

**Биоинженерия, биотехнологии**

УДК 573.6.086.83:577.21:57.052

doi: 10.15389/agrobiologia.2018.1.189rus

**ПОЛУЧЕНИЕ ТЕРМИНАЛЬНО N-ДЕАЦЕТИЛИРОВАННЫХ ОЛИГОМЕРОВ ХИТОЗАНА С ПОМОЩЬЮ РЕКОМБИНАНТНОЙ ХИТООЛИГОСАХАРИДДЕАЦЕТИЛАЗЫ *NodB Mesorhizobium loti*, ПРОДУЦИРУЕМОЙ *Escherichia coli*\*****И.В. ЛЕПЯНЕН<sup>1</sup>, В.В. ДОЛГИХ<sup>2</sup>, Т.О. АРТАМОНОВА<sup>3</sup>, С.А. ЛОПАТИН<sup>4</sup>, М.А. ХОДОРКОВСКИЙ<sup>3</sup>, И.А. ТИХОНОВИЧ<sup>1</sup>, Е.А. ДОЛГИХ<sup>1</sup>**

Олигомеры хитина и хитозана влияют на рост и развитие растений и способны индуцировать их устойчивость к заражению фитопатогенами, что определяет интерес к получению и использованию этих соединений. Влияние олигомеров хитозана на растение непосредственно зависит от степени их деацетилирования, но при гидролизе полимера или химическом синтезе трудно получить соединения необходимой структуры. Такие задачи могут быть решены в процессе биосинтеза хитоолигосахаридов, когда используются ферменты с определенной специфичностью. Избирательная способность хитоолигосахариддеацетилазы (КФ 3.5.1.-) почвенных ризобий осуществлять монодеацетилирование хитоолигосахаридов по терминальному положению обуславливает интерес к изучению возможности использования этого фермента для получения таких соединений. В настоящей работе нами предложены подходы для синтеза монодеацетилированной хитопентаозы (тетра-N-ацетилхитопентаозы) с помощью фермента хитоолигосахариддеацетилазы бактерий *Mesorhizobium loti*. При гетерологической экспрессии гена *nodB*, кодирующего хитоолигосахариддеацетилазу *M. loti* CIAM1803, в штаммах *Escherichia coli* XL1-Blue-MRF<sup>+</sup> и SHuffle express с помощью модифицированного вектора pOPE101mod-*nodB* с удаленной последовательностью *pelB* нам удалось получить фермент в растворимом состоянии. При этом количество растворимого фермента было выше в случае штамма SHuffle express, специально разработанного для обеспечения правильного формирования дисульфидных связей в синтезируемых белках. Изучение свойств фермента, очищенного на Ni-NTA агарозе, показало его способность деацетилировать пента-N-ацетилхитопентаозу по терминальному положению. Масс-спектрометрический анализ подтвердил использование практически всего субстрата для получения деацетилированной тетра-N-ацетилхитопентаозы. Были разработаны методы разделения и очистки деацетилированных хитоолигосахаридов с помощью ионообменной хроматографии с последующим обессоливанием. Синтез терминально N-деацетилированных олигомеров хитозана может быть необходимым этапом при получении их конъюгатов с биологически активными соединениями.

**Ключевые слова:** олигомеры хитина и хитозана, хитоолигосахариддеацетилаза *Mesorhizobium loti*, векторы pOPE101-215(Yol) и pRSETb, биосинтез, *Escherichia coli* SHuffle express и XL1-Blue MRF<sup>+</sup>.

Олигомеры хитина и хитозана (хитоолигосахариды) находят широкое практическое применение в медицине и агротехнологиях. В сельском хозяйстве интерес к этим соединениям связан с их способностью индуцировать неспецифическую устойчивость растений к заражению фитопатогенами благодаря активации естественного защитного потенциала (элиситорная активность) (1, 2), а также стимулировать рост и развитие растений. Особенность хитоолигосахаридов при использовании в качестве регуляторов — нетоксичность даже в значительных количествах и легкость утилизации, что делает их экологически безопасными (3-5).

Для проявления элиситорной активности важна степень деацетилирования хитоолигосахаридов, поскольку в случае одних видов растений (арабидопсис, рис, пшеница) элиситорные свойства проявляют полностью ацетилированные олигомеры хитина, других (горох, кофе, петрушка) — частично или полностью деацетилированные олигомеры хитозана (6-9). Кро-

\* В работе использовано оборудование ЦКП «Аналитический центр нано- и биотехнологий ГОУ СПбГПУ» на базе ФГБОУ ВПО СПбГПУ. Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФ (грант № 16-16-10043), часть исследований по разработке методов разделения деацетилированных хитоолигосахаридов поддержана РФФИ (грант № 15-29-05858-офи-м).

ме того, деацетилирование хитоолигосахаридов по определенным положениям может позволить ковалентно присоединять к ним различные химические группировки, что значительно расширит круг таких соединений.

При химическом синтезе сложно получить соединения с необходимой степенью деацетилирования. В частности, синтезировать таким способом частично деацетилированные олигомеры хитина практически невозможно из-за одинаковой химической активности аминогрупп в сахарных остатках, что не позволяет проконтролировать прохождение реакции деацетилирования из-за жестких условий. Подобные проблемы могут быть решены при биосинтезе хитоолигосахаридов, когда используются ферменты с избирательной специфичностью и в результате образуются продукты со строго определенной структурой. В связи с этим большой интерес представляет поиск и изучение ферментов, участвующих в синтезе олигомеров хитина и их деацетилированных производных.

У бактерий *Rhizobium* spp. общие для всех ризобияльных видов гены *nodABC* (10-13) кодируют ферменты, необходимые для синтеза коровой структуры Nod-факторов — сигнальных молекул, контролирующих развитие бобово-ризобияльного симбиоза. NodC — это N-ацетилглюкозаминилтрансфераза, катализирующая синтез олигомеров хитина. Хитоолигосахариддеацетилаза NodB необходима для деацетилирования хитоолигосахаарида по невозвращающему концу (терминальному N-ацетилглюкозамину) (14), что позволяет присоединять к нему жирную кислоту с помощью ацилтрансферазы NodA. Избирательная способность хитоолигосахариддеацетилазы ризобий осуществлять монодеацетилирование по терминальному положению определяет интерес к изучению возможности использования этого фермента для синтеза *in vitro* деацетилированных олигомеров хитозана.

