti* MAFF303099 (NCBI BA000012) и *M. loti* NZP2037 (NCBI X52958).

8. *MlNodC* прямой: 5'-GGGGATCCGATGAACCTRTTTGCCWCAGCCAGTAC-3'

9. *MlNodC* обратный: 5'-GGGAATTCCTATTGCTGTTCTGTAAAGRMGC-3'

Амплификацию генов проводили методом ПЦР на матрице ДНК, выделенной из *Rhizobium* sp. GRH2 и *M. loti* 1803, по следующей программе в процессе 30 циклов: 94 °C — 30 с, 55 °C (для полноразмерного гена *RhGRH2NodC*) или 51 °C (для полноразмерного гена *MlNodC*) — 30 с, 72 °C — 30 с. Полученный продукт выделяли из геля с помощью набора для выделения фрагментов ДНК компании Qiagen (США) по методике, предложенной производителем. Выделенные фрагменты клонировали в векторах pRSETb и pUC19 с сохранением рамки считывания с помощью T4 ДНК-лигазы в течение ночи при 4 °C. Полученной после лигирования реакционной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* DH5α по методике, предложенной Inoue и соавт. (Inoue et al., 1990). Отбор трансформантов производили на среде LB, содержащей индуктор изопропил-1-тио-β-D-галактопиранозид (ИПТГ) и субстрат β-галактозидазы (X-Gal).

ВЫДЕЛЕНИЕ СУММАРНОЙ ДНК БАКТЕРИЙ. Для выделения суммарной ДНК ризобий использовали 1,5 мл ночной культуры. Клетки ризобий центрифугировали при 14000 об/мин (центрифуга MiniSpin Eppendorf, Германия) в течение 2 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а клетки ресуспендировали в 500 мкл буфера TE (10 mM трис-HCl pH 8,0, 5 mM этилендиаминтетраацетат (ЭДТА)). К суспензии добавляли 1 мкл раствора лизоцима (1 мг/мл) и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляли ДСН до конечной концентрации 0,5 % и протеиназу К (Thermo Scientific, США) до концентрации 0,05 мг/мл и инкубировали при 37 °C в течение 1 ч. Для уменьшения вязкости образовавшийся прозрачный лизат замораживали при -20 °C, затем давали оттаять при комнатной температуре.

Дважды экстрагировали смесь фенол: хлороформ (1:1). ДНК осаждали двумя объемами этанола 5 мин при комнатной температуре. Раствор центрифугировали 2 мин при 14000 об/мин, удаляли надосадочную жидкость, осадок промывали 70 % этанолом, подсушивали и растворяли в 50–100 мкл деионизованной воды. Концентрация ДНК после выделения составляла в среднем около 0,5–1 мкг/мл.

ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК. Плазмидную ДНК выделяли из 3 мл ночной культуры клеток *E. coli* методом щелочного лизиса (Lee, Rasheed, 1990). Выделенные плазмиды вводили в клетки DH5α или C41 методом химической трансформации (Inoue et al., 1990).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ NODC ДВУХ ШТАММОВ РИЗОБИЙ. Соответствие клонированных последовательностей генам *NodC*, а также сохранность рамки считывания подтверждали путем определения нуклеотидной последовательности. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием набора GenomeLab DTCS Quick Start kit (Beckman Coulter, США). Реакцию проводили в объеме 10 мкл, содержащем 200–300 нг плазмидной ДНК, 3,2 пМ специфического праймера и реакционную смесь, предоставленную компанией-производителем. Продукты реакции анализировали с использованием автоматического секвенатора CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, США).

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЭКСТРАКТОВ КЛЕТОК И ПОЛУЧЕНИЕ СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ. Инкубированные в присутствии 0,5 mM ИПТГ ночные культуры клеток *E. coli* DH5α или C41, несущие необходимые генетические конструкции, охлаждали в течение 20 мин на льду, затем осаждали центрифугированием при 3000 об/мин (Mikro 22R Hettich, Германия) в течение 20 мин при 4 °C. Осадки клеток ресуспендировали в 1 × буфере PBS, pH 8,0, содержащем 0,1 mM фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ). Затем проводили трехкратную обработку ультразвуком по 30 с с интервалами по 20 с (клетки в перерывах между обработкой ультразвуком выдерживали на льду). Центрифугировали полученную после обработки ультразвуком суспензию при 4000 об/мин 20 мин (при такой скорости обычно оседают особые белковые образования — тельца включения (от англ. inclusion bodies)). Далее для получения других субклеточных фракций супернатант центрифугировали при 16000 об/мин (Mikro 22R Hettich, Германия). Для выделения микросомальной фракции супернатант центрифугировали при 45000 об/мин (100000g, TL-100, Beckman, США). Полученные в результате центрифугирования различные субклеточные фракции ресуспендировали в буфере для нанесения на гель и анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии 0,1 % ДСН.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ В ПААГ И ВЕСТЕРН-БЛОТ ГИБРИДИЗАЦИЯ. Белковые пробы, уравновешенные по содержанию белка, были разделены

в 12–15 % ПААГ с 0,1 % ДСН в электрофорезной системе Mini Protein 3 Cell компании BioRad Laboratories (США). После разделения белков в геле, проводили их окрашивание Кумасси бриллиантовым синим G-250. При Вестерн-блот гибридизации белки после разделения в ПААГ переносили на нитроцеллюлозную мембрану (0,45 мкм). Для проверки полноты переноса белков проводили окрашивание мембран Понсо 4R. Далее проводили гибридизацию с антителами против полигистидиновой (poly-His) последовательности.

СИНТЕЗ ХИТООЛИГОСАХАРИДОВ *IN VIVO*. Для стандартной процедуры синтеза хитоолигосахаридов в бактериях *E. coli* 100 мл среды LB, содержащей ампициллин (100 мг/л), инокулировали 1 мл ночной культуры бактерий *E. coli*, несущих необходимую генетическую конструкцию. Растили бактерии при температуре 37 °С до достижения культурой оптической плотности $A_{600} = 0,6$, затем индуцировали экспрессии белка при добавлении к среде 0,5 мМ ИПТГ. После культивирования в течение трех часов в присутствии ИПТГ при температуре 37 °С, добавляли в среду в качестве источника углерода глицерол до конечной концентрации 4 г/л, а также субстрат для синтеза хитоолигосахаридов — N-ацетилглюкозамин в концентрации 0,1 г/л (Samain et al., 1997). Синтез проводили в течение 24–48 часов при температуре 35 °С.

ВЫДЕЛЕНИЕ ХИТООЛИГОСАХАРИДОВ. После завершения процедуры синтеза хитоолигосахаридов клетки *E. coli* осаждали при 3000 об/мин (центрифуга Beckman J2–21, США) в течение 20 минут при температуре 4 °С, ресуспендировали осадок клеток в 2 мл воды и кипятили суспензию в течение 30 минут. Водную фазу, содержащую хитоолигосахариды, адсорбировали на активированном угле (Fluka, Германия) в течение 10 минут. Смыв хитоолигосахаридов с угля проводили 50 % этиловым спиртом. После выпаривания этанола осадок, содержащий хитоолигосахариды, ресуспендировали в необходимом объеме воды и использовали для анализа методом ВЭЖХ.

