

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ *E. COLI*, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИЕ ГЕНЫ СОМАТОЛИБЕРИНА КУРИЦЫ И СВИНЬИ

<sup>1,2</sup>Эпова Е.Ю., <sup>3</sup>Смирнова М.С., <sup>2,3,4</sup>Шевелев А.Б., <sup>4</sup>Тремасов М.Я.,  
<sup>1</sup>Алёшин В.В., <sup>2</sup>Маракасова Е.С., <sup>3,4,\*</sup>Плаксина А.Г., <sup>2,4</sup>Осипенкова О.В.,  
<sup>3</sup>Баловнева М.В., <sup>4</sup>Шибяева А.В., <sup>4</sup>Папуниди К.Х., <sup>1</sup>Тараканов Б.В.

<sup>1</sup>ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии,  
биохимии и питания сельскохозяйственных животных РАСХН»,

Боровск, e-mail: ru.science@mail.ru;

<sup>2</sup>ФГОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины  
и биотехнологии им. К.И. Скрябина», Москва;

<sup>3</sup>Учреждение РАМН «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов  
им. М.П. Чумакова РАМН», Московская обл.;

<sup>4</sup>ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной  
безопасности животных», Казань

В статье приведены результаты по созданию и испытанию биологической активности модельных штаммов *E. coli*, экспрессирующих полусинтетические гены соматолиберина курицы и свиньи. Отличием испытанных штаммов от ранее описанных аналогов является то, что ген предшественника соматолиберина разделен на фрагменты, кодирующие истинные пептидные гормоны GHRH и PACAP. Таким образом, впервые получены данные о физиологическом действии этих гормонов на животных моделях при пероральной доставке. Впервые показана возможность тестирования GHRH курицы на модели мышат.

**Ключевые слова:** соматолиберин, *E. coli*, GHRH, PACAP

Выполняемый проект направлен на конструирование и испытание рекомбинантных пробиотических штаммов, позволяющих в пероральной форме доставлять в организм сельскохозяйственных животных белковые продукты пептидные гормоны. Соматолиберин является одним из наиболее перспективных биоактивных пептидов для пероральной доставки, так как обладает высокой устойчивостью к протеолизу. Кроме того, низкие по сравнению с соматотропином (GH) и инсулиноподобным фактором роста (IGF) действующие концентрации соматолиберина [7] позволяют получать физиологический эффект, несмотря на невысокую эффективность проникновения из просвета кишечника в кровоток. Существуют опубликованные данные о возможности повышения скорости привеса животных за счет перорального введения соматолиберина [7].

Однако практическое применение соматолиберина для создания рекомбинантных пробиотических штаммов, повышающих скорость роста животных, сдерживается недостаточностью знаний о физиологическом действии этого гормона. На различных моделях показано, что максимальная эффективность действия соматолиберина достигается лишь в присутствии агониста – аденилатциклаза-активирующего пептида (PACAP) [4]. В геноме млекопитающих ген PACAP существует независимо от гена соматолиберина (GHRH). Однако у других позвоночных, в том числе птиц, рептилий и рыб, оба гормона синтезируются в виде общего предшественника, который подвергается расщеплению на два пептида в процессе созревания в секреторном аппарате клеток гипофиза [5]. Поскольку в большинстве работ по физиологии сомато-

либерина использовались химически синтезированные пептиды, до настоящего времени не опубликовано данных об испытаниях физиологического эффекта сочетанного действия GHRH и PACAP. Задача исследования физиологической активности GHRH дополнительно, осложняется наличием у него альтернативных сплайсоформ – продуктов альтернативного сплайсинга первичного транскрипта. В частности, GHRH курицы представлен тремя сплайсоформами, состоящими из 46, 43 и 23 а.о. соответственно [4].

Между тем, задача конструирования гена соматолиберина курицы, оптимального для рекомбинантной экспрессии в клетках пробиотиков, ставит вопрос о целесообразности сохранения или удаления той части природной последовательности ДНК, которая кодирует пептид PACAP.