Ранее нами был разработан подход для получения олигомеров хитина, связанный с использованием фермента N-ацетилглюкозаминилтрансферазы двух штаммов ризобияльных бактерий — *Rhizobium* sp. GRH2 и *Mesorhizobium loti* CIAM1803 (15). В представленной работе мы осуществили гетерологичную экспрессию гена *nodB*, кодирующего хитоолигосахариддеацетилазу *M. loti* CIAM1803, в двух штаммах *Escherichia coli* XL1-Blue-MRF<sup>+</sup> и SHuffle express. При этом использовалась плаزمида pOPE101-215(Yol), которая позволяет синтезированному белку за счет включения в состав лидерной последовательности *pelB* перемещаться в периплазматическое пространство, что обеспечивает его сохранность и правильность фолдинга (16). Такую плазмиду с успехом применили для синтеза тяжелых и легких цепей иммуноглобулина G (16). Ранее была предпринята попытка осуществить синтез NodB *Sinorhizobium meliloti* в бактериях *E. coli* BL21(DE3) с помощью вектора pET-3с, при этом рекомбинантный белок образовывал тельца включения, что потребовало рефолдинга (вероятно, поэтому активность фермента была невысока) (14). Получить активный растворимый белок NodB *Rhizobium* sp. GRH2 недавно удалось группе, которая осуществила его синтез в клетках BL21(DE3), трансформированных вектором pET22b(+) (17), но выход фермента оказался недостаточно высоким.

В настоящей работе с помощью вектора pOPE101-215(Yol) и его модифицированной версии pOPE101mod с удаленной последовательностью *pelB*, использованных для трансформации двух штаммов *E. coli* SHuffle express и XL1-Blue MRF<sup>+</sup>, нам удалось добиться высокого выхода растворимого белка — фермента хитоолигосахариддеацетилазы NodB *Mesorhizobium loti*, способного деацетилировать пента-N-ацетилхитопентаозу по терминальному положению. Для образуемых деацетилированных хитоолигосахаридов были разработаны методы избирательного выделения.

Цель работы заключалась в изучении возможности получения терминально N-деацетилированных олигомеров хитозана с помощью хитоолигосахаридеацетилазы NodB, синтезируемой при гетерологичной экспрессии специально разработанных генных конструкций.

**Методика.** ДНК выделяли из штамма *Mesorhizobium loti* CIAM 1803 (WDCM 966). Штамм *E. coli* DH5 $\alpha$  использовали для стандартных процедур клонирования. Синтез белков осуществляли в мутантном штамме *E. coli* C41, полученном на основе BL21(DE3) (18), а также в штаммах XL1-Blue MRF' («Stratagene», США) и SHuffle express («New England BioLabs», Великобритания). Штаммы *E. coli* культивировали в жидкой среде LB (19) или 2xYT («Difco», Нидерланды) на орбитальном шейкере Heidolph Unimax 2010 («Heidolph Instruments GmbH», Германия) при 30 °C или 37 °C с добавлением ампицилина (100 мкг/мл) в присутствии 0,04 мМ или 0,4 мМ индуктора экспрессии изопропил- $\beta$ -D-тиогаляктозида (ИПТГ). Штамм ризобий культивировали в жидкой среде TY (триптон — 5 г/л, дрожжевой экстракт — 3 г/л, CaCl<sub>2</sub> — 0,5 г/л) при 28 °C.

При создании генетических конструкций для синтеза NodB в бактериях *E. coli* полноразмерный ген *nodB* амплифицировали на матрице ДНК штамма *M. loti* CIAM1803 (WDCM 966) с помощью праймеров, в которые были введены сайты рестрикции BamHI и EcoRI для клонирования в векторе pRSETb («Invitrogen», США) или NcoI и NotI для клонирования в векторе pOPE101-215(Yol) («Progen Biotechnik GmbH», Германия):

*nodB\_F\_BamHI* — GGGGATCCGATGAGACGTCTCGATGACAG,

*nodB\_R\_EcoRI* — GGGAATTCCTCAGTGATGTTCTGGAAGCG,

*nodB\_F\_NcoI* — GGCCATGGCGATGAGACGTCTCGATGACAG,

*nodB\_R\_NotI* — GGGCGGCCGCGTGATGTTCTGGAAGCG.

Амплификацию проводили в термоциклере Thermal Cycler C1000 («Bio-Rad Laboratories», США) по следующему протоколу: 5 мин при 95 °C; 30 циклов — 30 с при 94 °C, 30 с при 51 °C и 30 с при 72 °C).

Для получения модифицированного вектора pOPE101mod с удаленной последовательностью *pelB* использовали следующие праймеры:

*nodB\_F\_NcoI* — GGCCATGGCGATGAGACGTCTCGATGACAG,

pOPE101mod\_R\_NcoI — CCCCATGGCGGTTAATTTCTCCTCTT.

Все векторы содержали His<sub>6</sub> последовательность, позволяющую проводить очистку рекомбинантных белков с помощью металлохелатной аффинной хроматографии.

Конструкции вводили в клетки *E. coli* методами электро- или химической трансформации (15, 20, 21). Плазмидную ДНК выделяли из 3 мл культуры с помощью щелочного лизиса (22).

Для синтеза белка NodB клетки *E. coli* C41, XL1-Blue MRF' или SHuffle express культивировали в жидкой среде LB или 2xYT при 37 °C до плотности OD<sub>600</sub> = 0,6-0,7, затем добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0,04 или 0,4 мМ и продолжали культивирование при 30 °C или 37 °C в течение 3 или 24 ч. После завершения синтеза клетки выдерживали на льду в течение 20 мин, затем осаждали центрифугированием при 3500 g (J2-21, «Beckman Coulter, Inc.», США) в течение 15 мин при 4 °C. Осадок клеток мягко ресуспендировали в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем смесь протеазных ингибиторов («Sigma», США), 1 мМ дитиотреитол (ДТТ) и ДНКазу (1 Е/мл). Клетки обрабатывали ультразвуком 3 раза в течение 30 с при амплитуде 10 мкм (Soniprep 150 Plus, «MSE», Великобритания), с интервалами выдерживания на льду в течение 40 с, после чего центрифугировали при 100000 g (TL-100, «Beckman Coulter, Inc.», США).