РАЗДЕЛЕНИЕ ХИТООЛИГОСАХАРИДОВ МЕТОДОМ ВЭЖХ. Разделение хитоолигосахаридов проводили методом ВЭЖХ на колонке с аминофазой SUPELCOSIL LC-NH2 (Sigma, США) в системе ацетонитрил : вода (70:30 %). Разделение проводили при скорости элюции 1 мл/мин. Идентификацию полученных соединений проводили посредством сравнения времени выхода пика анализируемого вещества со временем выхода с колонки пиков, соответствующих стандартам — пента-N-ацетилхитопентаозы и гекса-N-ацетилхитогексаозы (Medacshop, Германия).

АНАЛИЗ СИНТЕЗИРОВАННЫХ ХИТООЛИГОСАХАРИДОВ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ. Масс-спектрометрический анализ проб проводили на ионно-циклотронном масс-спектрометре Varian 902-MS MALDI Mass Spectrometer (ICR FTMS)

со сверхпроводящим магнитом 9.4 Тесла. Десорбцию и ионизацию пробы осуществляли с помощью третьей гармоники Nd: YAG лазера (355 нм). Образцы растворяли в 2 мкл 0,1 % водного раствора трифторуксусной кислоты (ТФУ), 0,5 мкл раствора образца смешивали на мишени с равным объемом раствора матрицы 2,5-дигидрокси-бензойной кислоты (ДГБК, 20 мг/мл в растворе ацетонитрил: 0,1 % ТФУ в воде (30:70 %)) и сушили на воздухе. Далее образцы облучали сериями лазерных импульсов (по 5 импульсов в серии). Определение молекулярной массы пробы производили методом внешней калибровки с использованием стандартных образцов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1.1. КЛОНИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА *NODC RHIZOBIUM SP. GRH2*

Ризобии *Rhizobium sp. GRH2* способны выделять Nod-факторы, состоящие из шести и пяти остатков N-ацетилглюкозамина (Lopez-Lara et al., 2005). Фермент N-ацетилглюкозаминилтрансфераза, кодируемый геном *NodC*, контролирует первый этап в процессе биосинтеза Nod-факторов — синтез хитоолигосахаридов, которые составляют олигосахаридную основу этих сигнальных молекул. Следовательно, фермент *Rhizobium sp. GRH2* должен обладать уникальной способностью синтезировать два вида хитоолигосахаридов — гекса-N-ацетилхитогексаозу и пента-N-ацетилхитопентаозу. Так как нуклеотидная последовательность гена *NodC Rhizobium sp. GRH2* была неизвестна, на первом этапе исследований перед нами стояла задача клонировать ген *NodC* данного вида бактерий. С этой целью на основании сравнительного анализа последовательностей генов *NodC* нескольких видов ризобий были подобраны вырожденные праймеры к наиболее консервативным участкам гена. При проведении ПЦР с вырожденными праймерами на матрице ДНК ризобий *Rhizobium sp. GRH2* был амплифицирован фрагмент гена *NodC*, соответствующий примерно 1000 п.о. (рис. 1 а). Нами была определена нуклеотидная последовательность этого фрагмента и подобраны полностью комплементарные специфичные праймеры для амплификации 5'- и 3'-концов гена *NodC* с помощью ПЦР, основанного на использовании адапторов Vectors (рис. 1 б). Адапторы Vectors позволяют амплифицировать неизвестные концевые участки генов с помощью только одного специфичного праймера, поскольку второй праймер является комплементарным адаптору. При использовании адапторов нам удалось определить последовательность концевых участков гена *NodC* штамма *Rhizobium sp. GRH2*. На следующем этапе нами были использованы специфичные праймеры, фланкирующие последовательность гена *NodC*, для амплификации полноразмерного гена (рис. 1 в). Длина полной последовательности гена *NodC* штамма *Rhizobium sp. GRH2* составила 1332 п.о. Сравнительный анализ пос-

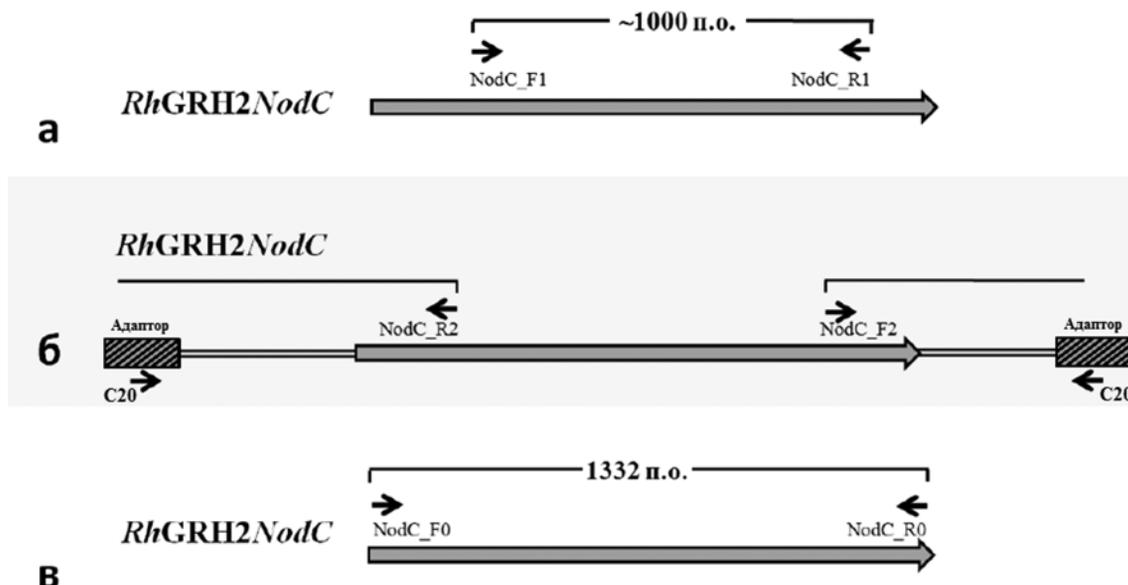


Рис. 1. Схема амплификации гена *NodC Rhizobium sp. GRH2*. а — амплификация фрагмента гена *NodC*, соответствующего примерно 1000 п. о.; б — амплификация 5'- и 39 рт-концов гена *NodC* с помощью адапторов Vectorette (при амплификации использован праймер C20 к адаптору); в — амплификация полноразмерного гена *NodC Rhizobium sp. GRH2*

ледовательности выявленного гена с известными ранее последовательностями генов *NodC* других штаммов ризобий показал наиболее высокий процент сходства с геном *NodC Sinorhizobium meliloti* GVPV12 (76 % сходства), *Sinorhizobium sp. BR816* (75,6 %), *Rhizobium sp. N33* (74 %), *M. loti* MAFF303099 (70 %) (рис. 2). Таким образом, в результате проделанной работы нам удалось впервые клонировать ранее неизвестный уникальный ген ризобий *Rhizobium sp. GRH2*.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА *NODC* ШТАММА РИЗОБИЙ *M. LOTI* 1803

В базе данных NCBI представлены полноразмерные последовательности генов *NodC* двух штаммов *M. loti* — MAFF303099 и NZP2037. Для работы нами был использован штамм *M. loti* 1803, последовательность гена *NodC* которого ранее была не известна. На основании сравнительного анализа двух последовательностей гена *NodC M. loti* MAFF303099 и *M. loti* NZP2037 были подобраны вырожденные праймеры для амплификации полноразмерного гена *NodC* штамма *M. loti* 1803. С использованием этих праймеров на матрице ДНК штамма *M. loti* 1803 был амплифицирован продукт размером 1275 п. о. и определена его нуклеотидная последовательность. При анализе наиболее высокий процент сходства (99 %) был выявлен между геном *NodC* штамма *M. loti* 1803 и *M. loti* MAFF303099 (данные не представлены).

