

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-87-92

УДК 616.932:579.222

Е.В. Монахова, Г.В. Демидова, Р.В. Писанов, О.В. Дуванова, **Б.Н. Мишанькин****РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ *ESCHERICHIA COLI* С ПОВЫШЕННОЙ ПРОДУКЦИЕЙ НЕЙРАМИНИДАЗЫ *VIBRIO CHOLERAЕ***

ФКВЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Целью работы явилось клонирование гена *nanH* *Vibrio cholerae* в составе плазмидного вектора, обеспечивающего экспрессию чужеродных генов под контролем T5-промотора, и создание штамма *E. coli* – продуцента рекомбинантной нейраминидазы. **Материалы и методы.** Донором ДНК послужил штамм *V. cholerae* O1, векторной плазмидой – pQE30. Ген амплифицировали с помощью ПЦР, клонирование осуществляли общепринятыми методами, продуктивность рекомбинантов и локализацию искомого белка определяли по результатам электрофореза лизатов клеток. Нейраминидазную активность определяли по наличию флуоресценции в ультрафиолетовом свете после инкубации со специфическим субстратом (4-метилумбеллиферил-N-ацетилнейраминовой кислотой). **Результаты и обсуждение.** Сконструирована рекомбинантная плаزمида pNanH, содержащая ген *nanH* *V. cholerae*, встроенный по сайтам BamHI-PstI в полилинкер pQE30. Экспрессия клонированного гена в штамме-продуценте *E. coli* JM103pNanH происходит под контролем T5-промотора при индукции изопропил-β-D-тиогаляктозидом (ИПТГ). Штамм обладает нейраминидазной активностью. Рекомбинантный белок NanH накапливается в клетках продуцента в двух формах. Первая, с молекулярной массой (ММ) 89,5 кДа, представляет собой непротессированный белок с гексагистидиновым блоком (6His-tag) на N-конце и находится в тельцах включения. Ее содержание составляет 5,6–6,6 % суммарных клеточных белков. Вторая, с ММ 83 кДа, обнаруживается в периплазматическом пространстве клеток и соответствует зрелой NanH, содержание составляет 3,4–3,8 %. Их общее содержание – 9–10 % суммарных клеточных белков, что позволяет считать штамм *E. coli* JM103pNanH суперпродуцентом искомого фактора. Штамм может быть использован для получения NanH *V. cholerae* в целях создания специфических диагностических, терапевтических и фармацевтических препаратов, а также для изучения свойств этого белка как фактора патогенности/персистенции возбудителя.

Ключевые слова: нейраминидаза *Vibrio cholerae*, рекомбинантная плазмиды, клонирование гена, экспрессия в *Escherichia coli*.

Монахова Елена Владимировна monakhova_ev@antiplague.ru

Корреспондирующий автор: Монахова Елена Владимировна, e-mail: monakhova_ev@antiplague.ru.

Для цитирования: Монахова Е.В., Демидова Г.В., Писанов Р.В., Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н. Рекомбинантный штамм *Escherichia coli* с повышенной продукцией нейраминидазы *Vibrio cholerae*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 2:87–92. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-87-92

E.V. Monakhova, G.V. Demidova, R.V. Pisanov, O.V. Duvanova, **B.N. Mishan'kin****Recombinant *Escherichia coli* Strain with Enhanced Production of *Vibrio cholerae* Neuraminidase**

