

ПОЛУЧЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО МИОСТАТИНА ДЛЯ ИНДУЦИРОВАНИЯ СИНТЕЗА СПЕЦИФИЧЕСКИХ К МИОСТАТИНУ АУТОАНТИТЕЛ

Е.М. Колоскова*, В.А. Езерский, О.Б. Жукова

Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста» 249013, Российская Федерация, Калужская обл., Боровск, пос. Институт

Белок миостатин, относящийся к семейству ростовых факторов, является потенциальной мишенью для терапевтического воздействия при патологиях мышечной системы и интересен не только этим. Полиморфизмы гена миостатина, связанные с ограничением функциональной активности белка, полезны как генетические маркеры мясной продуктивности сельскохозяйственных животных. Блокирование действия миостатина у продуктивных животных может достигаться за счёт индукции синтеза специфических аутоантител при использовании рекомбинантного миостатина, обладающего достаточной иммуногенностью в отношении миостатина как антигена. Была создана генетическая конструкция и получен штамм-продуцент *E. coli* с высоким уровнем экспрессии рекомбинантного миостатина.

Ключевые слова: рекомбинантный миостатин, *Escherichia coli*, аутоантитела, ПААГ-электрофорез

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Колоскова Е.М., Езерский В.А., Жукова О.Б. Получение бактериального рекомбинантного миостатина для индуцирования синтеза специфических к миостатину аутоантител. *Биомедицина*. 2022;18(3):22–26. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-3-22-26>

Поступила 28.03.2022

Принята после доработки 04.04.2022

Опубликована 10.09.2022

PREPARATION OF BACTERIAL RECOMBINANT MYOSTATIN TO INDUCE THE SYNTHESIS OF MYOSTATIN-SPECIFIC AUTOANTIBODIES

Elena M. Koloskova*, Vadim A. Ezerskiy, Olga B. Zhukova

All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — Branch of the Federal Scientific Center of Animal Husbandry — The All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Academician L. K. Ernst 249013, Russian Federation, Kaluga region, Borovsk, Institut Village

The myostatin protein, belonging to the family of growth factors, represents a potential target for therapeutic effects in muscular system pathologies. However, this protein is characterized by other beneficial properties. Polymorphisms of the myostatin gene associated with the restriction of its functional activity are useful as genetic markers of meat productivity in farm animals. Blocking the action of myostatin in productive animals can be achieved by inducing the synthesis of specific autoantibodies using recombinant myostatin, possessing sufficient immunogenicity against myostatin as an antigen. A genetic construct was created and an *E. coli* producer strain with a high level of expression of recombinant myostatin was obtained.

Keywords: recombinant myostatin, *Escherichia coli*, autoantibodies, PAAG electrophoresis

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

For citation: Koloskova E.M., Ezerskiy V.A., Zhukova O.B. Preparation of Bacterial Recombinant Myostatin to Induce the Synthesis of Myostatin-Specific Autoantibodies. *Journal Biomed.* 2022;18(3):22–26. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-3-22-26>

Submitted 28.03.2022

Revised 04.04.2022

Published 10.09.2022

Введение

Ген *MSTN* был идентифицирован в 1997 г. [4]. Нокаутные по этому гену мыши, полученные в том же году, отличались гипертрофированной мускулатурой. Продукт экспрессии гена *MSTN* – белок миостатин (фактор роста и дифференцировки 8, GDF-8) ограничивает чрезмерный рост мышечной массы и служит потенциальной мишенью для терапевтического воздействия при дегенеративных заболеваниях, травмах и других патологиях мышечной системы, особенно в спортивной медицине [1].

Миостатин вырабатывается в скелетных мышцах как белок-предшественник (пропептид, 375 аминокислот), который расщепляется на N-концевой пропептид и C-концевой зрелый белок (109 аминокислот), образующий функциональный димер с помощью дисульфидной связи. Миостатин является одним из отрицательных регуляторов роста скелетных мышц, которые, действуя посредством сигнального пути рецептора ActRIIB, ингибируют синтез белков в мышцах, дифференцировку и пролиферацию миоцитов [3]. При недостатке миостатина или блокировании его действия происходит не только увеличение мышечной массы, но и повышение силовых характеристик скелетных мышц.

Росто-весовые признаки многих позвоночных зачастую зависят от полиморфизма генов, отвечающих за эти признаки. Определены полиморфизмы гена миостатина, связанные как с нокаутом, так и с частичным нарушением функционирования гена, приводящие к отсутствию белка или огра-

ничению его функциональной активности. Так, например, у нескольких пород крупного рогатого скота с «двойной» мускулатурой, самая известная из которых — бельгийская голубая, обнаружено более девяти типов мутаций гена миостатина [2].