1.3. ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ В ВЕКТОРАХ pRSETb И pUC19, СОДЕРЖАЩИХ ПОЛНОРАЗМЕРНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНОВ *NODC* ДВУХ ВИДОВ РИЗОБИЙ

Для экспрессии фермента N-ацетилглюкозаминилтрансферазы двух видов ризобий *Rhizobium sp.*

GRH2 и *M. loti* 1803 в клетках *E. coli* нами были получены генетические конструкции в векторах pRSETb и pUC19 (Invitrogen, США) (рис. 3). Амплифицированные с помощью специфичных праймеров, содержащих сайты узнавания для рестриктаз *Bam*HI и *Eco*R1, полноразмерные гены *NodC M. loti* 1803 (размером 1275 п. о.) и *Rhizobium sp. GRH2* (размером 1332 п. о.) были встроены в векторы pRSETb и pUC19 по соответствующим сайтам с сохранением рамки считывания. В векторе pUC19 ген *NodC* находится под контролем промотора β-галактозидазы (промотор гена *lacZ*), в то время как в векторе pRSET используется промотор для РНК-полимеразы бактериофага T7, определяющий более высокий уровень экспрессии генов. В последовательности вектора pRSET также находится полигиститидиновая (*poly-His*) последовательность (рис. 3), которая позволяет выявлять рекомбинантный белок с помощью анти-His антител и проводить очистку белка методом металл-хелатной аффинной хроматографии. Таким образом, нами были получены конструкции в двух типах векторов, определяющих разный уровень экспрессии клонированных генов. Полученные конструкции pRSETb-*RhGRH2NodC*, pRSETb-*MlNodC*, а также pUC19-*RhGRH2NodC*, pUC19-*MlNodC* были использованы для трансформации штаммов *E. coli* C41 и DH5α.

1.4. ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ФЕРМЕНТА N-АЦЕТИЛГЛЮКОЗАМИНИЛТРАНСФЕРАЗЫ (NODC) ДВУХ ВИДОВ РИЗОБИЙ В КЛЕТКАХ *E. COLI*

Для гетерологичной экспрессии фермента ризобий N-ацетилглюкозаминил-трансферазы (*NodC*) нами были использованы два типа клеток *E. coli* — DH5α и C41. Штамм DH5α является универсальным штаммом, под-

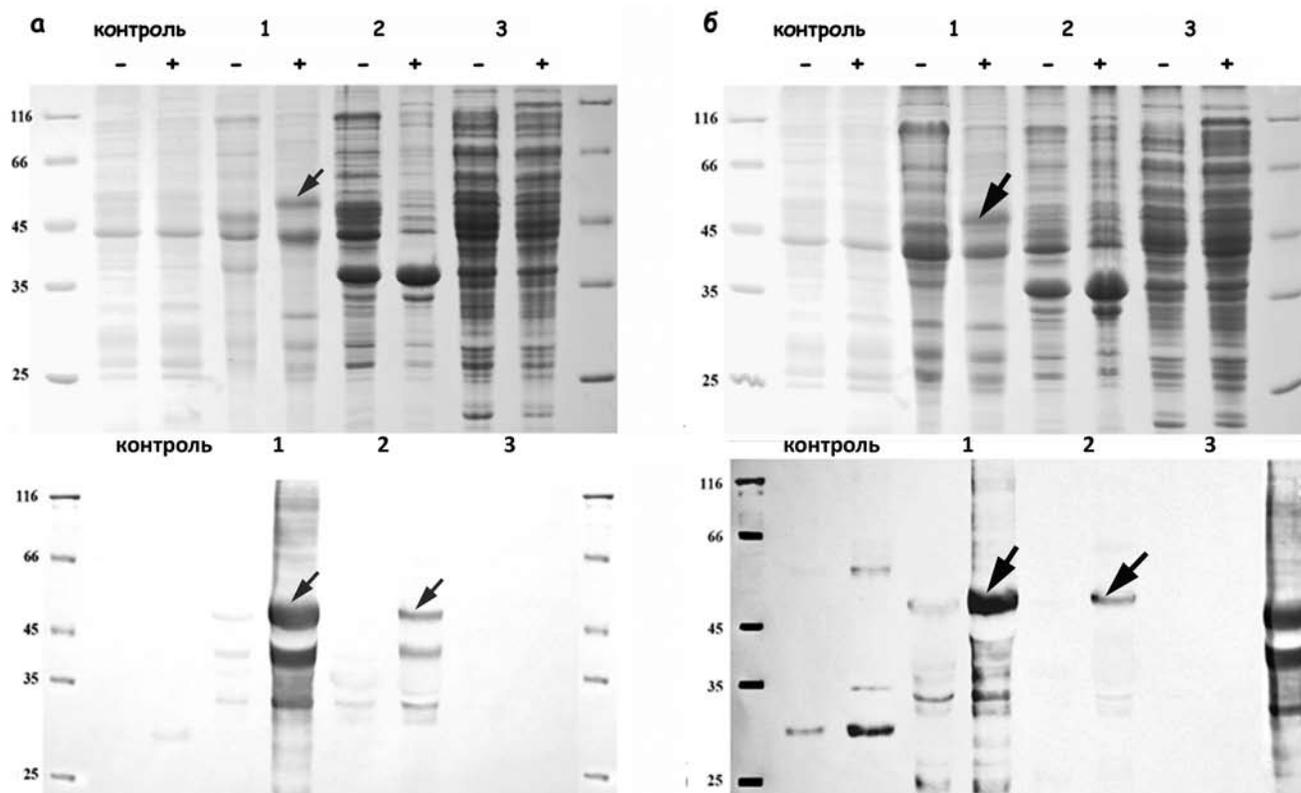


Рис. 4. Экспрессия рекомбинантных белков NodC *Rhizobium* sp. GRH2 (I) и *M. loti* (II) в клетках *E. coli* C41, трансформированных генетическими конструкциями pRSETb-*RhGRH2NodC* и pRSETb-*MlNodC*. Бактерии *E. coli* культивировали в течение 24 часов в присутствии или отсутствии ИПТГ. Белки, экстрагированные из различных субклеточных фракций клеток *E. coli*, были разделены методом ДСН-электрофореза в ПААГ и окрашены красителем Кумасси бриллиантовым синим (а и в) или перенесены на нитроцеллюлозу и гибридизованы с анти-His антителами (б и г). контроль — нерастворимая фракция клеток, трансформированных вектором pRSETb без вставки, которая была получена при 16000 об/мин; 1 — нерастворимая фракция, полученная при осаждении при 4000 об/мин; 2 — нерастворимая фракция, полученная при осаждении при 16000 об/мин; 3 — растворимая фракция, полученная при 16000 об/мин. «-» — экспрессия белка в отсутствии ИПТГ; «+» — экспрессия белка в присутствии ИПТГ

культивирования (рис. 5 а). При температуре культивирования 37 °С весь белок накапливается в виде белковых образований телец включения, независимо от времени культивирования. Однако при 28 °С часть белка остается в связанном с мембранами состоянии (рис. 5 б).