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Objective of this work was cloning of the *Vibrio cholerae nanH* gene as part of a plasmid vector, providing expression of foreign genes under the control of T5 promoter, and construction of a *E. coli* strain – producer of *V. cholerae* recombinant neuraminidase. **Materials and methods.** *V. cholerae* O1 strain served as a DNA donor, pQE30 – as a vector plasmid. The gene was PCR-amplified, the cloning was carried out by means of conventional methods, performance of recombinants and localization of the required protein was determined based on the results of electrophoresis of cell lysates. Neuraminidase activity was identified by fluorescence in ultraviolet light after incubation with specific substrate (4-methylumbelliferyl-N-acetylneuraminic acid). **Results and discussion.** Recombinant plasmid pNanH, containing the cloned gene *nanH* *V. cholerae*, has been constructed. The gene is inserted into BamHI-PstI sites of the polylinker of pQE30. Expression of the cloned gene in the producer strain *E. coli* JM103pNanH occurs under the control of T5 promoter after isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) induction. The strain shows neuraminidase activity. The recombinant NanH protein is accumulated in the producer's cells in two forms. The first form, with molecular mass (MM) of 89.5 kDa, is an unprocessed protein with the hexahistidine block (6His-tag) at its N-terminus, it is located in inclusion bodies. Its percentage is 5.6–6.6 % of the total cell proteins. The second one, with MM of 83 kDa, is found in the periplasmic space and corresponds to the mature NanH, its percentage being 3.4–3.8 %. The total percentage of both forms is 9–10 % of total cell proteins, which allows to consider the strain *E. coli* JM103pNanH to be a super-producer of the required protein. The strain may be used for purification of NanH preparations for construction of specific diagnostic, therapeutic and pharmaceutical preparations as well as for investigation of the protein as a virulence/persistence factor of the pathogen.

Key words: *Vibrio cholerae* neuraminidase, gene cloning, recombinant plasmid, expression in *Escherichia coli*.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Elena V. Monakhova, e-mail: monakhova_ev@antiplague.ru.

Citation: Monakhova E.V., Demidova G.V., Pisanov R.V., Duvanova O.V., Mishan'kin B.N. Recombinant *Escherichia coli* Strain with Enhanced Production of *Vibrio cholerae* Neuraminidase. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 2:87–92. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-87-92

Received 26.02.19. Accepted 28.02.19.

Нейраминидаза (NanH) является одним из немаловажных факторов патогенности/персистенции холерных вибрионов, повышающим чувствительность клеток кишечника к действию холерного токсина, а также участвующим в утилизации ганглиозидов высшего порядка в качестве источников питания. Не исключено, что продукция NanH может играть определенную роль в развитии легкой формы инфекции или кратковременного вибриононосительства [1–3]. Однако ее роль в патогенезе холеры и биологии возбудителя остается не до конца изученной. Это обуславливает актуальность проведения дальнейших исследований свойств данного фактора, что требует наличия его препаратов.

Препараты NanH также широко используются в биохимических и медицинских исследованиях, в фармацевтической промышленности [4]. Показана перспективность их применения для создания новых пероральных средств лечения аллергических заболеваний [5]. В опытах на крысах установлено, что интратекальное введение препарата NanH значительно ускоряет лечение травм спинного мозга, не оказывая на организм побочных токсических эффектов [6, 7].

Коммерческие препараты нейраминидазы *V. cholerae*, производимые зарубежными компаниями (Sigma-Aldrich, Roche), отличаются высокой стоимостью (более 25 тыс. рублей за 1,5 U). Для их производства используют токсигенные штаммы холерных вибрионов, что требует соблюдения режима работы с возбудителями особо опасных инфекций. Согласно данным G. Taylor *et al.* [8], выход продукта составляет около 1 мг/л культуральной жидкости. Недавно болгарские исследователи предложили более эффективный продуцент – нетоксигенный штамм *V. cholerae* nonO1/nonO139 V13 [4], перспективный для использования в промышленных масштабах, выход очищенного белка составляет ~2 мг/л культуральной жидкости.

Наиболее эффективным способом получения этого фактора в препаративных количествах представляется использование лабораторных штаммов *E. coli*, содержащих и экспрессирующих клонированный ген *nanH*. Ранее нами сконструирован такой штамм – *E. coli* HB101pRD39, содержащий в составе рекомбинантной плазмиды фрагмент ДНК *V. cholerae* длиной ~7,3 т.п.н. с геном *nanH*, экспрессирующимся под контролем собственного промотора [9]. Однако на сегодняшний день выход искомого продукта представляется недостаточным для выделения его в препаративных количествах. Кроме того, параллельно с NanH, возможно, происходит синтез нецелевых продуктов некоторых, либо всех шести, дополнительных интактных генов, также входящих в состав клонированного фрагмента, что затрудняет выделение и очистку препарата. Плазида pCVD364, сконструированная ранее E.R. Vimr *et al.* [10], содержала функционально активный ген *nanH* в составе клонированного фрагмента ДНК длиной 4,8 т.п.н. Активность продукта в экстрактах клеток несущего эту плазмиду штамма *E. coli* HB101 составила