Аликвоты растворимой и нерастворимой фракций белков разделяли

в 12-15 % полиакриламидном геле (ПААГ) в трис-глициновом буфере в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) (25 мМ Трис-НСl рН 8,3; 192 мМ глицин, 0,1 % SDS) по методу U.K. Laemmli (23). Для разделения использовали систему Mini-PROTEAN 3 («Bio-Rad Laboratories», США), сила тока — 15-35 мА на гель. После завершения электрофореза гели промывали деионизованной водой и либо окрашивали в растворе Simple Blue («Invitrogen», США) по протоколу производителя, либо использовали для Вестерн-блот гибридизации. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану с помощью прибора для полусухого блоттинга Mini Trans-Blot («Bio-Rad Laboratories», США). Для проверки эффективности переноса мембраны окрашивали Ponce 4R, после чего отмывали 2 раза по 10 мин в буфере TBS (50 мМ Трис-НСl, рН 8,0; 150 мМ NaCl), затем 2 раза по 15 мин в буфере TTBS (50 мМ Трис-НСl, рН 8,0; 150 мМ NaCl, 0,05 % Tween-20). Далее их инкубировали в течение 1 ч в блокирующем растворе TTBS, содержащем 1 % бычий сывороточный альбумин (БСА), затем в течение 2 ч — с антителами против His<sub>6</sub> последовательности (анти-His), конъюгированными с пероксидазой хрена, которые разводили в буфере TTBS с 0,5 % БСА в соотношении 1:2000. После этого мембраны отмывали 2 раза по 15 мин в буфере TTBS, затем 2 раза по 10 мин в буфере TBS. Для проявления реакции использовали хемилуминесцентный субстрат Clarity Western ECL Substrate («Bio-Rad Laboratories», США). Развитие реакции анализировали на приборе G:BOX-CHEMI-XX9 («Syngene», Великобритания).

Для стандартной процедуры очистки синтезированных белков, содержащих His<sub>6</sub> последовательность, использовали 100 мкл Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid) агарозы («Thermo Fisher Scientific», США). Очистку проводили при 4 °С по протоколу, предложенному производителем, белок смывали с колонки 50 мМ Na-фосфатным буфером (рН 7,4), содержащим имидазол (300 мМ).

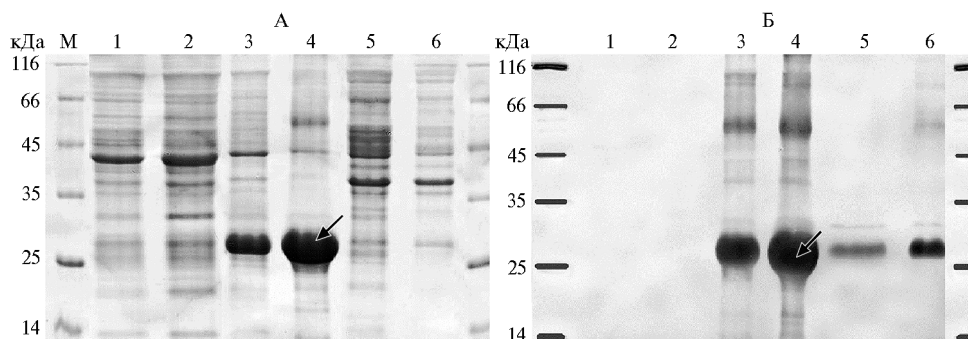
Деацетилирование пента-N-ацетилхитопентаозы *in vitro* с помощью полученного белка NodV проводили в течение ночи при 28 °С в 100 мкл раствора, содержащего 3-[N-морфолино]пропансульфоновую кислоту (MOPS, 20 мМ, рН 7,2), 5 мкг очищенного на Ni-NTA агарозе фермента и 1 мг субстрата пента-N-ацетилхитопентаозы. Реакцию останавливали кипячением при 95 °С в течение 5 мин, центрифугировали 10 мин при 14000 g (Mikro 22R, «Hettich GmbH & Co. KG», Германия). Надсадочную жидкость высушивали в вакуумном испарителе (Concentrator Plus, «Eppendorf», США). Разделение и очистку полученного олигомера хитозана выполняли с помощью ионообменной хроматографии на Toyopearl-SP 650M (0,5×2 см) («Sigma-Aldrich», США); элюцию проводили 0,2 М NaCl. Для удаления соли из элюата использовали картридж Sep-Pak C18 («Waters», США).

Продукты реакции деацетилирования анализировали на ионно-циклотронном масс-спектрометре Varian 902 FT/ICR MS («Agilent Technologies», США) со сверхпроводящим магнитом 9,4 Тл. Десорбцию и ионизацию пробы осуществляли с помощью третьей гармоники Nd:YAG лазера ( $\lambda = 355$  нм). Образцы растворяли в 2 мкл 0,1 % водного раствора трифторуксусной кислоты (ТФУ), аликвоту (0,5 мкл) смешивали на мишени с равным объемом матрицы — 2,5-дигидроксибензойной кислоты в концентрации 20 мг/мл (растворителем для матрицы служила смесь ацетонитрила и водного раствора 0,1 % ТФУ в соотношении 30 %:70 %) и сушили на воздухе. Далее образцы подвергали лазерному облучению (по 5 импульсов в серии). Молекулярную массу пробы определяли методом внешней калибровки с использованием стандартов.

*Результаты.* Конструирование векторов, обеспечивающих

синтез белка NodB в клетках *E. coli*. Для гетерологичной экспрессии гена *nodB* *M. loti* CIAM1803 получили два вида конструкций — в векторе pRSETb под контролем промотора бактериофага T7 и в векторе pOPE101-215(Yol), в котором кодирующую последовательность гена клонировали под синтетическим промотором в рамке с последовательностью *pelB*, необходимой для переноса синтезированного белка в периплазматическое пространство.

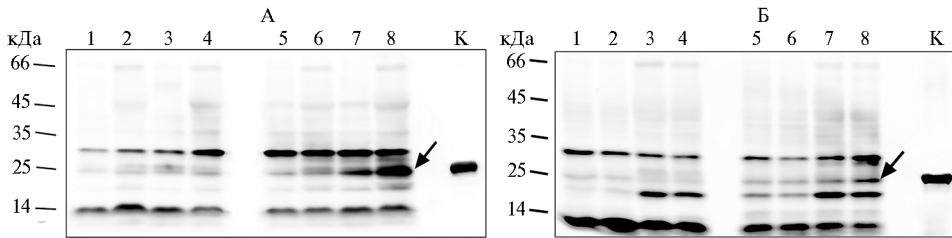
Синтез хитоолигосахариддеацетилазы (NodB) в штамме *E. coli* C41 с помощью конструкции pRSETb-*nodB*. Необходимым условием для синтеза белка является способность штамма *E. coli* стабильно сохранять экспрессионный вектор, быть устойчивым к чужеродному продукту и обеспечивать его стабильность. Такими свойствами обладают мутантные штаммы *E. coli* C41(DE3) и C43(DE3), полученные на основе BL21(DE3) (18). При культивировании клеток *E. coli* C41, трансформированных конструкцией pRSETb-*nodB*, в присутствии 0,4 мМ индуктора ИПТГ наблюдали синтез белка NodB с ожидаемой молекулярной массой около 25 кДа (рис. 1). Продукция NodB оказалась высокой, но при этом его основная масса накапливалась в нерастворимой фракции, полученной при 3600 g, что свидетельствовало о формировании телец включения (см. рис. 1). Варьирование температуры культивирования и концентрации индуктора не влияло на увеличение выхода белка NodB в растворимом состоянии. Сходным образом ранее при использовании клеток BL21(DE3), трансформированных вектором pET-3с, в котором ген *nodB* был клонирован под промотором T7, весь синтезированный белок находился в нерастворимой фракции (14). Таким образом, с векторами, обеспечивающими очень высокий уровень синтеза NodB в клетках *E. coli*, не удастся получить его в растворимом состоянии.



