

Оценка нежелательной транскрипционной активности элементов экспрессионной системы AAV векторов в E.coli

Научный руководитель – Воробьева Ива Геннадьевна

Бережная Милана Александровна

Студент (специалист)

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И.

Пирогова, Москва, Россия

E-mail: milamila03@icloud.com

При разработке терапевтических аденоассоциированных вирусных векторов (pAAV) необходимо учитывать, что эти конструкции функционируют как челночные, то есть проходят этапы работы в двух биологических системах: прокариотах и эукариотах. На стадии получения AAV-векторов клонирование и увеличение количества плазмид осуществляется в клетках прокариот, чаще всего *Escherichia coli* (*E. coli*), что позволяет получить достаточный выход целевой ДНК для следующего применения в эукариотических системах. Однако токсичность целевой последовательности (трансгена) для прокариотической клетки-хозяина может повлиять как на успешность клонирования, так и на качество пула целевой ДНК.

В данном исследовании оценивался уровень транскрипции в прокариотической клетке различных промоторов, используемых для производства AAV-векторов, с целью оптимизации их получения в *E. coli* с токсичным для нее трансгеном. Были протестированы четыре промотора: тканеспецифический (гепатоцитарно-специфический) TBG и конститутивные CMV, CAG и EF1a. Для экспериментов использовался штамм *E. coli* XL1-Blue и векторные конструкции с репортерным геном EGFP, экспрессия которого контролировалась исследуемыми промоторами. Активность определяли методом количественной ПЦР в реальном времени (qPCR), где низкое значение точки пересечения (C_p) свидетельствовало о высокой транскрипции мРНК.

Также исследовалось влияние посттранскрипционного регуляторного элемента вируса гепатита сурка (wPRE) на уровень транскрипции мРНК в *E. coli*. Для этого сравнивали конструкции с wPRE и без него, используя qPCR. Результаты показали, что wPRE практически не изменяет уровень транскрипции в прокариотах, что объясняется отсутствием у бактерии механизмов процессинга мРНК, характерных для эукариот.

Результаты показали, что TBG-промотор обладает наибольшей активностью в *E. coli*, что приводит к высокой экспрессии EGFP и потенциальной цитотоксичности, затрудняя получение стабильных бактериальных культур с этим вектором. Транскрипция под контролем промотора CAG демонстрировала промежуточный уровень – выше, чем у CMV и EF1a, которые обеспечивают высокую конститутивную экспрессию в эукариотах, но показали наименьший уровень транскрипции в *E. coli*. Эти данные подчеркивают необходимость выбора промоторов с низкой активностью в прокариотах для успешного клонирования токсичных трансгенов, что важно для оптимизации работы с AAV-векторами в условиях челночных систем.

Иллюстрации

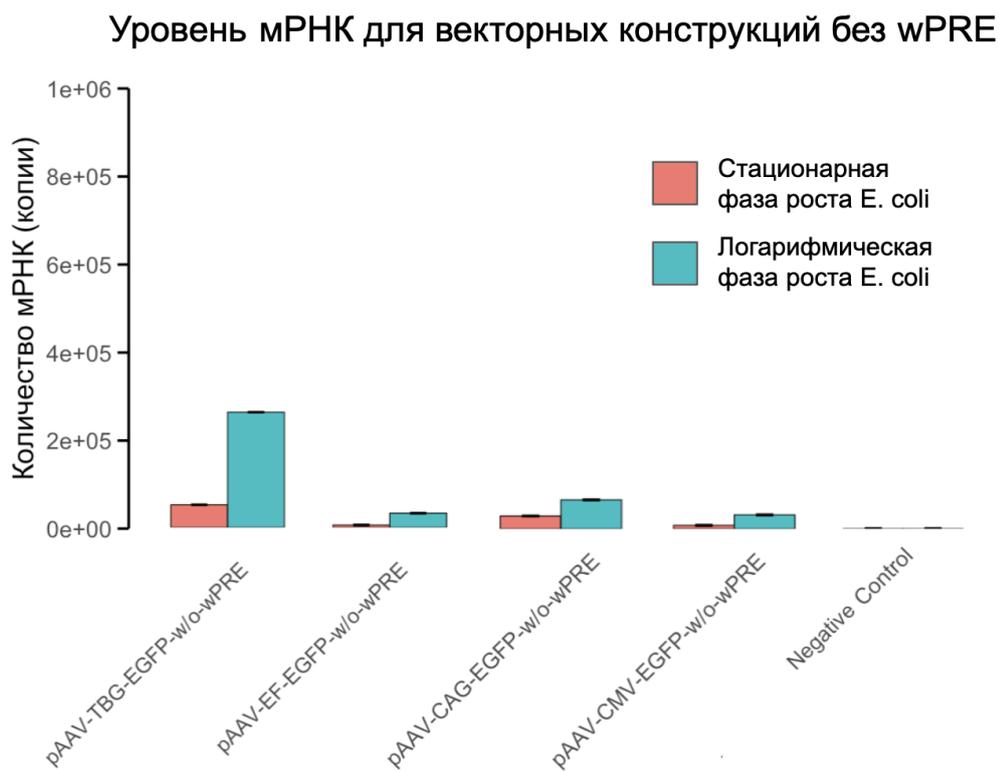


Рис. : Уровень экспрессии мРНК EGFP в прокариотических клетках, содержащих векторные конструкции без wPRE. Концентрация мРНК была измерена методом количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) и рассчитано по стандартной кривой. Представлены средние значения (Mean \pm SD) для шести биологических повторов. В эксперименте используются два отрицательных контроля: Negative Control без матрицы (NTC), который проверяет отсутствие контаминации реагентов, и Negative Control без ревертазы (No RT), предназначенный для контроля загрязнения образца РНК геномной ДНК.