**Целью** настоящей работы являлось создание производных гена соматолиберина курицы, кодирующих зрелую последовательность GHRH («длинная» сплайсоформа, состоящая из 46 а.о.) и PACAP, на основе которых были созданы конструкции, обеспечивающие экспрессию в клетках *E. coli*. Биомасса этих штаммов порознь и в смеси друг с другом исследовалась на способность ускорять рост модельных животных.

**Материалы  
и методы исследования**

Было получено и испытано 8 штаммов *E. coli*. Штаммы получены путем введения четырех экспрессионных конструкций, включая интактный вектор pQE30, (табл. 1) в два различных базовых штамма *E. coli* – C41(DE3) и TG1.

**Таблица 1**

Экспрессионные конструкции, предназначенные для продукции производных соматолиберина свиньи и курицы, в клетках *E. coli*

№ п/п	Описание рекомбинантного продукта	Название конструкции
1	Соматолиберин свиньи	pQE-SLN-Le1
2	Соматолиберин курицы	pQE-SLN-Ch1
3	Аденилат-циклаза-активирующий пептид курицы	pQE-SLN-PACAP
4	Интактный вектор	pQE30

Штаммы селектировали в момент проведения трансформации и в дальнейшем поддерживали на чашках Петри с агаризованной средой или жидкой среде LB (10 г/л пептона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl), содержащей 100 мкг/мл ампициллина, при 37°C. При поддержании на плотной среде пересев проводится не реже 1 раза в неделю. Для получения биомассы штаммы культивировали в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, содержащих по 50 мл среды, в течение 14–16 часов при интенсивной аэрации ( $\geq 250$  rpm). Полученную таким образом биомассу собирали низкоскоростным центрифугированием, промывали физиологическим раствором (150 mM NaCl) и суспендировали в мини-

мальном объеме физиологического раствора с целью создания концентрации бактериальных клеток не ниже  $10^{10}$  КОЕ/мл.

Биологические испытания проводились на белых беспородных мышах возрастом 3–4 недели. Мыши содержались на полноценном белково-витаминном корме в условиях, обеспечивающих максимальную скорость роста. Испытуемый препарат пробиотического штамма вносился в корм 1 раз в сутки в течение всего времени проведения испытаний – 20 дней.

Для проведения испытаний каждого штамма выделялась выборка из 40 мышат возрастом 4 недели, которая разбивалась на две подвыборки. Подвыборка 1 получала  $10^7$  КОЕ в сутки, подвыборка 2 –  $10^6$  КОЕ в

сутки. В качестве контрольной группы выступала выборка из 20 мышей, не получающая пробиотика.

Взвешивание каждой выборки животных проводилось ежедневно в одно и то же время (вся выборка одновременно). Общая длительность эксперимента составила 21 день.

### Результаты исследования и их обсуждение

Получение экспрессионных конструкций.

С помощью ПЦР из генома курицы было клонировано два экзона гена соматолиберина, которые затем были слиты и