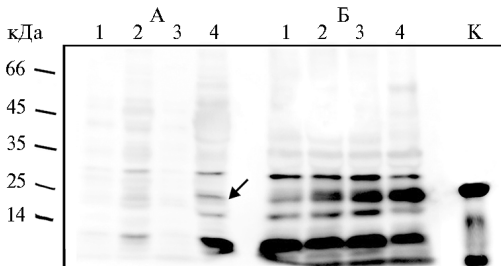
**Рис. 1.** Синтез хитоолигосахариддеацетилазы (NodB) *Mesorhizobium loti* CIAM1803 в клетках *Escherichia coli* C41, трансформированных вектором pRSETb-*nodB*, после 20 ч культивирования. А — окрашивание геля Simple Blue, Б — вестерн-блот гибридизация с анти-His антителами. Трансформация вектором pRSETb без вставки (контроль): 1 и 2 — культивирование без добавления индуктора изопрропил-β-D-тиогаляктозида (ИПТГ) и с 0,4 мМ ИПТГ. Трансформация вектором pRSETb-*nodB*: 3 и 4 — культивирование без добавления ИПТГ и с 0,4 мМ ИПТГ (нерастворимые фракции, полученные при центрифугировании при 3600 g); 5 и 6 — культивирование без добавления ИПТГ и с 0,4 мМ ИПТГ (нерастворимые фракции, полученные при центрифугировании при 14000 g). М — маркер молекулярной массы. Стрелкой отмечен синтезируемый белок.

Синтез хитоолигосахариддеацетилазы в *E. coli* XL1-Blue MRF' и SHuffle express с помощью вектора pOPE101-215(Yol). Для увеличения выхода растворимого белка NodB нами была использована конструкция в векторе pOPE101-215(Yol) («Progen Biotechnik GmbH», Германия), обеспечивающем накопление белка в периплазматическом пространстве клеток. При введении pOPE101-215(Yol)-*nodB* в клетки *E. coli* XL1-

Blue MRF' и SHuffle express в присутствии 0,04 и 0,4 мМ ИПТГ наблюдали синтез белка с ожидаемой молекулярной массой (около 25 кДа). Об этом судили по появлению продукта, сходного по подвижности с тем, который синтезировался в клетках *E. coli* C41 при использовании конструкции pRSETb-nodB. У обоих штаммов экспрессия NodB была максимальной при культивировании в течение ночи, температуре 37 °С и концентрации ИПТГ 0,4 мМ (рис. 2), но в случае штамма XL1-Blue MRF' продукция NodB оказалась существенно выше (см. рис. 2). Белок, полученный в клетках *E. coli* XL1-Blue MRF', накапливался преимущественно в нерастворимой фракции, и лишь незначительное его количество присутствовало в растворимой (рис. 3). Для того чтобы исключить возможность неэффективного лизиса клеток при использовании специального буфера (16), мы применили обработку ультразвуком. Однако, вероятно, из-за особенностей структуры синтезированного белка NodB его эффективного переноса в периплазматическое пространство мы не выявили. Для оценки возможного влияния *pelB* на уровень синтеза белка нами была также получена конструкция pOPE101mod-nodB, из которой удалили фрагмент, кодирующий эту последовательность.



**Рис. 2.** Синтез хитоолигосахариддеацетилазы (NodB) *Mesorhizobium loti* CIAM1803 в клетках *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (А) и SHuffle express (Б), трансформированных вектором pOPE101-215(Yol)-nodB: 1 и 2 — культивирование при 30 °С в присутствии 0,04 мМ изопропил-β-D-тиогаляктозида (ИПТГ) в течение 3 и 20 ч, 3 и 4 — культивирование при 30 °С с 0,4 мМ ИПТГ в течение 3 и 20 ч; 5 и 6 — культивирование при 37 °С с 0,04 мМ ИПТГ в течение 3 и 20 ч, 7 и 8 — культивирование при 37 °С с 0,4 мМ ИПТГ в течение 3 и 20 ч. К (контроль) — синтез белка NodB в клетках *E. coli* C41 с помощью вектора pRSETb-nodB через 20 ч при 37 °С в присутствии 0,4 мМ ИПТГ (нерастворимая фракция). Вестерн-блот гибридизация с анти-His антителами. Стрелкой отмечен синтезируемый белок.

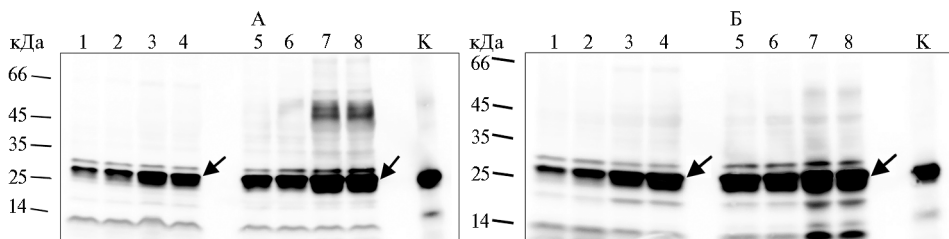


**Рис. 3.** Анализ содержания белка NodB *Mesorhizobium loti* CIAM1803 в растворимой (А) и нерастворимой (Б) фракциях клеток *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' при трансформации конструкцией pOPE101-215(Yol)-nodB: 1 и 2 — культивирование при 37 °С в присутствии 0,04 мМ изопропил-β-D-тиогаляктозида (ИПТГ) в течение 3 и 20 ч, 3 и 4 — культивирование при 37 °С с 0,4 мМ ИПТГ в течение 3 и 20 ч. К (контроль) — синтез белка NodB в клетках *E. coli* C41 с помощью вектора pRSETb-nodB через 20 ч

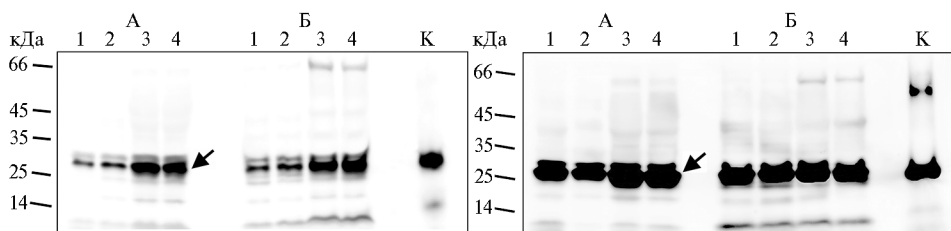
при 37 °С в присутствии 0,4 мМ ИПТГ (нерастворимая фракция). Вестерн-блот гибридизация с анти-His антителами. Стрелкой отмечен синтезируемый белок.