Уровень экспрессии рекомбинантных белков в клетках *E. coli* DH5α был также оценен при использовании генетических конструкций pUC19-MlNodC и pUC19-*RhGRH2NodC*, полученных в другом типе вектора (рис. 6 а, б). Так как в составе экспрессируемых рекомбинантных белков, полученных при этом, отсутствовала poly-His последовательность, мы проводили сравнение с белками, полученными с помощью конструкций в pRSETb. Было показано, что уровень синтеза рекомбинантного белка при использовании конструкций в векторе pUC19 был ниже по сравнению с тем, который наблюдался при экспрессии белка с помощью вектора pRSETb. Однако при этом белок не образовывал нерастворимых образований телец включения и был сосредоточен главным образом в мембранной фракции, полу-

ченной при 16000 об/мин. Кроме того, было показано, что конструкции в векторе pUC19 не являются строго ИПТГ-индуцибельными.

Таким образом, в результате проведенных исследований мы оценили уровень экспрессии белка-фермента N-ацетилглюкозаминилтрансферазы двух видов ризобий *M. loti* 1803 и *Rhizobium* sp. GRH2 в клетках *E. coli* с помощью созданных нами генетических конструкций, полученных на основе векторов pRSETb и pUC19. Это позволило нам приступить к биосинтезу хитоолигосахаридов в бактериях.

1.6. СИНТЕЗ ХИТООЛИГОСАХАРИДОВ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ *E. COLI*

Для оценки ферментативной активности экспрессируемых в бактериях *E. coli* белков была изучена их способность синтезировать хитоолигосахариды. Для синтеза хитоолигосахаридов штаммы *E. coli*, несущие конструкции с клонированным полноразмерным геном *NodC* двух видов ризобий, инкубировали в среде с субстратом N-ацетилглюкозамин. Известно, что в бактериях

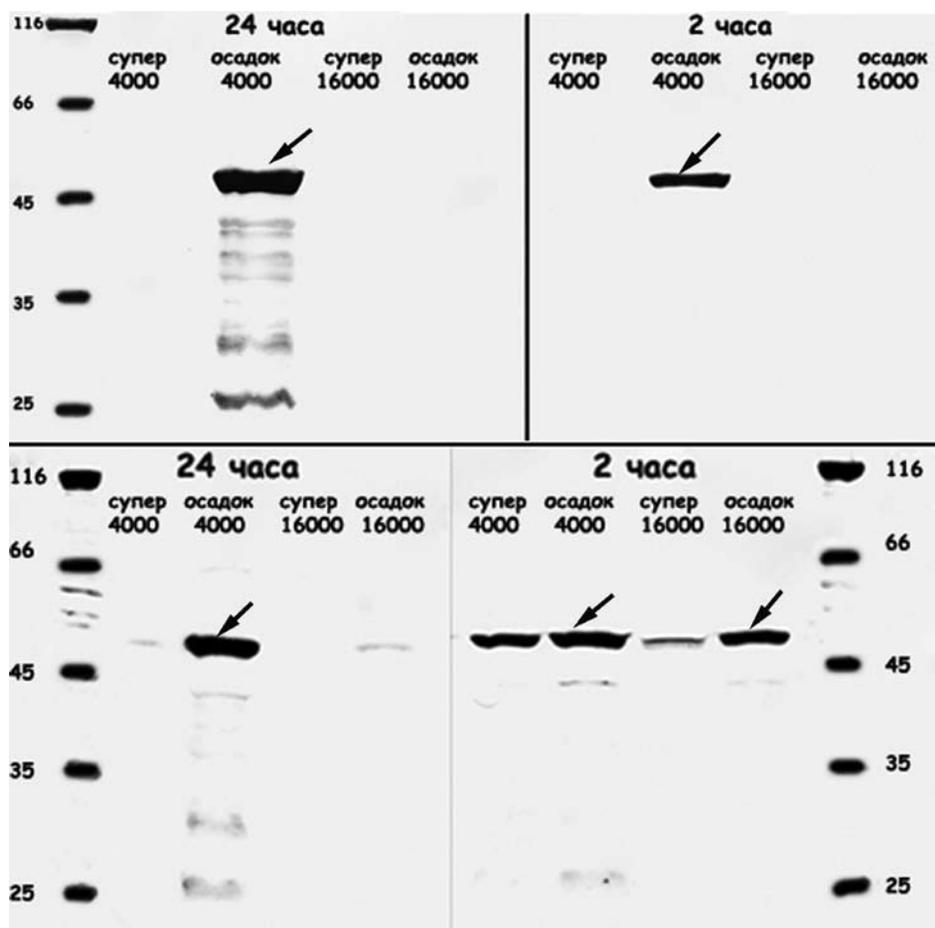


Рис. 5. Анализ уровня экспрессии белка NodC *M. loti* 1803 в клетках бактерий *E. coli* C41 при температуре 37 °С (а) и 28 °С (б). Сн — супернатант (надосадочная жидкость)

присутствует фермент, катализирующий превращение N-ацетил-D-глюкозамина в УДФ-N-ацетилглюкозамин, который необходим бактериям для синтеза муреина клеточной стенки. Так как УДФ-N-ацетил-D-глюкозамин является также субстратом для синтеза хитоолигосахаридов, то удобство получения этих соединений в бактериях заключается в возможности использовать другой более дешевый субстрат N-ацетилглюкозамин вместо УДФ-N-ацетилглюкозамина (Samain et al., 1997).

После завершения синтеза экстрагировали хитоолигосахариды из клеток *E. coli* и проводили их предварительную очистку. Синтезированные соединения разделяли методом ВЭЖХ. О синтезе хитоолигосахаридов судили по появлению на хроматограммах соединений, время выхода которых соответствовало стандартам — гекса-N-ацетилхитогексаозе и пента-N-ацетилхитопентаозе. Мы показали, что уровень синтеза хитоолигосахаридов отличается при использовании разных штаммов. При культивировании бактерий *E. coli* DH5α, несущих плазмиду pUC19-*RhGRH2NodC* со встроенным геном *NodC Rhizobium* sp. GRH2, в присутствии предшественника N-ацетилглюкозамина были синтезированы гекса-N-ацетилхитогексаоза и пента-N-ацетилхитопентаоза (рис. 7).