858 U/мг общего белка. Авторам удалось выделить из этих экстрактов очищенный препарат, однако сведения о количестве использованной биомассы и выходе продукта не приведены ни в упомянутой [10], ни в последующей публикации [8]. В дальнейшем I. Moustafa *et al.* [11] пытались использовать эту плазмиду для получения препарата, но выход продукта был слишком низким, в связи с чем авторы клонировали участок встроенного в нее гена без последовательности, кодирующей сигнальный пептид, в составе вектора pET30b(+). Трансформированный полученной рекомбинантной плазмидой штамм *E. coli* BL21(DE3) при индукции изопропил-β-D-тиогалактозидом (ИПТГ) накапливал NanH в цитоплазме, однако наращивание биомассы занимало около суток. Продуктивность рекомбинантного штамма, определенная позднее другими авторами [6], составляла не менее 500 U/л культуры. Обеими группами авторов получение препарата осуществлялось для достижения собственных научных целей, и в литературе больше не появлялось сообщений о дальнейшем применении продуцента. В распоряжении отечественных исследователей аналогичные продуценты отсутствуют.

Целью настоящей работы явилось клонирование гена *nanH* в составе плазмидного вектора pQE30, обеспечивающего экспрессию чужеродных генов под контролем мощного T5-промотора, и создание штамма *E. coli* – продуцента рекомбинантного белка NanH *V. cholerae*.

Материалы и методы

В качестве донора ДНК для амплификации гена использован штамм *V. cholerae* Эль Тор P-5879 (Инаба), выделенный в 1972 г. в Таганроге (Ростовская область) из содержимого кишечника трупа холерного больного; в качестве реципиентов рекомбинантных плазмид – *E. coli* Jm103 и M15[pREP4]. Штаммы хранились в лиофилизированном состоянии в Музее живых культур с Центром патогенных для человека вибрионов Ростовского-на-Дону противочумного института. Векторной плазмидой служила pQE30 (QIAGEN), обеспечивающая контролируемую экспрессию клонированного гена.

Штамм *V. cholerae* выращивали на агаре Мартена, кишечной палочки – на плотной и жидкой среде LB. Для культивирования рекомбинантных штаммов *E. coli* в среды добавляли 50 мкг/мл ампициллина и 0,5 % глюкозы, для наращивания биомассы в целях наработки искомого продукта – только ампициллин без глюкозы.

Геномную ДНК выделяли с помощью комплекта реагентов «Проба-НК» (ДНК-Технология, Россия), плазмидную – методом Бирнбойма как описано ранее [12].

Ген *nanH* идентифицировали с помощью программы BLASTN 2.2.29 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) в черновом полном геноме *V. cholerae* P-5879, сек-

Праймеры, использованные в работе
Primers used in this work

Праймеры / Primers	Нуклеотидная последовательность 5'-3' / Nucleotide sequence 5'-3'	t° отжига / annealing t°, °C	Длина ампликона, п.н. / Amplicon length, bps
<i>nanH</i> -clon-F <i>nanH</i> -clon-R	GTCAG GGATCC ATGACTTCACAACGAAGAAG* CCTG CTGCAG CAGGGCATGCTTCCATTGTT*	60	2484
<i>nanH</i> -detect-F <i>nanH</i> -detect-R	TTGCAATGTTCCGGTATGGCGA CACGATAAGCGGCGACACCAT	58	585

*В праймерах для клонирования выделены жирным шрифтом и подчеркнуты сайты эндонуклеаз рестрикции – соответственно BamHI и PstI.

*Primers for cloning include sites for endonuclease restriction, correspondingly BamHI and PstI (printed in bold and underlined).

венированном нами на платформе MiSeq (Illumina, США) согласно прилагаемому протоколу.

Праймеры для клонирования и детекции гена *nanH* конструировали с помощью Vector NTI Advance 11 (Invitrogen), их нуклеотидные последовательности приведены в таблице. Синтез праймеров выполнен ОАО «Евроген» (Россия). Амплификацию искомого фрагмента осуществляли с использованием Taq-полимеразы, буфера и смеси dNTP производства Thermo Scientific (США) на программируемом термостате «Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Россия).