Синтез хитоолигосахариддеацетилазы (NodB) в клетках *E. coli* XL1-Blue MRF' и SHuffle express с помощью вектора pOPE101mod-nodB. При использовании вектора pOPE101mod-nodB, из которого была удалена лидерная последовательность *pelB*, наблюдали более высокий уровень продукции NodB в двух типах клеток *E. coli* XL1-Blue MRF' и SHuffle express по сравнению с таковым в варианте трансформации исходным вектором pOPE101-215(Yol)-nodB (рис. 4, 5). При культивировании в присут-

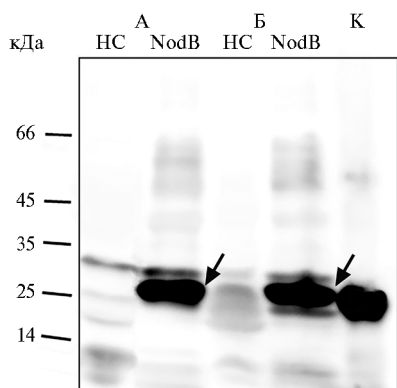
ствии 0,4 мМ ИПТГ и температуре 30 и 37 °С высокий уровень синтеза NodB наблюдали уже через 3 ч в клетках двух штаммов *E. coli* XL1-Blue MRF' и SHuffle express (см. рис. 4, 5). При этом количество растворимого белка было



**Рис. 4.** Синтез хитоолигосахариддеацетилазы NodB *Mesorhizobium loti* CIAM1803 при трансформации *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (А) и SHuffle express (Б) вектором pOPE101mod-nodB: 1 и 2 — культивирование при 30 °С в присутствии 0,04 мМ изопропил-β-D-тиогалактозида (ИПТГ) в течение 3 и 20 ч, 3 и 4 — культивирование при 30 °С с 0,4 мМ ИПТГ в течение 3 и 20 ч; 5 и 6 — культивирование при 37 °С с 0,04 мМ ИПТГ в течение 3 и 20 ч, 7 и 8 — культивирование при 37 °С с 0,4 мМ ИПТГ в течение 3 и 20 ч. К (контроль) — белок NodB, синтезируемый в клетках *E. coli* C41 с помощью вектора pRSETb-nodB через 20 ч при 37 °С в присутствии 0,4 мМ ИПТГ. Вестерн-блот гибридизация с анти-His антителами. Стрелкой отмечен синтезируемый белок.



**Рис. 5.** Содержание белка NodB *Mesorhizobium loti* CIAM1803 в растворимой (А) и нерастворимой (Б) фракциях при трансформации *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (слева) и SHuffle express (справа) конструкцией pOPE101mod-nodB (культивирование при 30 °С): 1 и 2 — культивирование в присутствии 0,04 мМ изопропил-β-D-тиогалактозида (ИПТГ) в течение 3 и 20 ч, 3 и 4 — культивирование с 0,4 мМ ИПТГ в течение 3 и 20 ч. К (контроль) — синтез белка NodB в клетках *E. coli* C41 с помощью вектора pRSETb-nodB через 20 ч в присутствии 0,4 мМ ИПТГ (нерастворимая фракция). Вестерн-блот гибридизация с анти-His антителами. Стрелкой отмечен синтезируемый белок.



**Рис. 6.** Очистка рекомбинантного белка NodB *Mesorhizobium loti* CIAM1803 на Ni-NTA агарозе: А и Б — трансформация штаммов *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' и SHuffle express конструкцией pOPE101mod-nodB, К (контроль) — трансформация *E. coli* C41 pRSETb-nodB; НС — белок, не связавшийся с Ni-NTA агарозой, NodB — белок, очищенный на Ni-NTA агарозе. Вестерн-блот гибридизация с анти-His антителами. Стрелкой отмечен синтезируемый белок.

выше при температуре 30 °С и использовании штамма SHuffle express (см. рис. 5), специально разработанного для обеспечения правильного формирования дисульфидных связей в белках (24). Повышение выхода рекомбинантного продукта в растворимом состоянии при снижении температуры культивирования, вероятно, может определяться тем, что в таких условиях в клетке усиливается синтез шаперонов (25). Таким образом, нам удалось получить хитоолигосахариддеацетилазу в растворимом состоянии.

Анализ продуктов реакции деацетилирования пента-

N-ацетилхитопентаозы с помощью фермента хитоолигосахариддеацетилазы *M. loti* CIAM1803. Для проверки ферментативной активности полученной хитоолигосахариддеацетилазы исследовали ее способность деацетилировать пента-N-ацетилхитопентаозу — основной субстрат этого фермента у бактерий *M. loti*. С этой целью провели очистку рекомбинантного белка, полученного при синтезе в клетках *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup> и Shuffle express, с помощью металлохелатной аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе (из 50 мл культуры получили около 200 мкг частично очищенного белка) (рис. 6). Очищенный фермент инкубировали с субстратом — пента-N-ацетилхитопентаозой. Масс-спектрометрия образцов, полученных после реакции деацетилирования, катализируемой хитоолигосахариддеацетилазой NodB (рис. 7), выявила соединение с соотношением массы к заряду ( $m/z$ ) 1014,390. Ожидаемая масса деацетитированной по одному положению хитопентаозы — 991. Однако при масс-спектрометрическом анализе к исследуемому веществу, как правило, присоединяется ион  $H^+$  или  $Na^+$ . При присоединении  $Na^+$  молекулярная масса анализируемого вещества составит  $991 + 23 = 1014$ . Таким образом, синтезируемое вещество — это тетра-N-ацетилхитопентаоза (монодеацетилированная хитопентаоза). Проведенный анализ показал, что хитоолигосахариддеацетилаза, полученная при синтезе в бактериях *E. coli* Shuffle express и XL1-Blue MRF<sup>+</sup>, обладает необходимой ферментативной активностью.