После культивирования в течение 24 ч основным синтезируемым продуктом была пентаоза (рис. 7 а), а после 48 ч — гексаоза (рис. 7 б). Количество синтезируемых хитоолигосахаридов составляло до 20–50 миллиграмм на литр бактериальной культуры. При культивировании бактерий *E. coli* DH5α, несущих плазмиду pUC19-*MI*NodC со встроенным геном *NodC M. loti* 1803, в присутствии предшественника N-ацетилглюкозамина была синтезирована пента-N-ацетилхитопентаоза (рис. 8 в), количество которой в среднем составляло около 100–200 миллиграмм на литр бактериальной культуры. Таким образом, мы показали, что рекомбинантные ферменты обладают всеми свойствами нативных ферментов и могут быть использованы для синтеза двух типов хитоолигосахаридов — гекса-N-ацетилхитогексаозы и пента-N-ацетилхитопентаозы. Синтез хитоолигосахаридов происходил внутри клеток культивируемых бактерий, без выделения в среду.

Напротив, при использовании культуры клеток *E. coli* C41, содержащих плазмиду pRSETb-*RhGRH2NodC* или pRSETb-*MI*NodC, нам не удалось выявить сколько-нибудь значительного синтеза хитоолигосахаридов (рис. 7 г). Мы полагаем, что возможная причина этого заключается в формировании белком телец включения. Рекомбинант-

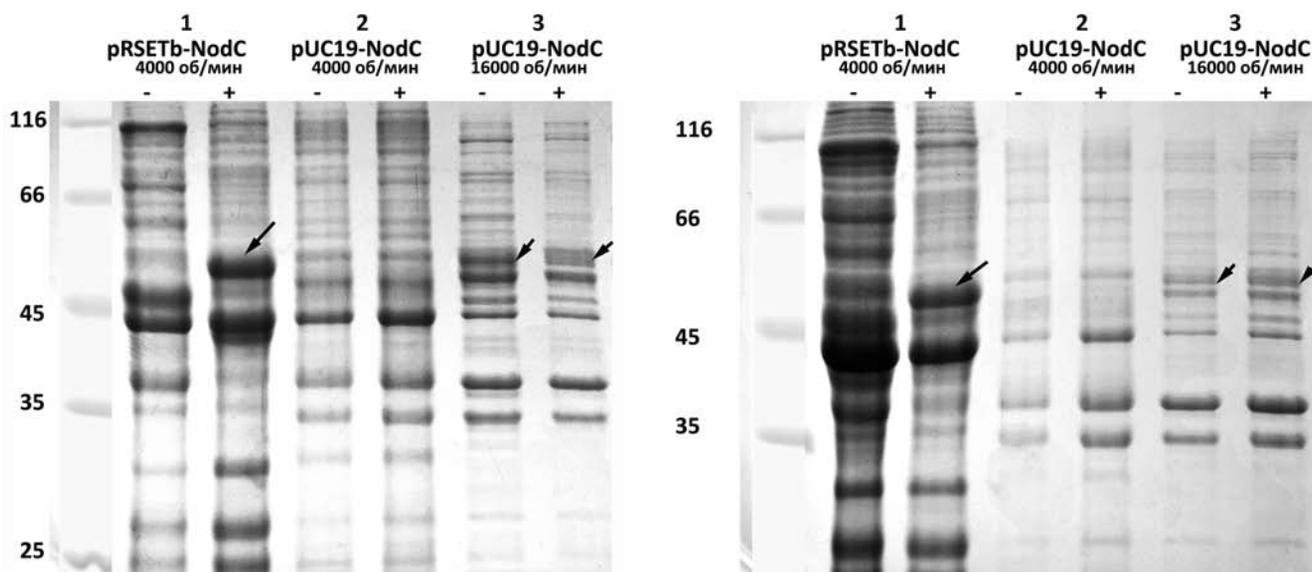


Рис. 6. Экспрессия рекомбинантного белка NodC *Rhizobium* sp. GRH2 (а) и *M. loti* (б) в клетках *E. coli* DH5α, трансформированных генетическими конструкциями pUC19-RhGRH2NodC и pUC19-MINodC. Бактерии *E. coli* культивировали в течение 24 часов в присутствии или отсутствии ИПТГ. Белки, экстрагированные из различных субклеточных фракций клеток *E. coli*, были разделены методом ДСН-электрофореза и окрашены красителем Кумасси бриллиантовым синим. Обозначения: 1 — нерастворимая фракция, выделенная из клеток *E. coli* C41 при экспрессии в них конструкции pRSETb-RhGRH2NodC и полученная при осаждении при 4000 об/мин; 2 — нерастворимая фракция, выделенная из клеток *E. coli* DH5α при экспрессии в них конструкции pUC19-RhGRH2NodC и полученная при осаждении при 4000 об/мин; 3 — нерастворимая фракция, выделенная из клеток *E. coli* DH5α при экспрессии в них конструкции pUC19-RhGRH2NodC и полученная при осаждении при 16000 об/мин; «-» — экспрессия белка в отсутствии ИПТГ; «+» — экспрессия белка в присутствии ИПТГ. Аналогичные обозначения представлены на рисунке б для конструкций, содержащих ген *MINodC*

ный белок синтезируется на высоком уровне при использовании конструкций в векторе pRSETb, но ферментативной активности он не проявляет из-за того, что формирует нерастворимые скопления и, следовательно, является неактивным. Таким образом, использование разных векторов для создания конструкций оказалось оправданным, поскольку уровень активности рекомбинантных белков при экспрессии в *E. coli* может быть разным.

1.7. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ХИТООЛИГОСАХАРИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ БИОСИНТЕТИЧЕСКИМ СПОСОБОМ

Для подтверждения того, что синтезированные в клетках *E. coli* соединения являются гекса-N-ацетилхитогексаозой и пента-N-ацетилхитопентаозой, нами был использован метод масс-спектрометрии. Проведенный анализ соединений, собранных после разделения на колонке и соответствующих времени выхода стандартов, показал присутствие на спектрограммах мажорных пиков с соотношением массы к заряду (m/z) равным 1259,5 для пробы, содержащей гекса-N-ацетилхитогексаозу (рис. 8 а), и 1056,7 для пробы, содержащей пента-N-ацетилхитопентаозу (рис. 8 б).

Молекулярная масса пента-N-ацетилхитопентаозы составляет 1033, а гекса-N-ацетилхитогексаозы — 1236. Однако в процессе масс-спектрометрического анализа, как правило, к исследуемому веществу присоединяется

катион — ион Na^+ (молекулярная масса равна 23) или протон H^+ (молекулярная масса равна 1). Следовательно, полученные массы веществ соответствуют катионам $[\text{mw} + \text{Na}]^+$: $1033 + 23 = 1056$ — для пента-N-ацетилхитопентаозы и $1236 + 23 = 1259$ — для гекса-N-ацетилхитогексаозы. Проведенный анализ подтвердил, что синтезированные вещества являются пента-N-ацетилхитопентаозой и гекса-N-ацетилхитогексаозой.