Фрагмент и вектор гидролизовали эндонуклеазами рестрикции BamHI и PstI и лигировали T4-ДНК-лигазой (Thermo Scientific, США) в прилагаемых буферах согласно рекомендациям изготовителя. Лигазными смесями трансформировали компетентные клетки *E. coli* Jm103, приготовленные накануне с обработкой хлористым кальцием. После стандартной процедуры трансформации (0 °C – 40 мин, 42 °C – 2 мин, 0 °C – 5 мин) клетки разводили в 10 раз средой LB с 0,5 % глюкозы, подрачивали в течение 1 ч и высевали на агар LB, содержащий 50 мкг/мл ампициллина и 0,5 % глюкозы. Посевы инкубировали при 37 °C и на следующие сутки отбирали ампициллинрезистентные колонии. Наличие вставки искомого гена определяли в ПЦР с помощью специфических праймеров для его детекции (таблица), а затем подтверждали рестрикцией рекомбинантной плазмиды указанными эндонуклеазами с последующим электрофорезом в 0,9 % агарозном геле.

Для отбора рекомбинантных клонов кишечной палочки, экспрессирующих клонированный ген, их выращивали в жидкой среде LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, с шуттелированием в течение 4 ч, затем добавляли индуктор ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и продолжали шуттелирование в течение еще 1,5 ч. Для определения нейраминидазной активности 20 мкл каждой культуры смешивали на стекле с равным объемом раствора (1 мг/мл) 4-метилумбеллиферил-N-ацетилнейраминаминовой кислоты (Sigma-Aldrich, Германия) и спустя 20 мин просматривали в ультрафиолетовом (УФ) свете. Положительные результаты учитывали по наличию флуоресценции [13].

Для оценки уровней экспрессии клонированных генов в двух разных штаммах *E. coli*, трансформиро-

ванных рекомбинантными плазмидами, их выращивали как описано выше. Затем клетки осаждали центрифугированием, растворяли осадок в лизис-буфере при 100 °C и подвергали SDS-электрофорезу в 10 % полиакриламидном геле (ПААГ). Процентное содержание искомого продукта относительно суммарных клеточных белков оценивали с помощью программы Quantity One 4.6. Для определения локализации рекомбинантного белка клетки продуцентов разрушали ультразвуком на дезинтергаторе Q700 (QSonica, США) в течение 10 мин (40 импульсов по 5 сек, 357 Дж с перерывами в 10 сек; амплитуда 50) и подвергали электрофорезу растворимую и нерастворимую фракции клеток, разделенные центрифугированием.

Результаты и обсуждение

Ген *nanH* штамма *V. cholerae* P-5879 оказался на 100 % идентичным таковому референс-штамму *V. cholerae* N16961 (VC1784 в составе его большой хромосомы, AE003852). Специфические праймеры для ПЦР-синтеза гена сконструированы на основе анализа содержащей его нуклеотидной последовательности, депонированной нами в NCBI под номером KU215667. На 5'-конце они содержали сайты эндонуклеаз, образующих липкие концы: BamHI для прямого праймера и PstI – для обратного в соответствии с порядком расположения сайтов рестрикции в полилинкере векторной плазмиды pQE30, с целью встраивания ампликона в вектор в ориентации, обеспечивающей направление транскрипции под контролем T5-промотора.

Полученный ПЦР-ампликон длиной 2484 п.н. и плазида pQE30 обработаны указанными эндонуклеазами и лигированы, как описано в разделе «Материалы и методы». Схема конструирования рекомбинантной плазмиды, обозначенной как pNanH, показана на рис. 1. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* Jm103. Тестирование рекомбинантных клонов, отобранных по результатам ПЦР с праймерами для детекции искомого гена, по фенотипу позволило выявить реально способные к его экспрессии по наличию флуоресценции в УФ свете, отсутствующей у контрольного штамма (рис. 2).