введены в состав вектора pQE30. В качестве источника гена была выбрана геномная ДНК курицы, выделенная из мышечной ткани методом фенольной экстракции как описано ранее [3, 6]. Основываясь на известной интрон-экзонной организации гена соматолиберина курицы (рис. 1) [4], были сконструированы две пары праймеров SLN1-SLN2 и SLN3-SLN4. Праймеры позволяли получить ген соматолиберина, кодирующий полноразмерный зрелый гормон без пропептида и секреторного лидера, соответствующий сплайсоформе I первичного транскрипта («длинная» сплайсоформа, состоящая из 46 а.о.).

```
taccgcagct ggaggaggag gtatacgcagc aggacgggaa taccctacag gacttcgcac
      L E E E V Y D E D G N T L Q D F A
tacgagcagg agcccctggg ggtggcgggc cgcgcccgcg ctggggcagg tgtacggcgc
L R A G A P G G G G P R P R W G R C T A
tgtactaccc gccgggaaag aggtgacaga ggggcccgcg atagggcccg ggggggaggg
L Y Y P P G K R
ggggaatggg aaacctaaag gccccgggg gaggccggga aatatcgtaa ttccgcccc
cctgggctgc gcgagcgggg gaggggggtg gggaggagg gcgcctcggg gatgggcgct
Primer SLN1 GGGGATCCcaccgccgat gggatcttca gc
gacgggcccgt gccccggcag gcacgccgat gggatcttca gcaaagccta caggaaactc
      H A D G I F S K A Y R K L
      Праймер SLN2 ccctga tggcTaagcg ggtcggg
ctgggccagc tgtccgcaag aaattacctg cactccctga tggccaagcg ggtcgggtaa
L G Q L S A R N Y L H S L M A K R V G
gggctgcggc gggacgggag cgaacaaagc gcggcgcgcg gcggccgggg cggggccgcc
cattctcccc gcggtgctct gccggaacga gagaggcggc cgcacccggg gctcggcgctc
cctcccgcgg ggcagccccg ggtggtgcca tcggagcga acccccccgg gaacgcgatg
cataatgcat gggggggggg gggggagacg tctcgctccg gcccggcccc gccctttgtc
tgccgggaga tgccggggccg gggcgggggt tagggccggg gttgggggtt gggttgggtt
agggccgggt tgggtcgggc ccgggagggc cctcctgat ggttgtgtcc ttctcggtgc
tgatggcTaagcgggtcggggg tgccagcagc ggcctgggg Праймер SLN3
tttgacgcgg tgccagcagc ggcctggggg acgaggcggg accgctcagc aagcgcacaca
      G A S S G L G D E A E P L S K R H
tagacggcat cttcacggac agctacagcc gctaccggaa acaaatggct gtcaagaat
I D G I F T D S Y S R Y R K Q M A V K K
acttagcggc cgtcctgggg aaaaggata aacaaagagt taanaacaaa ggacgcccgag
Y L A A V L G K R Y K Q R V K N K G R R
      caaccgccgc tgccgtgcgt agtcGACCC Праймер SLN4
tagcgtattt gtaggatgag caaccgccgc tgccgtgcgt agtcctgaga gagagagaga
V A Y L
```

Рис. 1. Экзонная организация гена соматолиберина в геноме курицы *Gallus gallus* по [4] и стратегия получения полусинтетического искусственного гена с помощью ПЦР. Последовательности экзонов сплайсоформы I выделены серым

С помощью пары праймеров SLN1 + SLN2 на матрице геномной ДНК курицы бы получен размер продукта

103 п.н., соответствующий II экзону гена соматолиберина, а с помощью пары праймеров SLN3 + SLN4 – продукт размером

238 п.н., соответствующий III экзону того же гена. На 5'-конец праймера SLN3 была введена последовательность из 20 нуклеотидов, комплементарная праймеру SLN2, что позволяло продуктам ПЦР, полученным с использованием праймеров SLN2 и SLN3, взаимно отжигаться друг с другом. Кроме того, в составе праймеров SLN2 и SLN3 была введена транзигия С/Т, не вызывающая аминокислотных замен, но позволяющая уничтожить сайт рестриктазы BamI (TGGCCA).

Продукты ПЦР были очищены элюцией из агарозного геля, объединены и использованы в качестве матрицы для проведения ПЦР с праймерами SLN1 + SLN4. В результате был получен продукт размером 321 п.н.. После элюции из агарозного геля он был обработан рестриктазами BamHI и SalI и клонирован в вектор pQE30 (Qiagen), предварительно расщепленный

по сайтам BamHI и SalI. В итоге была отобрана конструкция pQE-SLN1, содержащая ген полноразмерного зрелого соматолиберина.