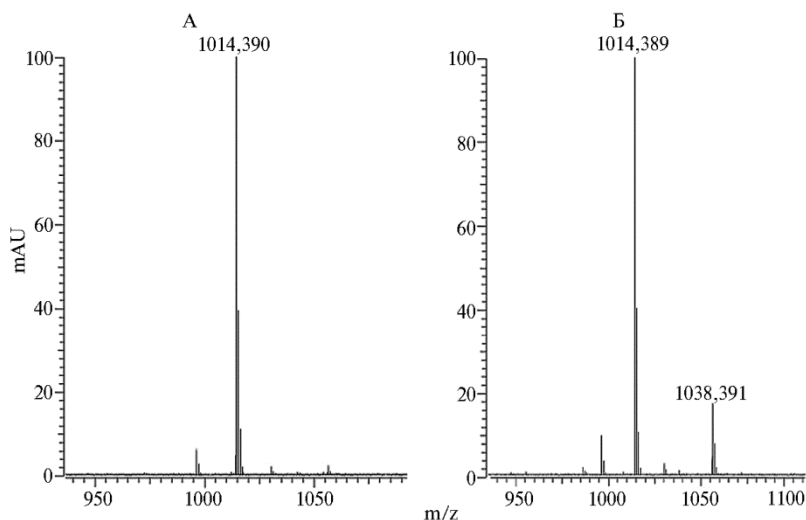


Рис. 7. Масс-спектрометрический анализ продуктов реакции деацетилирования пента-N-ацетилхитопентаозы с помощью фермента хитоолигосахариддеацетилазы *Mesorhizobium loti* CIAM1803, синтезированной в штаммах *E. coli* SHuffle Express (A) и XL1-Blue MRF<sup>+</sup> (B) с помощью вектора pOPE101mod-nodB (масс-спектрометр Varian 902 FT/ICR MS, «Agilent Technologies», США).

Выделение N-терминально деацетилированных хитоолигосахаридов. Мы также исследовали возможность выделения деацетилированных хитоолигосахаридов (за счет наличия в молекуле свободной аминогруппы) методом ионообменной хроматографии. При этом необходимо было решить задачу удаления водно-солевого элюента после хроматографии. Для выделения N-терминально деацетилированного хитоолигосахарида применили ионообменную хроматографию на Toyopearl-SP 650M; элюцию проводили 0,2 М NaCl. Для удаления соли из элюата использовали картридж Sep-Pak C18. Это связано с тем, что олигомеры как хитина, так и хитозана способны обратимо взаимодействовать в водном элюенте с обращенно-фазовыми сорбентами, а время их выхода с колонки в несколько



раз превышает время выхода неорганических солей (26). Раствор хитоолигосахаридов после ионообменной хроматографии (не более одного объема картриджа) пропускали через сорбент, который затем промывали водой. Молекулы NaCl через гидрофобную среду проходят практически без эффекта разбавления, поэтому для полного обессоливания достаточно промыть колонку 3 объемами картриджа. После этого хитоолигосахарид элюировали водой, обессоленный раствор лиофильно высушивали и проводили анализ. Таким образом, нами были разработаны методы избирательно-го выделения деацетилированных хитоолигосахаридов.

В нашей работе была изучена возможность синтеза фермента хитоолигосахариддеацетилазы (NodB) бактерий *M. loti* в клетках *E. coli* в растворимом состоянии и его использования для получения терминально N-деацетилированных олигомеров хитозана. У почвенных бактерий ризобий хитоолигосахариддеацетилаза — растворимый цитоплазматический белок, который участвует в начальных этапах синтеза сигнальных молекул Nod-факторов, в частности деацетилюет получаемые на первом этапе синтеза олигомеры хитина ( $n = 4-6$ ) по невозстанавливаемому концу (27). Возможность получения терминально N-деацетилированных олигомеров хитина *in vitro* с помощью фермента хитоолигосахариддеацетилазы представляет практический интерес, поскольку такие соединения очень сложно получить при химическом синтезе, но удобно использовать для ковалентного присоединения биологически активных веществ.

Для гетерологичной экспрессии гена *nodB* *M. loti* в бактериях *E. coli* были использованы несколько генетических конструкций, в том числе обеспечивающих возможность накопления синтезируемого белка в периплазматическом пространстве. Однако в наших экспериментах при синтезе в клетках *E. coli* C41 с конструкцией pRSETb-*nodB*, а также в XL1-Blue MRF' и SHuffle express с конструкцией pOPE101-215(Yol)-*nodB* первоначально не удалось получить существенного количества белка NodB в растворимом состоянии. Большая часть синтезируемого белка в клетках содержалась в нерастворимой фракции клеток. Наблюдаемый неэффективный вынос NodB в периплазматическое пространство, вероятно, был связан с конформационными особенностями этого белка.

Однако при удалении последовательности *pelB* из состава экспрессионного вектора нам удалось повысить продукцию растворимого белка в клетках SHuffle express и XL1-Blue MRF'. Количественный выход белка NodB после очистки на Ni-NTA агарозе при этом был достаточно высоким. Оценка активности очищенного растворимого белка NodB подтвердила его способность деацетилировать пента-N-ацетилхитопентаозу по невозстанавливаемому концу. С помощью масс-спектрометрического анализа было показано, что для получения деацетилированной тетра-N-ацетилхитопентаозы использовался практически весь субстрат. Сходная активность была выявлена для другого фермента ризобий NodB *Rhizobium* sp. GRH2, синтезированного в растворимом состоянии в клетках *E. coli* BL21(DE3) с помощью конструкции в векторе pET-22b(+) (17).

Итак, предложенный нами подход с использованием модифицированного вектора pOPE101mod-*nodB* впервые позволил осуществить синтез активной хитоолигосахариддеацетилазы *Mesorhizobium loti* в новом типе клеток *Escherichia coli* SHuffle express и XL1-Blue MRF' с высоким количественным выходом. Для разделения и очистки получаемых деацетилированных хитоолигосахаридов разработаны методы, основанные на ионообменной хроматографии с последующим обессоливанием.