Наличие вставки гена в pNanH, выделенной из штамма *E. coli* Jm103, подтверждено рестрик-

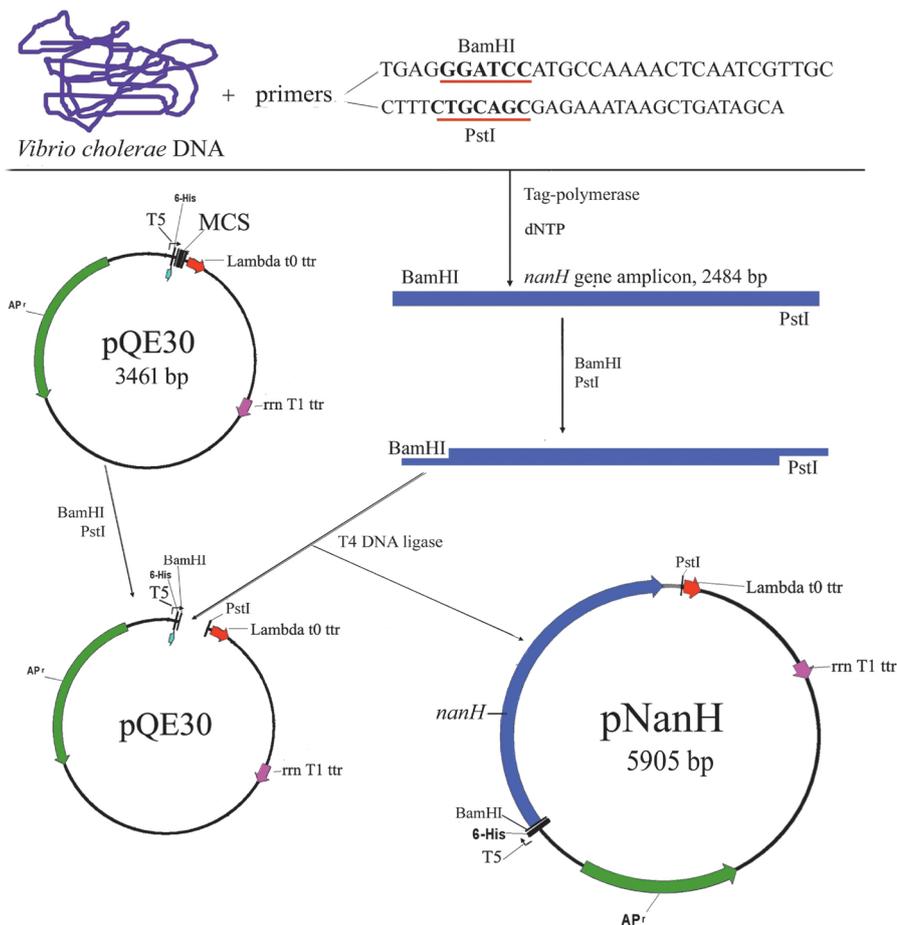


Рис. 1. Схема конструирования рекомбинантной плазмиды pNanH

Fig. 1. The scheme of recombinant plasmid pNanH construction

цией BamHI-PstI с последующим электрофорезом (рис. 3). Плазмида дополнительно трансформирована в штамм *E. coli* M15[pREP4].

Результаты SDS-электрофореза лизатов клеток штаммов *E. coli* Jm103pNanH и M15[pREP4]pNanH, выращенных с индукцией ИПТГ, показали, что значительное увеличение количества белков с ММ ~83 и ~89,5 кДа (что соответствовало ММ двух форм

NanH) наблюдалось только в лизате клеток *E. coli* Jm103pNanH, в отличие от лизатов M15[pREP4]pNanH и обоих контрольных штаммов, содержащих векторную плазмиду без вставки (рис. 4А). Данные результаты стали неожиданными, поскольку сконструированная нами ранее аналогичная плазмида pHlyA, напротив, намного эффективнее экспрессировала клонированный в ее составе ген гемолизина *V. cholerae* в штамме M15[pREP4], чем в Jm103 [14], и именно M15[pREP4] рекомендован QIAGEN

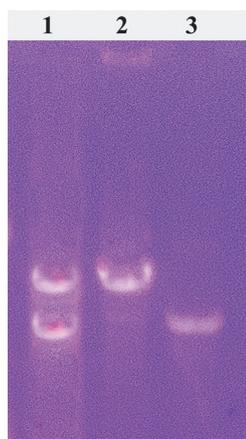


Рис. 2. Электрофорез в агарозном геле BamHI-PstI-рестрикта pNanH (дорожка 1) в сравнении с линейной формой вектора pQE30 (дорожка 2) и ПЦР-ампликоном гена nanH *V. cholerae* P-5879 (дорожка 3)