Эта конструкция послужила в качестве исходной для получения искусственных генов, кодирующих производные предшественника соматолиберина – пептиды GHRH и PACAP. С этой целью на матрице pQE-SLN1 был проведен ПЦР с праймерами SLN1/SLN102 (размер продукта 156 п.н.) и праймерами SLN101/SLN4 (размер продукта 179 п.н.). После элюции из агарозного геля эти продукты были обработаны рестриктазами BamHI и SalI и клонированы в вектор pQE30 (Qiagen), предварительно расщепленный по сайтам BamHI и SalI. В итоге были отобраны конструкции pQE-SLN-Ch1, содержащая ген пептида GHRH (рис. 2), и pQE-SLN-PACAP, содержащая ген пептида PACAP (рис. 3).

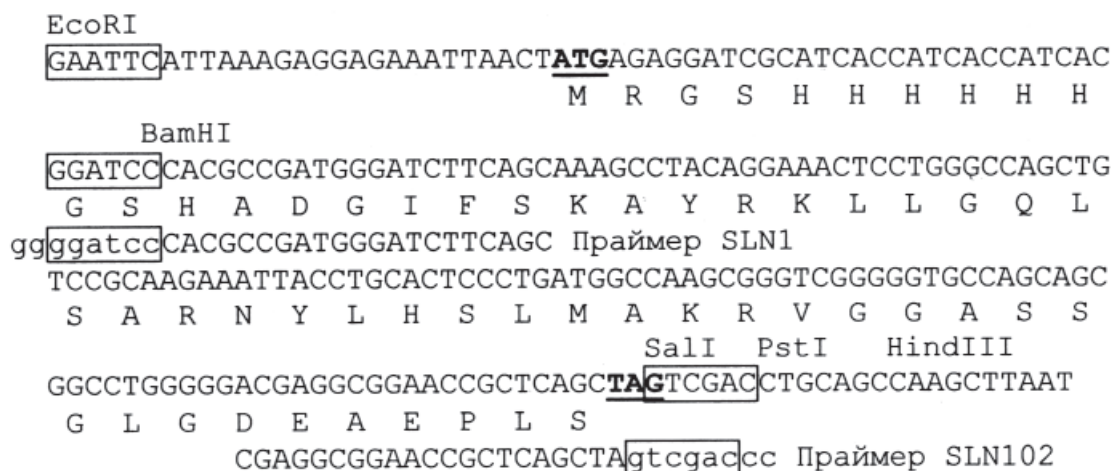


Рис. 2. Последовательность гена пептидного гормона GHRH соматолиберина курицы в составе конструкции pQE-SLN-Ch1. **Рамками** показаны сайты клонирования BamHI и SalI, серым – нуклеотиды кДНК пептида GHRH, **жирным-подчеркнутым шрифтом** – стартовый и стоп-кодона искусственного гена. В составе олигонуклеотидных праймеров ПРОПИСНЫМИ БУКВАМИ показаны нуклеотиды, соответствующие последовательности гена соматолиберина, строчными – дополнительные нуклеотиды, необходимые для введения сайтов клонирования

Наряду с генами производных соматолиберина курицы в рамках проекта был синтезирован ген GHRH свиньи. Его использование наряду с генами кури-

цы облегчает проведение биологических испытаний рекомбинантных штаммов-пробиотиков на животных моделях благодаря возможности парного сравнения

эффектов штаммов с различными вариантами пептидных гормонов.

До настоящего времени в литературе не опубликована последовательность кДНК или геномного гена соматолиберина свиньи. Но в работе [1] методом секвенирования пептидов по Эдману была установлена последовательность зрелого GHRH этого

млекопитающего. Сопоставление данных работы [1] с последовательностью геномного гена соматолиберина человека [2] позволило установить полную идентичность их белковых продуктов. Таким образом, экспрессия ген человеческого происхождения обеспечивала возможность синтеза GHRH свиньи.

