

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-157

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ ТЕРМИНАТОРА НА СТАБИЛЬНОСТЬ мРНК И ПРОДУКТИВНОСТЬ ШТАММОВ *E. COLI*

EFFECT OF TERMINATOR MODIFICATION ON mRNA STABILITY AND PRODUCTIVITY OF *E. COLI* STRAINS

М. С. Яровикова¹, Е. А. Буслаева¹,
М. Д. Бочкарева¹, З. Р. Хасаншина^{1,2}

¹*R&D ГЕРОФАРМ, Санкт-Петербург*

²*Университет ИТМО, Санкт-Петербург*

M. S. Yarovikova¹, E. A. Buslaeva¹,
M. D. Bochkareva¹, Z. R. Khasanshina^{1,2}

¹*R&D GEROPHARM, Saint Petersburg*

²*ITMO University, Saint Petersburg*

✉ Marina.Iarovikova@geropharm.com

Аннотация

В настоящем исследовании рассмотрено влияние модификации терминаторных последовательностей на стабильность мРНК и продуктивность штаммов *Escherichia coli* (*E. coli*), продуцирующих рекомбинантные белки. Показано, что стабильность мРНК частично коррелирует с удельной продуктивностью, однако данная взаимосвязь существенно варьирует в зависимости от плазмидной конструкции.

Abstract

This study evaluated the impact of terminator sequence modification on mRNA stability and productivity in recombinant *Escherichia coli* (*E. coli*) strains. The results revealed a partial correlation between mRNA half-life and specific protein yield, with outcomes varying in accordance with plasmid context.

Введение

С увеличением потребности в рекомбинантных терапевтических белках возрастает необходимость повышения эффективности их биосинтеза. Одним из ключевых факторов, влияющих на уровень экспрессии, является стабильность мРНК. *E. coli* остается одной из наиболее востребованных систем экспрессии рекомбинантных белков, однако нестабильность мРНК в бактериальных клетках часто ограничивает выход целевого продукта, и до сих пор не существует универсальной методики оценки стабильности этой молекулы. Одним из ключевых факторов, влияющих на стабильность мРНК, являются вторичные структуры, такие как 5'- и 3'-шпильки, которые защищают транскрипты от деградации рибонуклеазами. В частности, модификации терминаторных последовательностей могут значительно увеличить период полураспада мРНК и, как следствие, уровень экспрессии белка. Несмотря на это, взаимосвязь между стабильностью мРНК и конечной продуктивностью штамма остается не до конца изученной [1–3].

Цель работы заключалась в исследовании влияния модификации терминаторных последовательностей на стабильность мРНК и продуктивность штаммов *E. coli*, а также в разработке аналитического инструмента для измерения периода полураспада бактериальной мРНК.

Материалы и методы

В исследовании были использованы две группы трансформированных штаммов *E. coli* BL21, экспрессирующих различные рекомбинантные белки. В каждой группе один штамм содержал модифицированный терминатор, второй — исходную (контрольную) конструкцию. После ферментации и выделения клеточной биомассы проводилась оценка удельной продуктивности методом капиллярного электрофореза.

Стабильность мРНК оценивали с помощью количественной обратной транскриптазной ПЦР (RT-qPCR). Расчет периода полураспада осуществлялся на основании модели однофазного экспоненциального распада, обработка данных производилась в среде GraphPad Prism.

Результаты

В группе 1 (штаммы BL21/pF644 и BL21/pF1378) модификация терминатора сопровождалась увеличением удельной продуктивности на 10 % (рис. 1), при этом период полураспада мРНК изменился незначительно на +2,2 % (рис. 2).

В группе 2 (штаммы BL21/pF1317 и BL21/pF1319) аналогичная модификация привела к существенному повышению продуктивности на 80 % (см. рис. 1), тогда как стабильность мРНК уменьшилась на 28 % (рис. 3).