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of BamHI-PstI restrict of pNanH (lane 1) as compared to the linear form of the pQE30 vector (lane 2) and PCR-amplified nanH gene (lane 3)

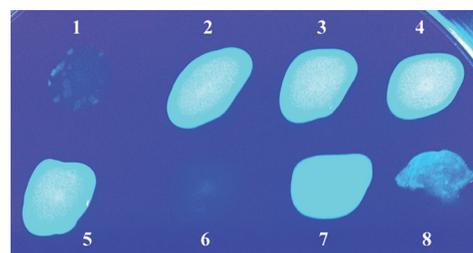


Рис. 3. Продукция NanH рекомбинантными клонами *E. coli* Jm103pNanH: флуоресценция в УФ свете после инкубации с субстратом:

1 – контрольный штамм *E. coli* Jm103, содержащий векторную плазмиду pQE30 без вставки, 2–5, 7 – NanH-позитивные клоны, 6 – NanH-негативный клон, 8 – *V. cholerae* P-5879

Fig. 3. Production of NanH by recombinant clones of *E. coli* Jm103pNanH: fluorescence in UV light after incubation with substrate:

1 – control strain *E. coli* Jm103 carrying vector plasmid pQE30 without insertion, 2–5, 7 – NanH-positive clones, 6 – NanH-negative clone, 8 – *V. cholerae* P-5879

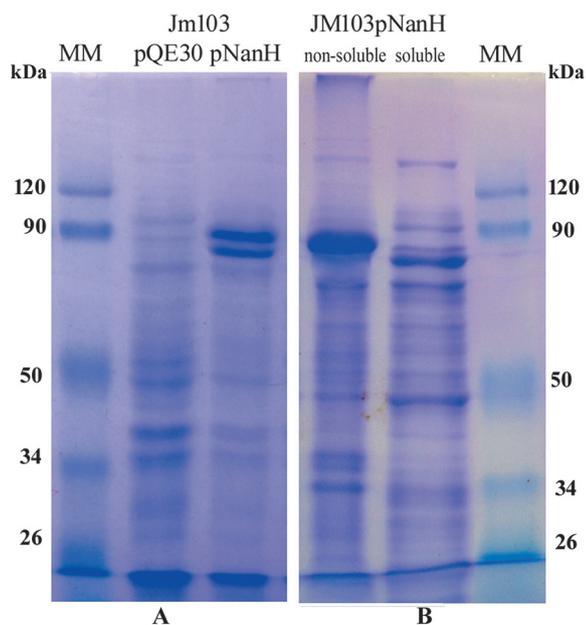


Рис. 4. Продукция NanH рекомбинантными штаммами *E. coli*, выращенными с индукцией ИПТГ (SDS-электрофорез в 10 % ПААГ):

A – лизаты целых клеток, **B** – нерастворимая (non-soluble) и растворимая (soluble) фракции ультразвуковых дезинтеграторов Jm103pNanH

Fig. 4. Production of NanH by recombinant *E. coli* strains grown with IPTG induction (SDS electrophoresis in 10 % PAAG):

A – lisates of whole cells, **B** – non-soluble and soluble fractions of sonicated Jm103pNanH cells

как один их лучших штаммов для экспрессии генов, клонированных в составе pQE30 (<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=79ca2f7d-42fe-4d62-8676-4cfa948c9435&lang=en>). Тем не менее, на основе наших результатов в качестве продуцента выбран штамм Jm103pNanH. По данным программы Quantity One, общее содержание двух форм NanH в лизате его клеток составляло приблизительно 9–10 % суммарных клеточных белков. Для определения локализации рекомбинантного белка клетки этого штамма разрушали ультразвуком и подвергали электрофорезу растворимую и нерастворимую фракции клеток. Оказалось, что продукт действительно накапливается в двух формах (рис. 4B). Первая представляет собой непротессированный белок с гексагистициновым блоком (6His-tag) на N-конце, имеющий ММ ~89,5 кДа, и остается в нерастворимой фракции клеток в виде телец включения. Ее содержание составляет 5,6–6,6 % суммарных клеточных белков. Вторая обнаруживается в основном в растворимой фракции, т.е., по-видимому, в периплазматическом пространстве клеток. Ее ММ ~83 кДа соответствует зрелой форме NanH, образующейся вследствие удаления сигнальной последовательности вместе с 6His-tag, общей длиной 58 аминокислотных остатков. Содержание зрелой формы составило 3,4–3,8 % суммарных белков. Это согласуется с данными E.R. Vimr *et al.* [10], которые показали, что в рекомбинантном штамме *E. coli* HB101 транспорт продукта клонированного гена *nanH* в периплазму сопровождается отщеплением сигнального пептида.