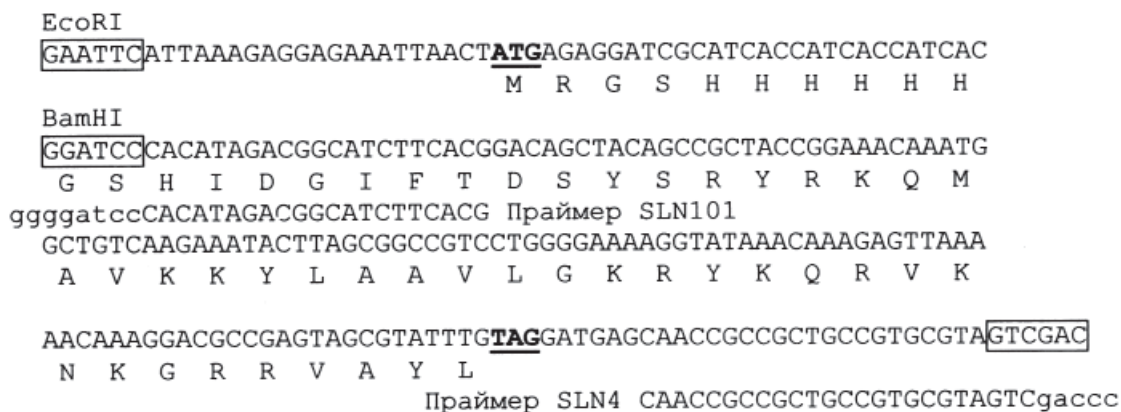


Рис. 3. Последовательность гена пептидного гормона PACAP соматолиберина курицы в составе конструкции pQE-SLN-PACAP. Рамками показаны сайты клонирования BamHI и SalI, серым – нуклеотиды кДНК пептида PACAP, **жирным-подчеркнутым шрифтом** – стартовый и стоп-кодоны искусственного гена. В составе олигонуклеотидных праймеров ПРОПИСНЫМИ БУКВАМИ показаны нуклеотиды, соответствующие последовательности гена соматолиберина, строчными – дополнительные нуклеотиды, необходимые для введения сайтов клонирования

С этой целью на матрице геномной ДНК человека был проведен ПЦР с праймерами SLN-H1 и SLN-H2, в результате чего образовался продукт размером 112 п.н.. После элюции из агарозного геля продукт ПЦР был обработан рестриктазами BamHI и SalI и клонирован в вектор pQE30 (Qiagen), предварительно расщепленный по сайтам BamHI и SalI. В итоге была получена конструкция pQE-SLN-Le1, содержащая ген пептида GHRH свиньи (рис. 4).

Полученные конструкции pQE-SLN-Ch1, pQE-SLN-PACAP и pQE-SLN-Le1 были использованы для экспрессии в лабораторных условиях с целью препаративной наработки соматолиберина в виде биомассы *E. coli*.

### Биологические испытания рекомбинантных пробиотических штаммов *E. coli*

Результаты эксперимента по биологическому тестированию представлены в табл. 2.

Полученные результаты свидетельствуют о негативном влиянии реципиентного штамма TG1 на выживаемость и скорость привеса экспериментальных животных. Этот эффект наблюдается и в случае контрольного штамма, несущего нереконбинантный вектор pQE30. В связи с этим результаты о свойствах конструкций, полученные на модели штамма TG1, нельзя считать достоверными.

Напротив, штамм *E. coli* C41(DE3) сам по себе не оказывал существенного влияния на скорость роста мышей в пределах использованных концентраций клеток модельного пробиотика ( $10^6$ - $10^7$  кое в сутки). Среди испытанных конструкций, введенных в штамм