В настоящее время активно разрабатываются способы ингибирования активности миостатина на разных уровнях [5]:

- системное введение антител против миостатина;
- сверхэкспрессия или введение пропептида миостатина (пропептид является ингибитором функционально активного димера зрелого белка);
- системное введение рецептора ActRIIB;
- введение антител против ActRIIB;
- сверхэкспрессия или введение фоллистатина;
- опосредованная печенью сверхэкспрессия растворимого рецептора (sActRIIB), доминантно-негативного миостатина (dnMSTN) или пропептида;
- использование РНК-интерференции и антиолигонуклеотидов против миостатина или ActRIIB;
- редактирование гена миостатина с использованием системы AAV-Cas9;
- получение трансгенных животных-моделей с нокаутом гена миостатина.

Основной целью наших исследований являлось изучение возможности снизить действие эндогенного миостатина у овец для повышения мясной продуктивности иммунизацией животных рекомбинантным миостатином (pMCTH) с образованием ан-

тител к эндогенному белку. Для достижения цели на первом этапе была поставлена задача получить плазмиду для экспрессии рекомбинантного миостатина и штамм-продуцент *E. coli*, экспрессирующий белок.

Материалы и методы

Выбор аминокислотной последовательности

Последовательность зрелого белка миостатина овцы (109 аминокислот) была получена из базы данных GenBank (NCBI Reference Sequence: NP_001009428.1).

Оптимизация нуклеотидной последовательности, получение плазмиды

Оптимизированную для транскрипции в *E. coli* нуклеотидную последовательность синтетического гена зрелого белка миостатина и её клонирование в плазмиду pET28a(+) по сайтам BamHI и XhoI проводили в ЗАО «Евроген» (Россия).

Штаммы бактерий, трансформация, подбор условий роста

Компетентные клетки *E. coli* BL21 (De3) получали по упрощённой нами стандартной методике химической трансформации с использованием 0,1 М CaCl₂. Свежеприготовленные компетентные клетки трансформировали плазмидой pET28-MSTN, высевали на чашки Петри с агаризованной средой Лурии – Бергани, содержащей 60 мкг/мл канамицина, инкубировали при 37 °С в течение ночи. Выросшие клоны с помощью ПЦР с использованием стандартных праймеров T7f/T7rev проверяли на наличие вставки размером 616 п.н. Один из положительных клонов использовали в качестве штамма-продуцента.

Из ночной культуры *E. coli* BL21/pET28-MSTN (бульонная среда Лурии – Бергани с канамицином) 1 мл клеточной суспензии переносили в 100 мл среды Лурии – Бергани с антибиотиком и выращивали на шейкере-инкубаторе при 37 °С до достижения оптической плотности 0,12–0,63 о.е.

при длине волны 595 нм, после чего в клеточную суспензию вносили индуктор экспрессии рекомбинантного белка — изопропил-бета-галактопиранозид (ИПТГ) до 1 mM. Культивировали от 7 ч при 37 °С до 20 ч при 22 °С на шейкере-инкубаторе. Перед внесением ИПТГ и в процессе культивирования отбирали по 1 мл клеточной суспензии для определения оптической плотности и содержания pMSTN.

Анализ отобранных проб на наличие в них рекомбинантного белка

Наличие целевого белка определяли с помощью 12,5% ПААГ-SDS электрофореза. Пробы клеточной культуры центрифугировали. К осадку, в зависимости от оптической плотности образца, добавляли двухбуквенный образец и 0,1% SDS (1:1) в таком объёме, чтобы содержание суммарного белка в пробе было нормализовано для результирующей визуализации белковых полос в ПААГ. Пробы прогревали на кипящей водяной бане 1,5 мин, аликвоты по 20–30 мкл вносили в карманы геля. Для оценки молекулярной массы использовали белковые стандарты в диапазоне 10–250 кДа. После завершения электрофореза детекцию белка проводили окрашиванием Coomassie Blue R-250.

Результаты и их обсуждение

Для рекомбинантного белка была выбрана аминокислотная последовательность зрелого миостатина овцы. Запланированный pMSTN содержит 143 аминокислоты, кодирующие 6xHis фрагмент, тромбиновый сайт, T7 тэг, последовательность, соответствующую зрелому миостатину, и имеет рассчитанную молекулярную массу 15,92 кДа. Анализ последовательности кодонов для синтеза pMSTN в *E. coli* в программе Rare Codon Caltor (<http://people.mbi.ucla.edu/sumchan/caltor.html>) показал низкую частоту встречаемости для 12 кодонов из 109, что могло бы существенно снизить эффективность синтеза рекомбинантного белка при использовании оригинальной кодиру-

ющей последовательности, клонированной в плазмиду-вектор. Последовательность синтетического гена, кодирующего зрелый миостатин, была оптимизирована для эффективной экспрессии в *E. coli*.