*1ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии,*  
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,  
e-mail: dol2helen@yahoo.com ✉, leppyanen\_irina@rambler.ru,  
arriam2008@yandex.ru;

*2ФГБНУ Всероссийский НИИ защиты растений,*  
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,  
e-mail: dol1slav@yahoo.com;

*3ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет им. Петра Великого,*  
195251 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29,  
e-mail: artamonova@nanobio.spbstu.ru, khodorkovskii@mail.ru;

*4ФГУ ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН,*  
119071 Россия, г. Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2,  
e-mail: lopatin@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию  
7 декабря 2016 года

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2018, V. 53, № 1, pp. 189-200

## PRODUCTION OF TERMINALLY N-DEACETYLATED OLIGOMERS OF CHITOSANE USING RECOMBINANT CHITOOLIGOSACCHARIDE DEACETYLASE NodB OF BACTERIA *Mesorhizobium loti* EXPRESSED IN *Escherichia coli*

I.V. Leppyanen<sup>1</sup>, V.V. Dolgikh<sup>2</sup>, T.O. Artamonova<sup>3</sup>, S.A. Lopatin<sup>4</sup>, M.A. Khodorkovskii<sup>3</sup>,  
I.A. Tikhonovich<sup>1</sup>, E.A. Dolgikh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Federal Agency for Scientific Organizations, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail dol2helen@yahoo.com (✉ corresponding author), leppyanen\_irina@rambler.ru, arriam2008@yandex.ru;

<sup>2</sup>All-Russian Research Institute of Plant Protection, Federal Agency for Scientific Organizations, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail dol1slav@yahoo.com;

<sup>3</sup>Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, 29, ul. Politechnicheskaya, St. Petersburg, 195251 Russia, e-mail artamonova@nanobio.spbstu.ru, khodorkovskii@mail.ru;

<sup>4</sup>Research Center of Biotechnology RAS, Federal Agency for Scientific Organizations, 33, str. 2, Leninskii prosp., Moscow, 119071 Russia, e-mail lopatin@biengi.ac.ru

ORCID:

Leppyanen I.V. orcid.org/0000-0002-2158-0855

Dolgikh V.V. orcid.org/0000-0002-2362-2633

Artamonova T.O. orcid.org/0000-0002-0069-0561

Lopatin S.A. orcid.org/0000-0002-2018-7859

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Experiments were carried out using equipment of Analytic Center for Nano and Biotechnology of Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University

Supported financially by Russian Science Foundation (grant № 16-16-10043), the methods of deacetylated chitoooligosaccharides purification were developed using financial support from Russian Foundation for Basic Research (grant № 15-29-05858-ofi-m)

Received December 7, 2016

doi: 10.15389/agrobiol.2018.1.189eng

### Abstract

Chitin and chitosan oligomers affect the growth and development of plants and are able to induce plant resistance to infection with phytopathogens, which determines the interest in the preparation and use of these compounds. The influence of chitosan oligomers on the plant directly depends on the degree of deacetylation, but it is difficultly to obtain compounds with necessary structure using hydrolysis of the polymer or chemical synthesis. Such problems can be solved in the process of biosynthesis of chitoooligosaccharides, when enzymes with specific activity are used. The selectivity of the chitoooligosaccharide deacetylase (EC 3.5.1.-) of rhizobia to carry out the mono-deacetylation of the chitoooligosaccharides at the terminal position of the molecule causes interest in studying the possibility to use this enzyme for the synthesis of such compounds. In current work we have developed approaches for the synthesis of mono-deacetylated chitopentaose (tetra-N-acetylchitopentaose) using *Mesorhizobium loti* CIAM1026 enzyme chitoooligosaccharide deacetylase. Heterologous expression of the *nodB* gene encoding the *M. loti* chitoooligosaccharide deacetylase in *Escherichia coli* XLI1-Blue MRF<sup>+</sup> and SHuffle express strains using the modified pOPE101mod-*nodB* vector with deleted *peIB* sequence resulted in soluble enzyme preparation. The amount of soluble enzyme was higher in SHuffle express strain, which was specially developed for correct formation of disulfide bonds in synthesized proteins. Studying the properties of the enzyme purified on Ni-NTA agarose showed its ability to deacetylate penta-N-acetylchitopentaose at the terminal position. Mass spectrometric analysis confirmed the use of practically the entire substrate for the preparation of

deacetylated tetra-N-acetylchitopentaose. Methods for the separation and purification of deacetylated chitooligosaccharides by ion exchange chromatography followed by desalination have been developed. Synthesis of terminally N-deacetylated chitosan oligomers may be a necessary step in the preparation of their conjugates with biologically active compounds.

Keywords: chitin and chitosan oligomers, *Mesorhizobium loti* chitooligosaccharide deacetylase, pOPE101-215(Yol) and pRSETb vectors, biosynthesis, *Escherichia coli* SHuffle express and XL1-Blue MRF'.