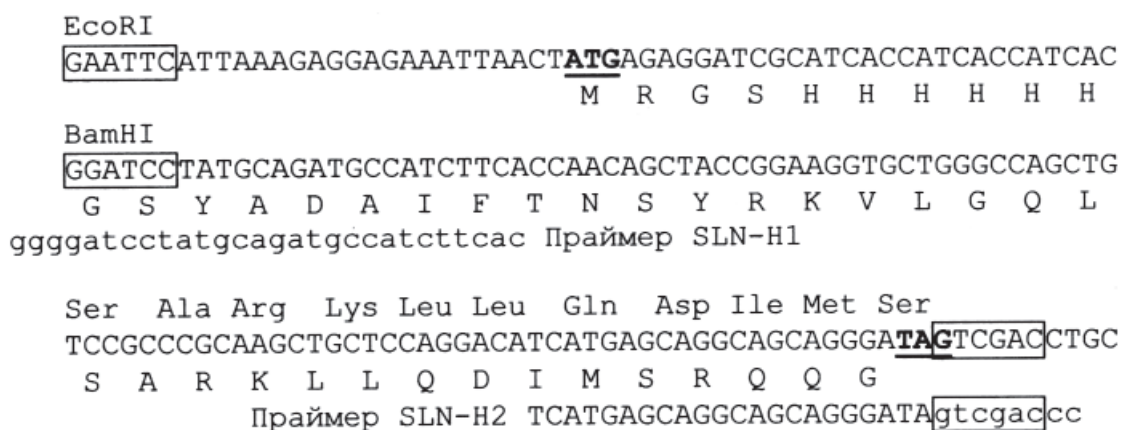


Рис. 4. Последовательность гена пептидного гормона GHRH соматолиберина свиньи в составе конструкции pQE-SLN-Le1. **Рамками** показаны сайты клонирования BamHI и Sall, серым – нуклеотиды ДНК пептида GHRH, **жирным-подчеркнутым шрифтом** – стартовый и стоп-кодона искусственного гена. В составе олигонуклеотидных праймеров ПРОПИСНЫМИ БУКВАМИ показаны нуклеотиды, соответствующие последовательности гена соматолиберина, строчными – дополнительные нуклеотиды, необходимые для введения сайтов клонирования

C41(DE3), наибольший положительный эффект проявила конструкция pQE-SLN-Ch1, несущая ген «длинной» сплайсоформы 1 GHRH курицы. Эффект имел дозозависимость: при нагрузке 10<sup>6</sup> скорость привеса увеличивалась на 9,5%, а при нагрузке 10<sup>7</sup> кое в сутки – на 15,1% по сравнению с

контролем. При этом разброс результатов в контрольных выборках не превышал 5%. При этом штаммы, несущие ген PACAP, а также ген GHRH свиньи достоверно не отличались по влиянию на скорость привеса мышей от контрольного штамма с нереконбинантным вектором pQE30.

Таблица 2

Результаты тестирования влияния перорального введения биомассы штаммов *E. coli*, несущих экспрессионные конструкции с генами соматолиберина свиньи и курицы, на скорость прироста массы мышат

Экспрессионная конструкция/штамм	TG1		C41(DE3)	
	10 <sup>6</sup> кое в сут	10 <sup>7</sup> кое в сут	10 <sup>6</sup> кое в сут	10 <sup>7</sup> кое в сут
pQE-SLN-Le1	149,3	135,6 <sup>1</sup>	159,1	165,1
pQE-SLN-Ch1	156,9	141,9	177,4	186,2
pQE-SLN-PACAP	151,7	136,6	165,8	162,3
pQE30	155,1	138,9 <sup>2</sup>	162,4	161,9

В столбцах дано название реципиентного штамма, несущего конструкции, и суточная дозировка рекомбинантного пробиотического штамма в расчете на одно животное. В ячейках таблицы дана суммарная масса выборки мышей на 21-й день эксперимента.

<sup>1</sup> Два животных из выборки погибло на 11 и 14 день эксперимента. Масса выборки рассчитана путем экстраполяции массы выживших животных на исходный состав выборки.

<sup>2</sup> Три животных из выборки погибло на 12, 13 и 15 день эксперимента. Масса выборки рассчитана путем экстраполяции массы выживших животных на исходный состав выборки.

**Заключение**

Полученные результаты убедительно свидетельствуют о возможности пероральной доставки пептидного гормона GHRH животным. При этом модель мышат обладает необходимой чувствительностью для изучения количественных и качественных характеристик соматолиберина курицы.