Таким образом, нами сконструирован штамм *E. coli* Jm103pNanH – суперпродуцент нейраминидазы *V. cholerae* Эль Тор, который может быть использован для выделения целевого продукта в препаративных количествах. По предварительным расчетам, выход NanH должен составить ~1,5–2 мг/г сырой биомассы (что соответствует 400 мл культуры продуцента, выращенной с индукцией в жидкой среде LB, т.е. ~3,5 мг/л). В зависимости от дальнейших задач можно получать из биомассы исходный продукт (6His-NanH) из телец включения с помощью специфического сорбента типа Ni-NTA (никель-нитрилацетиленированной) сефарозы либо зрелый белок NanH из осветленных ультразвуковыми дезинтеграторов клеток с использованием других методов очистки.

Преимуществами полученного продуцента, по сравнению с холерными вибрионами, является высокий выход искомого белка, возможность культивирования без соблюдения режима работы с возбудителями особо опасных инфекций, отсутствие способности к синтезу каких-либо дополнительных биологически активных субстанций, которые могли бы затруднить его выделение и очистку, а по сравнению с известными рекомбинантными штаммами-продуцентами – непродолжительный период наращивания биомассы (около 5 ч включая индукцию), что обеспечивает возможность ускоренного получения препарата.

Штамм депонирован в Государственной Коллекции Патогенных Бактерий «Микроб» (Саратов) под номером КМ 2047.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Galen J.E., Ketley J.M., Fasano A., Richardson S.N., Wasserman S.S., Kaper J.B. Role of *Vibrio cholerae* neuraminidase in the function of cholera toxin. *Infect. Immun.* 1992; 60(2):406–15. PMID: 1730470. PMCID: PMC257643.
2. Jermyn W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology.* 2002; 148(Pt 11):3681–93. DOI: 10.1099/0021287-148-11-3681.
3. Figueiredo S.C., Neves-Borges A.C., Coelho A. The neuraminidase gene is present in the non-toxigenic *Vibrio cholerae* Amazonia strain: a different allele in comparison to the pandemic strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2005; 100(6):563–9. DOI: 10.1590/S0074-02762005000600010.
4. Eneva R.T., Engibarov S.A., Petrova P., Abrashev R., Strateva T., Kolyovska V., Abrashev J. High production of neuraminidase by a *Vibrio cholerae* non-O1 strain – the first possible alternative to toxigenic producers. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2015; 176(2):412–27. DOI: 10.1007/s12010-015-1584-4.
5. Diesner S.C., Bergmayr C., Wang X.Y., Heiden D., Exenberger S., Roth-Walter F., Starkl P., Ret D., Palischoll J., Gabor F., Untermayr E. Characterisation of *Vibrio cholerae* neuraminidase as an immunomodulator for novel formulation of oral allergy immunotherapy. *Clin. Immunol.* 2018; 192:30–9. DOI: 10.1016/j.clim.2018.03.017.
6. Mountney A., Zahner M.R., Lorenzini I., Oudega M., Schramm L.P., Schnaar R.L. Sialidase enhances recovery from spinal cord contusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107(25):11561–6. DOI: 10.1073/pnas.1006683107.
7. Mountney A., Zahner M.R., Sturgill E.R., Riley C.J., Aston J.W., Oudega M., Schramm L.P., Hurtado A., Schnaar R.L. Sialidase, chondroitinase ABC, and combination therapy after spinal cord contusion injury. *J. Neurotrauma.* 2013; 30(3):181–90. DOI: 10.1089/neu.2012.2353.