## REFERENCES

1. Abu-Muriefah S.S. Effect of chitosan on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown under water stress conditions. *Int. Res. J. Agric. Sci. Soil Sci.*, 2013, 3: 192-199.
2. Chatelain P.G., Pintado M.E., Vasconcelos M.W. Evaluation of chitooligosaccharide application on mineral accumulation and plant growth in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Sci.*, 2014, 215-216: 134-140 (doi: 10.1016/j.plantsci.2013.11.009).
3. Khan W., Prithiviraj B., Smith D.L. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *J. Plant Physiol.*, 2003, 160: 859-863 (doi: 10.1078/0176-1617-00905).
4. Aziz A., Trotel-Aziz P., Dhuicq L., Jeandet P., Couderchet M., Vernet G. Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. *Disease Control and Pest Management*, 2006, 96(11): 1188-1194 (doi: 10.1094/PHYTO-96-1188).
5. Gayoso G., Pomar F., Novo-Uzal E., Merino M., de Iarduya O.M. The Ve-mediated resistance response of the tomato to *Verticillium dahliae* involves H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxidase and lignins and drives PAL gene expression. *Plant Biology*, 2010, 10(232): 1471-2229 (doi: 10.1186/1471-2229-10-232).
6. Kaku H., Nishizawa Y., Ishii-Minami N., Akimoto-Tomiyama C., Dohmae N., Takio K., Minami E., Shibuya N. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *PNAS USA*, 2006, 103: 11086-11091 (doi: 10.1073/pnas.0508882103).
7. Cabrera J.C., Messiaen J., Cambier P., Van Cutsem P. Size, acetylation and concentration of chitooligosaccharide elicitors determine the switch from defense involving PAL activation to cell death and water peroxide production in Arabidopsis cell suspensions. *Physiologia Plantarum*, 2006, 127: 44-56 (doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00677.x).
8. Conrath U., Domard A., Kauss H. Chitosan-elicited synthesis of callose and of coumarin derivatives in parsley cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.*, 1989, 8(3): 152-155 (doi: 10.1007/BF00716829).
9. Dzung N.A., Khanh V.T.P., Dzung T.T. Research on impact of chitosan oligomers on biophysical characteristics, growth, development and drought resistance of coffee. *Carbohydr. Polym.*, 2011, 84: 751-755 (doi: 10.1016/j.carbpol.2010.07.066).
10. Spink H., Sheeley D. M., van Brussel A.A.N., Glushka J., York W.S., Tak T., Geiger O., Kennedy E., Reinhold N., Lugtenberg B.J.J. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipooligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature*, 1991, 354: 125-130 (doi: 10.1038/354125a0).
11. Mergaert P., D'Haese W., Geelen D., Promé D., Van Montagu M., Geremia R., Promé J.C., Holsters M. Biosynthesis of *Azorhizobium caulinodans* nod factors. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270(49): 29217-29223 (doi: 10.1074/jbc.270.49.29217).
12. Roche P., Maillat F., Plazanet C., Debelle F., Ferro M., Truchet G., Prome J.-C., Denarie J. The common *nodABC* genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. *PNAS USA*, 1996, 93: 15305-15310 (doi: 10.1073/pnas.93.26.15305).
13. Southwick A.M., Wang L.X., Long S.R., Lee Y.C. Activity of *Sinorhizobium meliloti* NodAB and NodH enzymes on thiochitooligosaccharides. *J. Bacteriol.*, 2002, 184(14): 4039-4043 (doi: 10.1128/JB.184.14.4039-4043.2002).
14. John M., Rohrig H., Schmidt J., Wieneke U., Schell J. Rhizobium NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. *PNAS USA*, 1993, 90: 625-629 (doi: 10.1073/pnas.90.2.625).
15. Leppyanen I.V., Artamonova T.O., Lopatin S.A., Varlamov V.P., Tikhonovich I.A., Dolgikh E.A. Biosynthesis of hexa and pentameric chitooligosaccharides using N-acetyl-glucosaminyl transferase from rhizobial bacteria. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 2014, 4(5): 368-381 (doi: 10.1134/S2079059714050098).
16. Schmiel A., Breitling F., Winter C., Queitsch I. Dübel S. Effect of unpaired cysteines on yield, solubility and activity in various recombinant antibody formats expressed in *E. coli*. *J. Immunol. Methods*, 2000, 242(1-2): 101-114 (doi: 10.1016/S0022-1759(00)00243-X).
17. Hamer S.N., Cord-Landwehr S., Biarnes X., Planas A., Waegeman H., Moerschbacher B.M., Kolkenbrock S. Enzymatic production of defined chitosan oligomers with a specific pattern of acetylation using a combination of chitin oligosaccharide deacetylases. *Sci. Rep.*, 2015, 5: 8716 (doi: 10.1038/srep08716).
18. Miroux B., Walker J.E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow

- synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.*, 1996, 260: 289-298 (doi: 10.1006/jmbi.1996.0399).
19. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1951, 62: 293-300.
  20. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 1990, 96: 23-28 (doi: 10.1016/0378-1119(90)90336-P).
  21. Dower W.J., Miller J.F., Ragsdale C.W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.*, 1988, 16: 6127-6145.
  22. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 1979, 7: 1513-1523.
  23. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
  24. Lobstein J., Emrich C.A., Jeans C., Faulkner M., Riggs P., Berkmen M. Shuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microb. Cell Fact.*, 2012, 11: 753 (doi: 10.1186/1475-2859-11-56).
  25. Caspeta L., Flores N., Pérez N.O., Bolívar F., Ramírez O.T. The effect of heating rate on *Escherichia coli* metabolism, physiological stress, transcriptional response, and production of temperature induced recombinant protein: a scale-down study. *Biotechnol. Bioeng.*, 2009, 102(2): 468-482 (doi: 10.1002/bit.22084).
  26. Lopatin S.A., Ilyin M.M., Pustobaev V.N., Bezchetnikova Zh.A., Varlamov V.P., Davankov V.A. Mass-spectrometric analysis of N-acetylchitooligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of chitosan. *Anal. Biochem.*, 1995, 227, 285-288 (doi: 10.1006/abio.1995.1282).
  27. Schmidt J., Wingender R., John M., Wieneke U., Schell J. *Rhizobium meliloti* nodA and nodB genes are involved in generating compounds that stimulate mitosis of plant cells. *PNAS USA*, 1988, 85(22): 8578-8582.
- 

### Научные собрания

#### 3rd FOOD STRUCTURE AND FUNCTIONALITY FORUM SYMPOSIUM AND 3rd IDF SYMPOSIUM ON MICROSTRUCTURE OF DAIRY PRODUCTS

(June 3-6 2018, Montréal, Quebec, Canada)

The conference will bring together experts in food engineering, food science, food technology and nutrition. The FSFF is primarily focused on the structuring of food tailored towards end-user functionality (e.g., improved texture, taste perception, health, shelf stability). The conference will bring together experts in food engineering, food science, food technology and nutrition, and aims to build on the success of the first Symposium held in Amsterdam in 2014 and the second Symposium in Singapore in 2016.

#### Conference topics:

- Session 1: Linking structure and functionality in foods using novel experimental and modelling approaches
- Session 2: The role of structuring and de-structuring in food product design and functionality
- Session 3: Food structure design across the lifespan
- Session 4: Food structure design for healthcare and medical applications
- Session 5: Constructing dairy matrices for oral and gut functionality
- Session 6: Deconstructing dairy matrices for release of nutrient and flavor components

**Information:** <https://www.elsevier.com/events/conferences/food-structure-and-functionality-forum-symposium>

#### MITOCHONDRIAL BIOLOGY

(April 22-26, 2018, Westin Miyako Kyoto, Kyoto, Japan)

Mitochondria perform fundamental diverse functions in eukaryotic cells, including ATP production and ion and phospholipid homeostasis. They also serve as platforms to integrate signaling pathways and cellular processes, such as innate immunity and autophagy. Mitochondrial functions are tightly linked to mitochondrial form, which is established through coordinated machines that control dynamics, positioning, motility and mitochondrial DNA transmission. Contact sites between mitochondrial with diverse organelles have emerged as key and pervasive regulators of mitochondrial form and function. These contact sites, as well as metabolites, fully integrate mitochondria into the cell and organism.

#### Topics:

- Mitochondrial dynamics
- Mitochondrial quality control
- Mitophagy
- Metabolism
- Mitochondrial motility and distribution
- Mitochondrial communication
- Regulation of mitochondrial biogenesis

**Information:** <https://www.keystonesymposia.org>