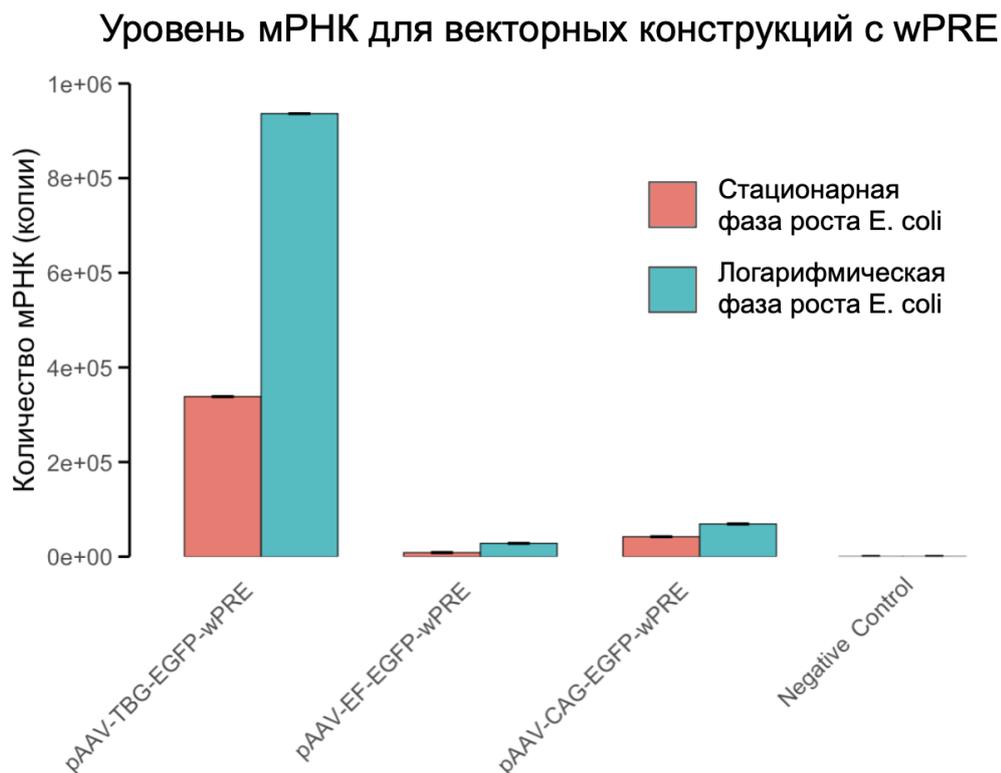


Рис. : Уровень экспрессии мРНК EGFP в прокариотических клетках, содержащих векторные конструкции с wPRE. Концентрация мРНК была измерена методом количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) и рассчитано по стандартной кривой. Представлены средние значения (Mean \pm SD) для шести биологических повторов. В эксперименте были использованы два отрицательных контроля: Negative Control без матрицы (NTC), который проверяет отсутствие контаминации реагентов, и Negative Control без ревертазы (No RT), предназначенный для контроля загрязнения образца РНК геномной ДНК.

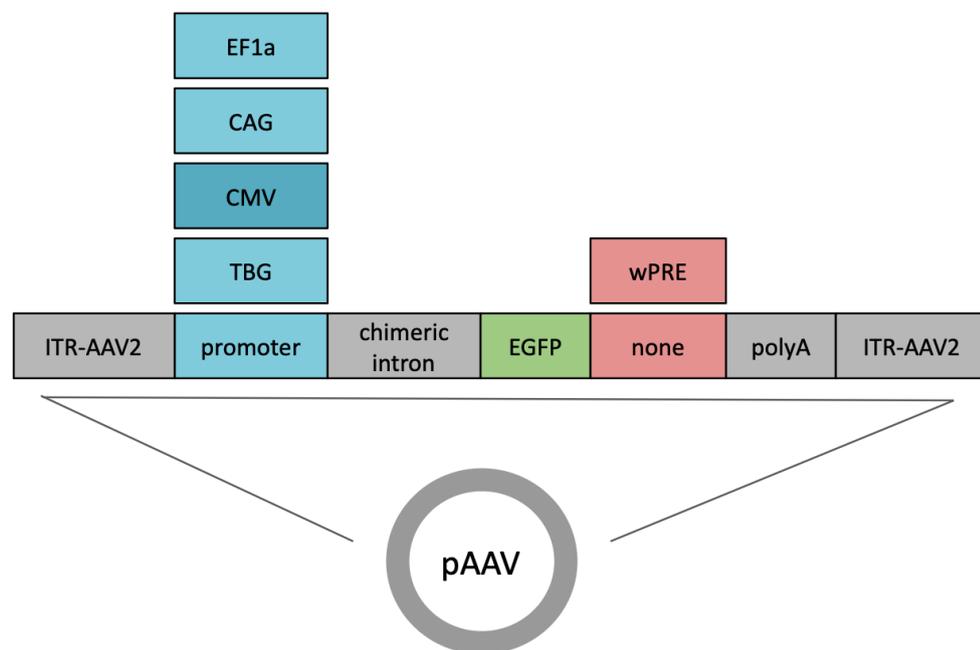


Рис. : Дизайн векторных конструкций включает четыре промотора (EF1a, CAG, CMV, TBG), каждый из которых представлен в вариантах с wPRE и без него, за исключением конструкции с CMV промотором, где wPRE отсутствует.