Таким образом, в результате выполненных нами исследований была изучена возможность ферментативного синтеза двух типов хитоолигосахаридов — гекса-N-ацетилхитогексаозы и пента-N-ацетилхитопентаозы — с помощью фермента N-ацетилглюкозаминилтрансферазы клубеньковых бактерий *Rhizobium* sp. GRH2 и *M. loti*. Были получены штаммы *E. coli*, содержащие генетические конструкции с клонированными генами *RhGRH2NodC* и *MINodC*, кодирующими фермент N-ацетилглюкозаминилтрансферазу двух видов ризобий. При культивировании полученных штаммов в присутствии субстрата N-ацетилглюкозамина были синтезированы олигомеры хитина со степенью полимеризации шесть и пять остатков N-ацетилглюкозамина (гекса-N-ацетилхитогексаоза и пента-N-ацетилхитопентаоза), структура которых была подтверждена методом масс-спектрометрии. Количественный выход составил — 20–50 мг гекса-N-ацетилхитогексаозы и пента-N-ацетилхитопентаозы на 1 литр

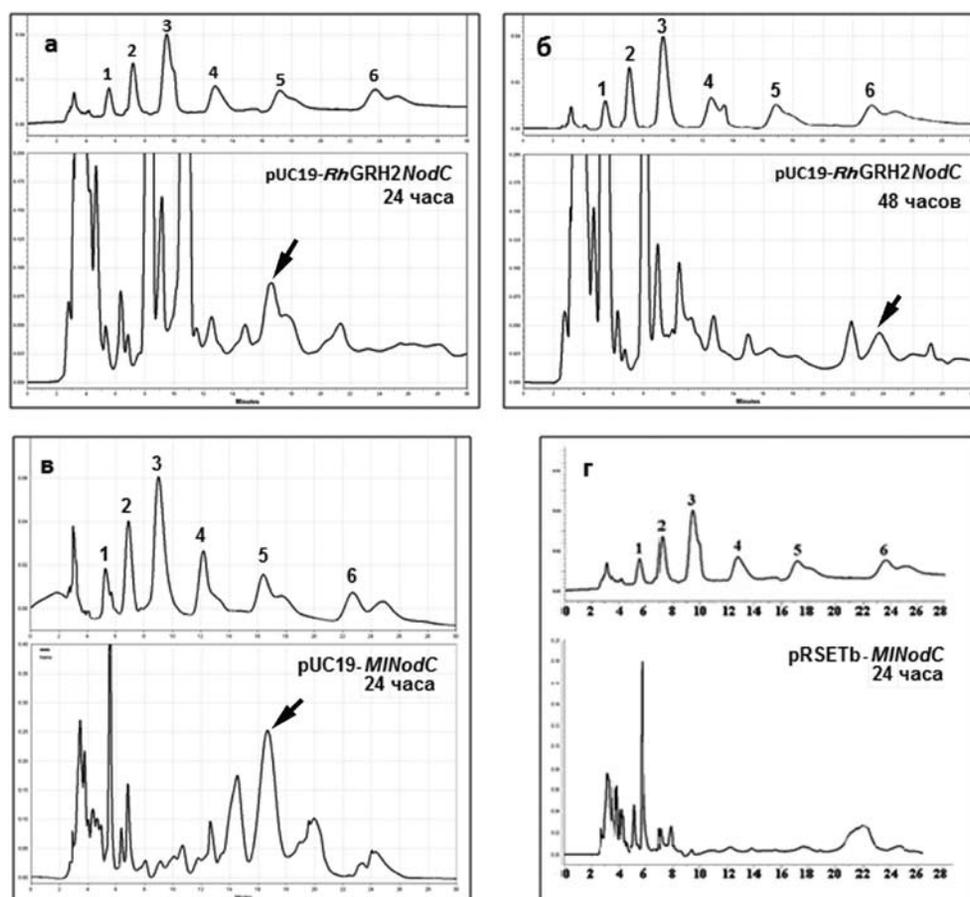


Рис. 7. Хроматограммы разделения хитоолигосахаридов, полученных при синтезе в культуре клеток штаммов *E. coli* DH5α (а, б, в) и С41 (г). а — разделение продуктов реакции, полученных с помощью фермента N-ацетилглюкозаминилтрансферазы *Rhizobium* sp. GRH2 после культивирования в течение 24 часов; б — культивирование в течение 48 часов; в — разделение продуктов реакции, полученных с помощью фермента N-ацетилглюкозаминилтрансферазы *M. loti* 1803 после культивирования в течение 24 часов. Стрелками указаны пики, соответствующие пента-N-ацетилхитопентаозе и гекса-N-ацетилхитогексаозе. 1–6 — обозначения стандартов олигомеров (n = 1–6)

бактериальной культуры штамма *E. coli*, содержащего конструкцию pUC19-*RhGRH2NodC*, и 100–200 мг пента-N-ацетилхитопентаозы — при использовании штамма *E. coli* с конструкцией pUC19-*MI*NodC. Масс-спектрометрический анализ подтвердил, что синтезированные соединения являются хитоолигосахаридами со степенью полимеризации пять и шесть остатков N-ацетилглюкозамина.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России ГК, № 16.512.11.2183 и соглашение № 8056 (выполнение исследований в рамках НОЦ), РФФИ 12-08-01044-а, Совета по грантам Президента РФ, № 16.120.11.337-НШ, с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр нано- и биотехнологий ГОУ СПбГПУ» на базе ФГБОУ ВПО «СПбГПУ».

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочетков Н.К., 2000. Твердофазный синтез олигосахаридов и гликоконъюгатов // *Успехи химии*. Т. 69, № 9. С. 869–896.

2. Albersheim P., Darvill A. G., McNeil M., Valent B., Sharp J. K., 1983. Oligosaccharins, naturally occurring carbohydrates with biological regulatory functions // *Structure and Function of Plant Genomes / Eds. Ciferri O., Dure I. L.* New York, Plenum. P. 293–312.

3. Bettler E., Samain E., Chazalet V. et al., 1999. The living factory: in vivo production of N-acetylglucosamine containing carbohydrates in *E. coli* // *Glycoconjugate J.* Vol. 16. P. 205–212.

4. Boons G.-J., 1996. Strategies in oligosaccharide synthesis // *Tetrahedron*. Vol. 52. P. 1095–1121.

5. Bowen A. R., Chen-Wu J. L., Momany M. et al., 1992. Classification of fungal chitin synthases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 89, N 2. P. 519–523.

6. Dhugga K. S., Anderson P. C., Nichols S. E., 2000. Expression of chitin synthase and chitin deacetylase genes in plants to alter the cell wall for industrial uses and improved disease resistance. WO/2000/009729, USA.