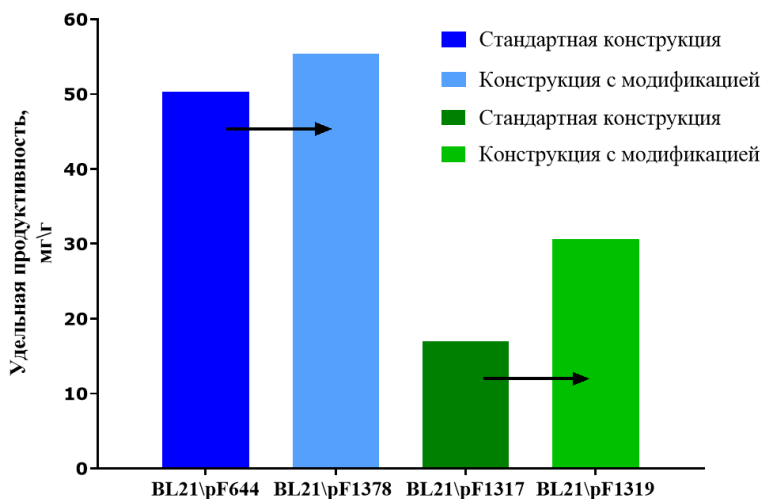


Рис. 1. Сравнение удельной продуктивности исследуемых штаммов

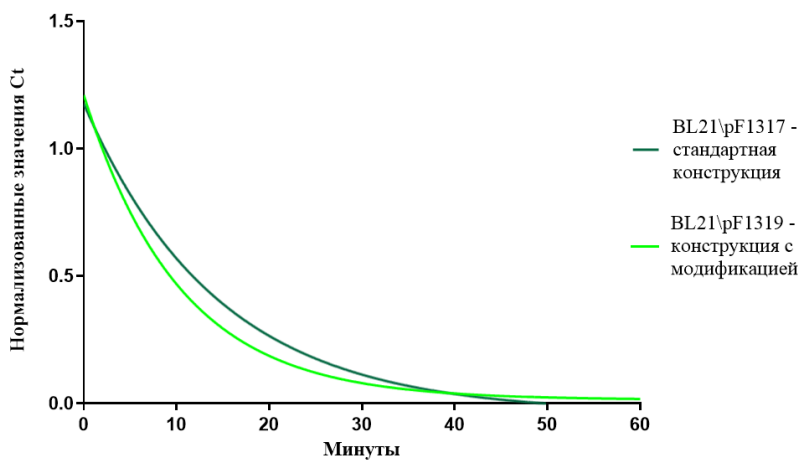


Рис. 2. Результаты оценки стабильности мРНК штаммов BL21/pF644, BL21/pF1378

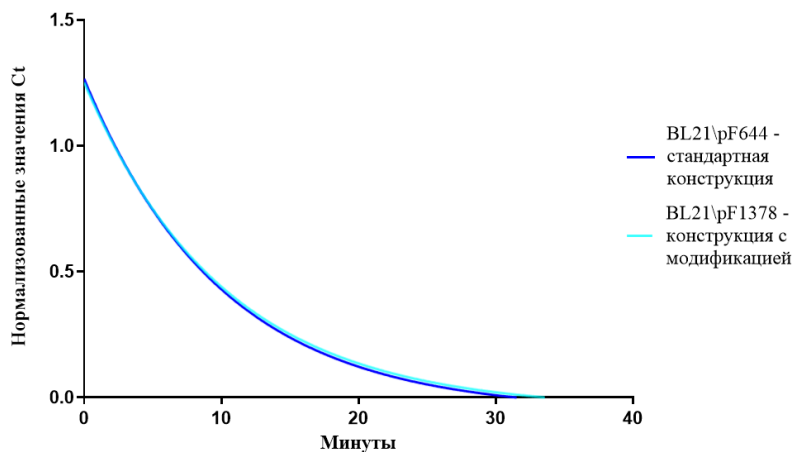


Рис. 3. Результаты оценки стабильности мРНК штаммов BL21/pF1317, BL21/pF1319

По результатам, полученным по обеим группам, можно заключить, что наличие дополнительной вторичной структуры в области терминатора способствует увеличению продукции целевого белка. Однако повышение продуктивности не всегда коррелирует с ростом стабильности мРНК.

Таким образом, в обеих исследуемых группах значимых изменений в стабильности мРНК не было зафиксировано. Введение дополнительной вторичной структуры в терминаторной области приводило к увеличению выхода целевого белка, однако в данном случае с увеличением стабильности мРНК это не коррелировало.

Выводы

1. Влияние модификаций терминаторных последовательностей на стабильность мРНК и продуктивность штаммов сильно зависит от особенностей экспрессируемого белка.
2. Повышение продуктивности рекомбинантного белка не всегда сопровождается увеличением периода полураспада мРНК.
3. Для конструирования эффективных систем экспрессии необходим индивидуальный подход к дизайну нуклеотидных последовательностей терминаторов с учетом биологического контекста.

Литература

1. Carrier T.A., Keasling J.D. Controlling Messenger RNA Stability in Bacteria: Strategies for Engineering Gene Expression // Biotechnol. Prog. 1997. Vol. 13, No. 6. P. 699–708.
2. Vargas-Blanco D.A., Shell S.S. Regulation of mRNA Stability During Bacterial Stress Responses // Front. Microbiol. 2020. Vol. 11. P. 2111.
3. Chen L.H. et al. Structure and function of a bacterial mRNA stabilizer: analysis of the 5' untranslated region of ompA mRNA // J. Bacteriol. 1991. Vol. 173, No. 15. P. 4578–4586.