

ТЕХНОЛОГІЯ СТВОРЕННЯ НАДПРОДУЦЕНТА ІНТЕРФЕРОНУ ШЛЯХОМ КОНТРОЛЮ ЛАС-ОПЕРОНА У *E. COLI*

Постнікова А. В.

КПІ ім. Ігоря Сікорського, postnikova.anastasia@iik.kpi.ua

Abstract

This article explores the diverse roles of interferons, their antiviral and antibacterial effects, as well as the technology that may enable the creation of a high-yield producer strain of E. coli BL21 (DE3). Genetic modification of this microorganism could increase the output of recombinant γ -IFN, offering economically efficient solutions for industrial needs.

Keywords: *Escherichia coli*, interferons, induction, genetic modification

Вступ. Інтерферони (ІФН) активно досліджуються протягом останніх десятиліть: молекулярні механізми противірусної дії ІФН, нещодавнє виявлення їх антибактеріальної дії проти грампозитивних та грамнегативних бактерій, ініціація інтерфероногенезу, вірусні механізми проти інтерферонового захисту – все це привертає увагу дослідників і збільшує їх інтерес для подальшого вивчення ІФН [1].

На даний момент відомо, що противірусні властивості інтерферонів проявляються опосередковано внаслідок впливу на обмінні процеси на клітинному рівні, в результаті яких утворюються ферменти, що інгібують трансляцію вірусних білків [1]. Так само й антибактеріальні властивості ІФН зумовлюються тим, що вони сприяють утворенню імуноглобулінів, підвищують фагоцитарну активність та цитотоксичність природних кілерів відносно клітин-мішеней [2].

Було відкрито та вивчено більше 20 ІФН, які поділяють на ІФН I-го, II-го та III-го типу. Синтез α -ІФН та β -ІФН, які належать до ІФН I-типу, активується в присутності вірусів, бактеріальних ліпополісахаридів тощо і вони загалом відповідають за індукцію антивірусного стану клітини. Синтез ІФН II-типу, а саме γ -ІФН, розпочинається за умови наявності макрофагів та моноцитів і основною функцією даного інтерферону є модуляція імунної системи. ІФН III-типу (λ_1 -ІФН, λ_2 -ІФН, λ_3 -ІФН) були відкриті у 2002 році і допоки залишаються маловивченими, проте встановлено, що вони синтезуються дендритними клітинами та епітеліоцитами респіраторного тракту, а за їх кодування відповідає 3 гени, в той час, коли ІФН II-типу та майже всі ІФН I-типу кодуються 1 геном, окрім α -ІФН, який кодується 24-ма генами [1, 2].

Самі інтерферони є першою «лінією оборони» імунної системи і відіграють регуляторну роль у підтримці гомеостазу, зокрема γ -ІФН, порушення утворення якого спричинює загальне зниження стійкості клітин до різних інфекцій. Препарати ж інтерферону є сучасними засобами профілактики та лікування вірусних захворювань, проте вони є досить дорогими у виробництві та складними в розрізі стандартизації їх противірусної активності, тож на сьогодні є досить актуальним розроблення препаратів рекомбінантного γ -ІФН [3]. Цього можна досягти за допомогою прокаріотичних систем, наприклад, *Escherichia coli*, з клітинами якої можна легко проводити необхідні маніпуляції з геномом,

культивування є відносно недорогим, а самому мікроорганізму притаманний швидкий ріст [4].

Метою даної роботи є аналіз можливого методу модифікації штаму *E. coli* із використанням генної інженерії для вдосконалення технології отримання рекомбінантного препарату γ -ІФН у промисловості з високим рівнем виходу цільового продукту та дослідження генетичних особливостей мікроорганізму.

Матеріали та методи. Аналіз було проведено на основі опублікованих наукових праць на тему створення надпродуцента рекомбінантних білків *E. coli*, що було трансформовано плазмідом рЕТ. Використано системний підхід до аналізу інформації з дослідженням генетичних особливостей даного мікроорганізму, ґрунтуючись на базах даних NCBI та PubMed Central®.

Результати та обговорення. Розпізнавання та руйнування неправильно згорнутих білків і розщеплення чужорідних білків здійснюється протеазами Iop та ompT відповідно. Якщо ці протеази відсутні, утворення білка з клонованих генів відбувається ефективніше. У штаму *E. coli* BL21 (DE3), який трансформовано плазмідом рЕТ3а, ці протеази майже відсутні, що дозволяє досягти вищої секреції чужорідних для мікроорганізму білків [5].

У векторах рЕТ присутній промотор T7 Lac, який є компонентом lac-оперону. lac-оперон-контрольована система експресії, яка може бути ініційована додаванням індуктора, а саме ізопропіл- β -D-тіогалактозиду (ІПТГ) – досить поширений метод отримання рекомбінантних білків, в тому числі й γ -ІФН, за допомогою *E. coli*. Проте індукції може перешкоджати велика кількість таких джерел вуглецю в середовищі культивування, які легко метаболізуються, наприклад, глюкоза [6, 7].

