

Разработка рекомбинантного *Escherichia coli* как пробиотического вектора для доставки иммуномодулирующих полипептидов при регенерации тканей желудочно-кишечного тракта

Научный руководитель – Гончаренко Анна Владимировна

Жамгочян Хамесд

Аспирант

Российский государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева,
Агрономии и биотехнологии, Генетики и биотехнологии, Москва, Россия

E-mail: hamesdja9@gmail.com

Восстановление тканей, поврежденных вследствие травм или заболеваний, часто является длительным и не всегда эффективным процессом, особенно при хроническом воспалении, например, при болезни Крона. Доставка регуляторных молекул к поврежденным участкам, способствующих регенерации, может повысить вероятность успешного лечения. Перспективным методом для этой доставки в желудочно-кишечный тракт является использование рекомбинантных пробиотических штаммов бактерий в роли носителей. Эти штаммы обладают антагонистической активностью к патогенным микроорганизмам и помогают формировать нормальную микробиоту, что поддерживает регенерацию. Однако традиционные прокариоты для производства рекомбинантных белков используются в качестве адаптированных лабораторных штаммов.

Цель исследования — создание пробиотического штамма *Escherichia coli*, который обеспечит индуцированную экспрессию целевого продукта как *in vitro*, так и в кишечнике животных. Основным объектом исследования стал пробиотический штамм *E. coli* M17, обладающий подтвержденными свойствами подавления патогенной микрофлоры. В качестве модели для экспрессии выбрана β -субъединица холерного токсина (СТВ), кодируемая геном *ctxB*. Доказано, что СТВ эффективно уменьшает воспаление при болезни Крона [1], снижая уровень провоспалительных цитокинов IL-12 и IL-6, и увеличивая уровень IL-10 [2]. Ген *ctxB* был соединен с сигналом секреции OmpA из *E. coli* и клонирован в вектор pET22b.

В векторе pET22b промотор T7 заменили на T5, не требующий вирусной РНК полимеразы, что дало вектор pET22b-T5-OmpA-СТВ. Этот вектор трансформировали в *E. coli* M17, в результате чего был получен рекомбинантный штамм *E. coli* M17-СТВ. Для индукции экспрессии *in vitro* использовался IPTG, но для *in vivo* была выбрана лактоза; выход белка составил до 50 мг/л культуры.

Следующим этапом стало обнаружение синтеза СТВ в кишечнике *in vivo*. Поскольку продукция СТВ должна сопровождаться иммунным ответом, мы оценили уровень мукозального иммунного ответа к СТВ у мышей, получивших рекомбинантный штамм *E. coli* M17-СТВ. Мышам BALB/c вводили дважды с интервалом в 6 недель в желудок по 10^8 клеток штамма *E. coli* M17-СТВ; контрольные мыши получили *E. coli* M17 и буферный раствор pH 7. Через 2 недели после последнего введения была собрана кровь и образцы слизи из кишечника для определения уровня иммуноглобулинов к СТВ методом ИФА. Результаты показали наличие антител против СТВ, что подтверждает его продукцию в просвете кишечника.

Исследование продемонстрировало, что пробиотический штамм *E. coli* способен на индуцированную экспрессию белковых регуляторных молекул как *in vitro*, так и в кишечнике. Штамм *E. coli* M17-СТВ имеет потенциал для применения в терапии воспалительных процессов и трансплантации кишечника.

Источники и литература

- 1) Boirivant M., Fuss I.J., Ferroni L., et al. Oral administration of recombinant cholera toxin subunit B inhibits IL-12-mediated murine experimental (trinitrobenzene sulfonic acid) colitis // J Immunol. 2001. Vol. 166, N 5. P. 3522–3532. doi: 10.4049/jimmunol.166.5.3522
- 2) Denes B., Fodor I., Langridge W.H. Persistent suppression of type 1 diabetes by a multicomponent vaccine containing a cholera toxin B subunit-autoantigen fusion protein and complete Freund's adjuvant // Clin Dev Immunol. 2013. ID 578786. doi: 10.1155/2013/578786