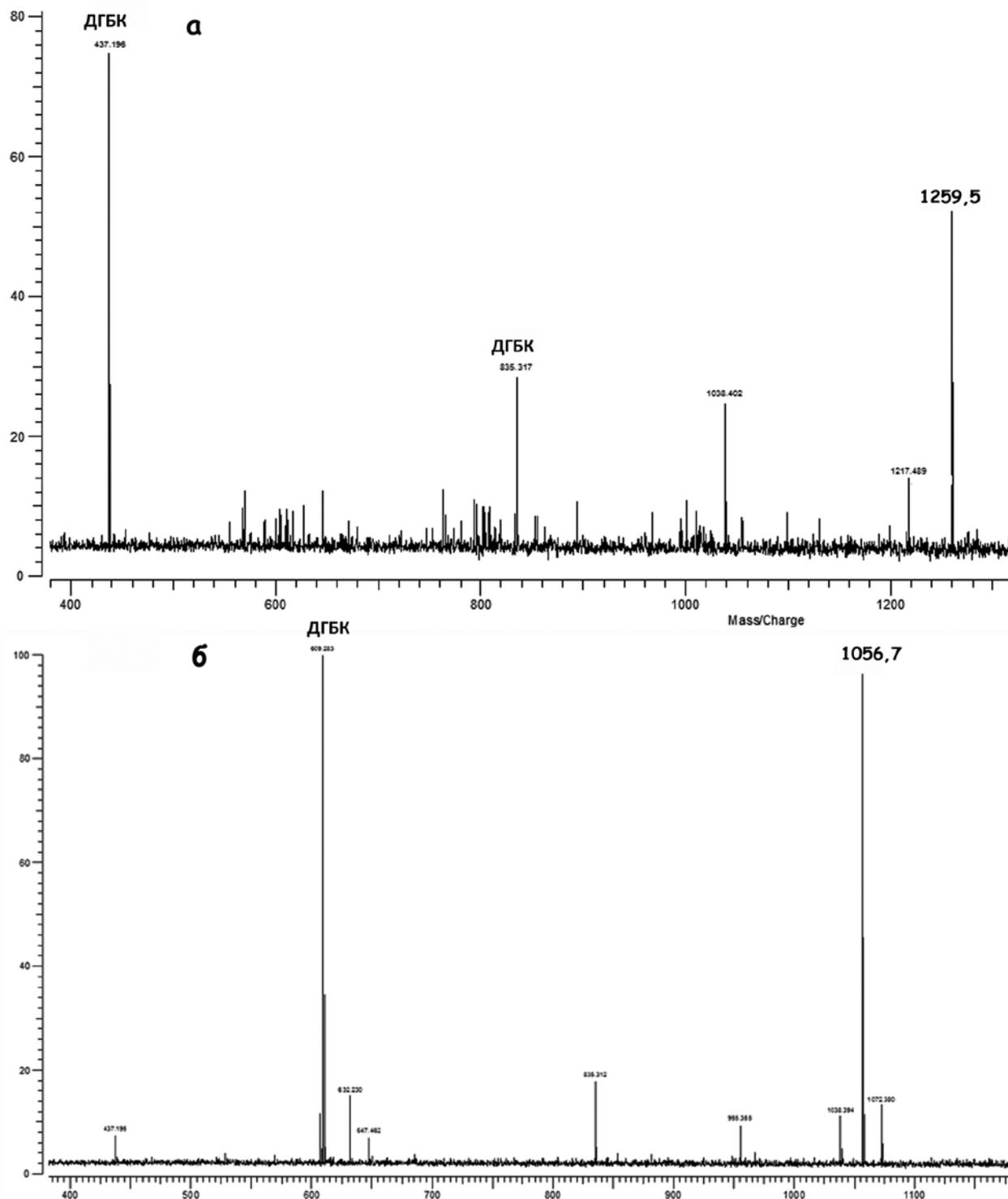


Рис. 8. Спектрограммы веществ, анализ которых был проведен с помощью метода масс-спектрометрии. ДГБК — матрица

7. Gagneux P., Varki A., 1999. Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function // *Glycobiology*. Vol. 9, N 8. P. 747–755.
8. Geremia R.A., Mergaert P., Geelen D. et al., 1994. The NodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyltransferase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 91. P. 2669–2673.
9. Endo T., Koizumi S., Tabata K., Ozaki A., 2000. Large-scale production of CMP-NeuAc and sialylated oligosaccharides through bacterial coupling // *Appl. Microbiol. Biotech.* Vol. 53. P. 257–261.

10. Inoue H., Nojima H., Okayama H., 1990. High efficiency transformation of *E. coli* with plasmids // Gene. Vol. 96. P. 23–28.
11. Harish Prashanth K.V., Tharanathan R.N., 2005. Depolymerized products of chitosan as potent inhibitors of tumor-induced angiogenesis // Biochim. Biophys. Acta. Vol. 1722. P. 22–29.
12. Kamst E., van der Drift K.M.G.M., Thomas-Oates J.E., Lugtenberg B.J., 1995. Mass spectrometric analysis of chitin oligosaccharides produced by *Rhizobium* NodC protein in *E. coli* // J. Bacteriol. Vol. 177. P. 6282–6285.
13. Kamst E., Pilling J., Raamsdonk L.M. et al., 1997. Rhizobium nodulation protein NodC is an important determinant of chitin oligosaccharide chain length in Nod factor biosynthesis // J. Bacteriol. Vol. 179. P. 2103.
14. Kamst E., Bakkens J., Quaedylied N.E.M. et al., 1999. Chitin oligosaccharide synthesis by rhizobia and zebrafish embryos starts by glycosyl transfer to O4 of the reducing-terminal residue // Biochemistry. Vol. 38. P. 4045–4052.
15. Khan W., Prithiviraj B., Smith D.L., 2003. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanineammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves // J. Plant Physiol. Vol. 160. P. 859–863.
16. Koizumi S., 2003. Large-scale production of oligosaccharides using bacterial functions // Trends Glycosci. Glycotechnol. Vol. 15, N 82. P. 65–74.
17. Koping-Hoggard M., Varum K.M., Issa M. et al., 2004. Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers // Gene Therapy. Vol. 11. P. 1441–1452.
18. Kunz C., Rudloff S., Baier W., Klein N., Strobel S., 2000. Oligosaccharides in human milk: structural, functional and metabolic aspects // Annu. Rev. Nutr. Vol. 20. P. 699–722.
19. Lee S.Y., Rasheed S., 1990. A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA // Biotechniques. Vol. 9, N. 6. P. 676–679.
20. Lopez-Lara I.M., Orgambide G., Dazzo F.B. et al., 1993. Characterization and symbiotic importance of acidic extracellular polysaccharides of *Rhizobium* sp. strain GRH2 isolated from acacia nodules // J. Bacteriology. Vol. 175, N 10. P. 2826–2832.
21. Lopez-Lara I.M., van den Berg J.D.J., Thomas-Oates J.E. et al., 1995. Structural identification of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals of *Rhizobium loti* // Molec. Microbiology. Vol. 15, N 4. P. 627–638.
22. McAuliffe J.C., Hindsgaul O., 2000. Carbohydrates in medicine // Molecular and cellular glycobiology / Eds. Fukuda M., Hindsgaul O., New York, Oxford University Press. P. 249–285.
23. Mergaert P., D'Haese W., Geelen D. et al., 1995. Biosynthesis of *Azorhizobium caulinodans* Nod Factors // J. Biol. Chem. Vol. 270, N. 49, P. 29217–29223.
24. Miroux B., Walker J.E., 1996. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels // J. Molecular Biology. Vol. 260. P. 289–298.
25. Murata T., Usui T., 2006. Large-scale Production of Oligosaccharides Using Bacterial Functions // Biosci. Biotechnol. Biochem. Vol. 70, N 5. P. 1049–1059.
26. Parlato M.C., Kamat M.N., Wang H. et al., 2008. Application of glycosyl thioimidates in solid-phase oligosaccharide synthesis // J. Org. Chem. Vol. 73, N 5. P. 1716–1725.
27. Perugino G., Trincone A., Rossi I. M., Moracci M., 2004. Oligosaccharide synthesis by glycosynthases // Trends in Biotechnology. Vol. 22, N 1. P. 31–37.
28. Priem G., Gilbert M., Wakarchuk W.W. et al., 1997. A new fermentation process allows large-scale production of human milk oligosaccharides by metabolically engineered bacteria // Carbohydrate Research. Vol. 302. P. 35–42.
29. Ruffing A., Chen R.R., 2006 a. Metabolic engineering of microbes for oligosaccharide and polysaccharide synthesis // Microbial Cell Factories. Vol. 5. P. 25.
30. Ruffing A., Mao Z., Chen R.R., 2006b. Metabolic engineering of *Agrobacterium* sp. for UDP-galactose regeneration and oligosaccharide synthesis // Metabolic Engineering. Vol. 8. P. 465–473.
31. Samain E., Drouillard S., Heyraud A. et al., 1997. Gram-scale synthesis of recombinant chitooligosaccharides in *Escherichia coli* // Carbohydrate Research. Vol. 302. P. 35–42.
32. Silverman S.J., 1989. Similar and different domains of chitin synthases 1 and 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. Two isozymes with distinct functions // Yeast. Vol. 5. P. 459–467.
33. Simunek J., Koppova I., Filip L. et al., 2010. The antimicrobial action of low-molar-mass chitosan, chitosan derivatives and chitooligosaccharides on bifidobacteria // Folia Microbiologica. Vol. 55, N 4. P. 379–382.
34. Spaink H.P., Sheeley D.M., van Brussel A.A.N. et al., 1991. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipooligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium* // Nature. Vol. 354. P. 125–130.
35. Thanou M., Florea B.I., Geldof M. et al., 2002. Quaternized chitosan oligomers as novel gene delivery vectors in epithelial cell lines // Biomaterials. Vol. 23, N 1. P. 153–159.
36. Venkatesan J., Pangestuti R., Qian Z.-J. et al., 2010. Biocompatibility and alkaline phosphatase activity of phosphorylated chitooligosaccharides on the osteosarcoma MG63 Cell Line // J. Func. Biomaterials. Vol. 1. P. 3–13.