Це пов'язано з тим, що промотор lac, який є компонентом lac-оперону, індукується саме лактозою, яка при цьому виступає природним індуктором, і відповідно дозволяє досягти автоіндукції. Синтез ІФН таким чином відбуватиметься автоматично, а необхідність постійного моніторингу росту бактерії і додавання індуктора у визначений час зникне [6, 7].

Цільовий ген в системі експресії рЕТ в *E. coli* клонується за рахунок розпізнавання lac-промотору вірусною РНК-полімеразою фага T7, яка інтегрується у бактеріальний геном у профазі DE3 в хромосоми даного мікроорганізму і дозволяє досягти високого рівня транскрипції рекомбінантного гену γ -ІФН. Опиняючись під транскрипційним контролем промотора lacUV5 РНК-полімераза T7 розпізнає промотор T7 lac [5].

Для РНК-полімерази T7 характерним є те, що вона здатна розпізнавати виключно цей промотор, а автоіндукція або індукція ІПТГ потрібні саме для ініціації її експресії. Це і відкриває можливість для отримання високопродуктивного продуцента γ -ІФН - штаму *E. coli* BL21 (DE3) [5].

В той же час були проведені дослідження щодо рівня експресії IFN- α 2b RG2 (DE3) в культурах *E. coli* з видаленим lac-опероном. Джерелом вуглецю виступала лактоза. В результаті рівень експресії даного білку був значно нижчим, порівняно з отриманими результатами дослідів, що були проведені за тих самих умов, але за наявності lac-оперону (приблизно у 18 разів). Відсоток

IFN- α 2b, транслокованого в периплазму, індукованого lac-опероном становив 43–67% з максимальним утворенням в середині фази експоненціального росту. Таким чином, це підтверджує гіпотезу про вплив lac-оперона на посилену експресію інтерферона α 2b [8].

Для введення ж чужорідної ДНК в клітину *E. coli* застосовують трансформацію тепловим шоком з CaCl₂. Це необхідно по причині того, що розмір ДНК не дозволяє проникнути їй крізь клітинну мембрану. Після оброблення кальцій хлоридом на стадії теплового шоку мембранний потенціал зменшується і ДНК може вільно пройти через мембрану. У початковий стан потенціал мембрани повертається за допомогою холодного шоку [5].

При використанні даного методу отримання штаму *E. coli* BL21 (DE3) можна досягти виходу цільового продукту в результаті промислового культивування 0,07 г/л, що в 4 рази перевищує показники, отримувані звичайними методами [6].

Висновки. За результатами проведеного аналізу даних літератури, присвяченої технологіям отримання модифікованого штаму *E. coli* BL21 (DE3) плазмідною рЕТ було встановлено, що lac-оперон, який присутній на цій плазміді, дозволяє значно підвищувати експресію рекомбінантних білків, а саме γ -ІФН. Вихід цільового продукту таким чином можливо збільшити у 4 рази, що є комерційно вигідним для впровадження даного методу та його широкого використання у промисловості. Сам же процес культивування при цьому може бути спрощений, оскільки таким чином виникає можливість знехтувати постійним моніторингом і регулярним додаванням індуктора за рахунок здатності до автоіндукції.

Список використаної літератури:

1. Маслянюк Р., Левківський Д. Особливості функціонування системи інтерферону у неонатальних тварин. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. Гжицького. Львів, 2010. №3. С. 102–107.
2. Ю.Б. Кузьмінов. Роль інтерферонів у захисних реакціях організму. Актуальні проблеми профілактичної медицини : зб. наук. пр. Львів, 2014. С. 104–108.
3. Філон М.Ю. Автоматизація процесу контролю під час фармацевтичного виробництва інтерферону. Вісник СумДУ. Технічні науки. Суми, 2011. №2. С. 55–59.
4. Baolei J., Che O. J. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biology*. 2016. Vol. 6. No. 8. URL: <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.160196>
5. Fisher D.I., Mayr L.M., Roth R.G., Expression Systems. *Encyclopedia of Cell Biology*, Academic Press. 2016. P. 54–65. DOI: 10.1016/B978-0-12-394447-4.10009-4
6. Nariyasu T., Tachibana I., Kazuyo T., Yamashita Sh. Boosting Auto-Induction of Recombinant Proteins in *Escherichia coli* with Glucose and Lactose Additives. *Protein and Peptide Letters*. 2021. Vol. 28. No. 10. P. 1180–1190. DOI: 10.2174/0929866528666210805120715
7. Leonor S., Guilherme S. L., Pereira P., Mara G. F. Interferon-Based Biopharmaceuticals: Overview on the Production, Purification, and Formulation. *Vaccines*. 2021. Vol. 9. No. 4. URL: <https://doi.org/10.3390/vaccines9040328>
8. T. J. Shun, R. N. Ramanan, T. C. Ling. The role of lac operon and lac repressor in the induction using lactose for the expression of periplasmic human interferon- α 2b by *Escherichia coli*. *Annals of Microbiology*. 2011. Vol. 4. DOI: DOI 10.1007/s13213-011-0394-3