Несмотря на значительное упрощение методики получения компетентных клеток, трансформация прошла успешно, и все проверенные клоны были трансфицированы.

При подборе условий роста штамма-продуцента с целью оптимизации наработки рекомбинантного белка учитывали следующие факторы: 1) доля рМСТН в суммарном бактериальном белке, 2) содержание рекомбинантного белка в общем объёме клеточной культуры. Методом ПААГ-электрофореза было показано, что *E. coli* Bl21/pET28-MSTN при индукции 1 мМ ИПТГ экспрессирует рекомбинантный белок массой около 16 кДа, что соответствует теоретическому значению. Ранняя индукция на стадии низкой оптической плотности (0,15 о.е.) приводила к получению рМСТН высокой чистоты (60–80% суммарного белка), но давала низкую суммарную наработку бактериальной биомассы, несмотря на длительное

культивирование. При индукции на более поздних стадиях (0,47–0,63) относительная доля рМСТН снижалась. Длительность культивирования при 37 °С до прекращения роста биомассы составляла 6–7 ч. Исходя из полученных результатов, оптимальный результат может быть получен при индукции экспрессии на уровне роста бактериальной массы, соответствующем 0,25–0,30 о.е. с более длительной инкубацией при температурах ниже 37 °С.

Закключение

При использовании в составе генетической конструкции оптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующей белок зрелого миостатина, был получен штамм-продуцент *E. coli* Bl21/pET28-MSTN, при индукции которого наблюдали высокий уровень экспрессии рекомбинантного белка. Рекомбинантный миостатин, полученный при культивировании в одном из использованных режимов, может быть применён в качестве антигена для иммунизации животных при минимальной обработке.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Кукес В.Г., Газданова А.А., Фуралев В.А., Маринин В.Ф., Перков А.В., Ленкова Н.И., Соловьева С.А., Рязанцева О.В. Современное представление о биологической роли и клиническом значении миостатина — главного регулятора роста и дифференцировки мышц. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2021;16(3):327–332. [Kukes V.G., Gazdanova A.A., Furalyov V.A., Marinin V.F., Perkov A.V., Lenkova N.I., Solovieva S.A., Ryzantseva O.V. Sovremennoe predstavlenie o biologicheskoy roli i klinicheskom znachenii miostatina — glavnogo regulatora rosta i differentsirovki myshts [Modern conception of myostatin biological role and clinical significance as the main regulator of muscle growth and differentiation]. *Medicinskij vestnik Severnogo Kavkaza* [Medical News of North Caucasus]. 2021;16(3):327–332. (In Russian)]. DOI: 10.14300/mnnc.2021.16079.
2. Bongiorni S., Valentini A., Chillemi G. Structural and dynamic characterization of the C313Y mutation in myostatin dimeric protein, responsible for the “double muscle” phenotype in Piedmontese cattle. *Front. Genet.* 2016;7:14. DOI: 10.3389/fgene.2016.00014.
3. Chen M.M., Zhao Y.P., Zhao Y., Deng S.L., Yu K. Regulation of myostatin on the growth and development of skeletal muscle. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021;9:785712. DOI: 10.3389/fcell.2021.785712.
4. McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*. 1997;387(6628):83–90. DOI: 10.1038/387083a0.
5. Nielsen T.L., Vissing J., Krag T.O. Antimyostatin treatment in health and disease: The story of great expectations and limited success. *Cells*. 2021;10(3):533. DOI: 10.3390/cells10030533.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Колоскова Елена Михайловна*, к.б.н., Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»;
e-mail: heleko3@yandex.ru

Elena M. Koloskova*, Cand. Sci. (Biol.), All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — Branch of the Federal Scientific Center of Animal Husbandry — The All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Academician L.K. Ernst
e-mail: heleko3@yandex.ru

Езерский Вадим Аркадьевич, Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»;
e-mail: ez.vadim@yandex.ru

Vadim A. Ezerskiy, All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — Branch of the Federal Scientific Center of Animal Husbandry — The All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Academician L.K. Ernst;
e-mail: ez.vadim@yandex.ru

Жукова Ольга Борисовна, Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»;
e-mail: olgazhukova19801031@gmail.com

Olga B. Zhukova, All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — Branch of the Federal Scientific Center of Animal Husbandry — The All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Academician L.K. Ernst;
e-mail: olgazhukova19801031@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author