**Список литературы**

1. Bohlen P. Isolation and characterization of the porcine hypothalamic growth hormone releasing factor / P. Bohlen, F. Esch, P. Brazeau, N. Ling and R. Guillemin // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1983. – Vol. 116, № 2. – P. 726–734.
2. Cravador A. Total DNA synthesis and cloning in *Escherichia coli* of a gene coding for the human growth hormone releasing factor / A. Cravador, P. Jacobs, A. Van Elsen, C. Lacroix, B. Colau, P. Van Alphen, A. Herzog and A. Bollen // *Biochimie* – 1985. – Vol. 67, № 7-8. – P. 829–834.
3. Iwasaki Y. Characterization of the putative alpha subunit of a heterotrimeric G protein in rice / Iwasaki Y., Kato T., Kaidoh T., Ishikawa A., Asahi T. // *Plant Mol. Biol.* – 1997. – №4. – P. 563–72.
4. McRory G.E. Expression and Alternative Processing of a Chicken Gene Encoding Both Growth Hormone-Releasing Hormone and Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide /

G.E. McRory, R.L. Parker, N.M. Sherwood // *DNA AND CELL BIOLOGY.* – 1997. – Vol. 16, №1. – P. 95-102.

5. Montero M. Molecular evolution of the growth hormone-releasing hormone/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene family. Functional implication in the regulation of growth hormone secretion / M. Montero, L. Yon, S. Kikuyama, S. Dufour and H. Vaudry // *Journal of Molecular Endocrinology.* – 2000. – Vol. 25. – P. 157–168

6. Sambrook J. Molecular cloning / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis – Cold Spring Harbor Laboratory press. – New York, 1989.

7. Wang Y. Identification of the endogenous ligands for chicken growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor: evidence for a separate gene encoding GHRH in submammalian vertebrates / Y. Wang, J. Li, C.Y. Wang, A.H. Kwok and F.C. Leung // *Endocrinology.* – 2007. – Vol. 148, № 5. – P. 2405–2416.

**Рецензенты:**

Фаизов Тагир Хадиевич, д.б.н., зав. лабораторией молекулярно-генетического анализа ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиологической безопасности животных» Казань;

Ляпустин Виктор Николаевич, д.б.н., с.н.с., в.н.с. лаборатории молекулярной биологии, ИПВЭ им.М.П. Чумакова РАМН.

## BIOLOGICAL ACTIVITY OF E.COLI STRAINS EXPRESSING SEMI-SYNTHETIC GENES OF SOMATOLIBERIN OF CHICKEN AND PIG

<sup>1,2</sup>Епова Е.Ю., <sup>3</sup>Smirnova M.S., <sup>2,3,4</sup>Shevelev A.B., <sup>4</sup>Tremasov M.Ya.,  
<sup>1</sup>Aleshin V.V., <sup>2</sup>Marakasova E.S., <sup>3,4,\*</sup>Plaksina A.G., <sup>2,4</sup>Osipenkova O.V.,  
<sup>3</sup>Balovneva M.V., <sup>4</sup>Shibaeva A.V., <sup>4</sup>Papunidy K.H., <sup>1</sup>Tarakanov B.V.

<sup>1</sup>*All-Russian Research Institute of physiology, biochemistry and food of veterinary animals of RAVS, Borovsk; e-mail: ru.science@mail.ru;*

<sup>2</sup>*Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology by K.I. Skryabin, Moscow;*

<sup>3</sup>*Institute of poliomyelitis and virus encephalitis by M.P. Chumakov of RAMS, Moscow region;*

<sup>4</sup>*Federal Center for Toxicological and Radiation Safety of Animals, Kazan*

Creating and assessment of biological activity of model E. coli strains bearing semi-synthetic genes of chicken somatoliberin is reported. The examined strains differ from analogues in a gene arrangement. The full-length precursor gene has been divided in to portions encoding either GHRH or PACAP peptide hormones. Thus we first report data about biological activity of these hormones at an animal model when administrated per orem. We first report relevance of chicken GHRH assessment at murine model.

**Keywords: somatoliberin, E. coli, GHRH, PACAP**