37. Xu Q., Dou J., Wei P. et al., 2008. Chitoooligosaccharides induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via up-regulation of Bax // Carbohydrate Polymers. Vol. 71. P. 509–514.

BIOSYNTHESIS OF HEXA- AND PENTAMERIC CHITOOLIGOSACCHARIDES USING N-ACETYL-GLUCOSEAMINYL TRANSFERASE FROM RHIZOBIAL BACTERIA

Leppyanen I.V., Artamonova T.O., Lopatin S. A., Varlamov V. P., Tikhonovich I. A., Dolgikh E.A.

☼ **SUMMARY:** Chitoooligosaccharides find wide application that determines considerable interest in their use. Enzymatic synthesis of hexa-N-acetylchitohexaose and penta-N-acetylchitopentaose using N-acetylglucoseaminyl transferase enzyme possessing unique features from rhizobial bacteria *Rhizobium* sp. GRH2 and *M. loti* has been performed in *E. coli* cells. Cultivation of bacteria *E. coli* expressing the appropriate recombinant enzyme resulted in synthesis of significant amounts of desired chitoooligosaccharides (milligrams per liter). Analysis of synthesized chitoooligosaccharides by methods of high performance liquid chromatography and mass-spectrometry confirmed the conformity of the synthesized compounds to standards.

☼ **KEY WORDS:** chitoooligosaccharides; enzymatic synthesis; N-acetylglucoseaminyl transferase.

☼ Информация об авторах

Леппянен Ирина Викторовна — младший научный сотрудник. Лаборатория молекулярной и клеточной биологии. ГНУ ВНИИСХМ. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, Подбельского ш., д. 3. E-mail: leppyanen_irina@rambler.ru.

Артамонова Татьяна Олеговна — научный сотрудник. Санкт-Петербургский государственный политехнический университет. 195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., д. 29. E-mail: artamonova@nanobio.spbstu.ru.

Лопатин Сергей Александрович — к. х. н., старший научный сотрудник. Учреждение Российской академии наук Центр «Биоинженерия» РАН. 117312, Москва, 60-летия Октября пр-т, д. 7, корп. 1. E-mail: lopatin@biengi.ac.ru.

Варламов Валерий Петрович — д. х. н., заведующий лабораторией, профессор. Учреждение Российской академии наук Центр «Биоинженерия» РАН. 117312, Москва, 60-летия Октября пр-т, д. 7, корп. 1. E-mail: varlamov@biengi.ac.ru.

Тихонович Игорь Анатольевич — д. б. н., профессор, академик РАСХН. ГНУ ВНИИСХМ. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, Подбельского ш., д. 3. E-mail: contact@arriam.spb.ru.

Долгих Елена Анатольевна — к. б. н., ведущий научный сотрудник. Лаборатория молекулярной и клеточной биологии. ГНУ ВНИИСХМ. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, Подбельского ш., д. 3. E-mail: dol2helen@yahoo.com.

Leppyanen Irina Viktorovna — scientist. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology. Podbelskiy chausse, 3, Saint-Petersburg, Pushkin, 196608, Russia. E-mail: leppyanen_irina@rambler.ru.

Artamonova Tatyana Olegovna — scientist. St.Petersburg State Polytechnical University. Russia, 195251, St.Petersburg, Polytechnicheskaya, 29.. E-mail: artamonova@nanobio.spbstu.ru.

Lopatin Sergey Aleksandrovich — PhD. Center “Bioengineering” of RAS. 7, building 1, Prospect 60-letia Oktyabrya, 117312, Moscow. E-mail: lopatin@biengi.ac.ru.

Varlamov Valeriy Petrovich — doctor of science. Center “Bioengineering” of RAS. 7, building 1, Prospect 60-letia Oktyabrya, 117312, Moscow. E-mail: varlamov@biengi.ac.ru.

Tikhonovich Igor Anatolyevich — doctor of science, professor, academican of RAAS. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology. Podbelskiy chausse, 3, Saint-Petersburg, Pushkin, 196608, Russia. E-mail: contact@arriam.spb.ru.

Dolgikh Yelena Anatolyevna — PhD, group leader. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology. Podbelskiy chausse, 3, Saint-Petersburg, Pushkin, 196608, Russia. E-mail: dol2helen@yahoo.com.