

Prace
eksperymentalne



Opracowanie eukariotycznego systemu ekspresyjnego działającego na podstawie aktywności rekombinazy Flp

Krzysztof B. Wicher¹

Natalia Jura¹

Marcin Kowanetz¹

Magdalena Lorenowicz¹

Ilona Rafalska¹

Wacław Szybalski²

Michał Bereta¹

¹Zakład Biochemii Zwierząt
Instytut Biologii Molekularnej
Uniwersytet Jagielloński
Kraków

²McArdle Laboratory
for Cancer Research
University of Wisconsin
Medical School, Madison, USA

1. Wstęp

Rozwój współczesnej biotechnologii obejmuje wiele dziedzin, z których jedną z najważniejszych jest tworzenie organizmów transgenicznych. Polega ono na wprowadzaniu obcych genów do komórek gospodarza, co daje możliwość uzyskiwania nowych, bądź modyfikowania już posiadanych przez organizm cech. Wymaga to stworzenia całego zaplecza metod, które umożliwiłyby wprowadzenie genów do ko-

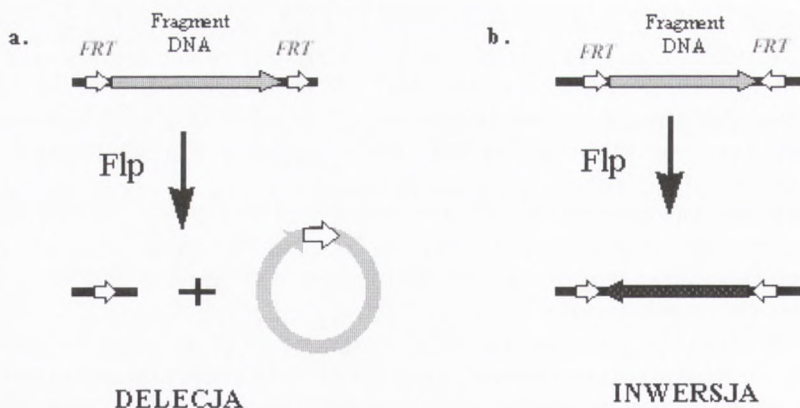
mórek docelowych, a następnie przewidzenia ich „zachowania się”, czyli oszacowanie stopnia i czasu ekspresji genu. Istotne jest także zachowanie kontroli nad wprowadzonym genem, rozumianej jako włączanie lub wyłączanie ekspresji genu, jak i regulowanie poziomu jego produktu. Jeżeli warunki te zostają spełnione, uzyskujemy możliwość stworzenia transgenicznego układu o ściśle określonych przez nas parametrach.

Narzędziem pozwalającym na kontrolowaną ekspresję genów w komórkach są wektory ekspresyjne oraz konstruowane z nich systemy ekspresyjne. System ekspresyjny jest to układ biologiczny, w którym współdziała wiele specyficznych białek regulatorowych i sekwencji promotorowych. Uczestniczą one w swoistym dla danego systemu ciągu przemian, który w efekcie prowadzi do ekspresji interesującego nas genu. Ich ilość, aktywność, bądź dostępność mogą być regulowane, co z kolei daje możliwość regulacji ekspresji genu. W odróżnieniu od systemów opartych na ciągłej (konstytutywnej) ekspresji genu, w których niemożliwe jest jej zahamowanie, w systemie indukcyjnym możemy włączać lub wyłączać ekspresję genu poprzez operowanie induktorem, np. niskocząsteczkowym aktywatorem.

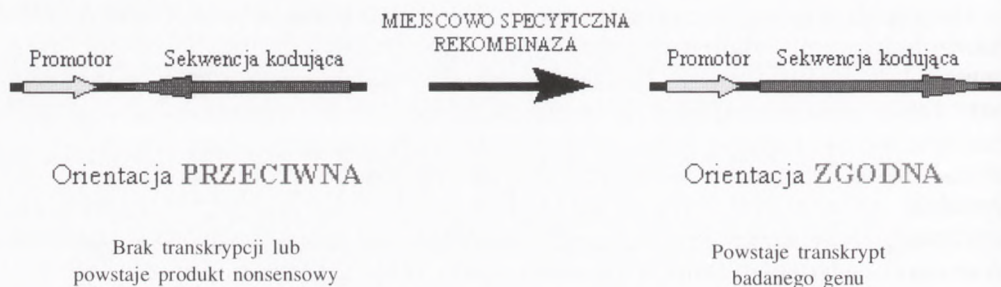
Dobrze funkcjonujące prokariotyczne systemy ekspresyjne działają na podstawie sekwencji i białek regulatorowych operonów: tetracyklinowego, laktozowego lub arabinozowego (1). Te prokariotyczne elementy regulatorowe znalazły także zastosowanie w kontroli ekspresji genów eukariotycznych (2,3). Praktycznie nie istnieje indukowalny system ekspresyjny, skonstruowany tylko na bazie elementów eukariotycznych, którego wydajność byłaby porównywalna ze znanymi systemami wykorzystującymi mocne, konstytutywne promotory wirusowe, np. P_{CMV} (promotora/enhancera genów bezpośrednio wczesnych wirusa cytomegalii — IE_{CMV}) lub P_{RSV} (promotora/enhancera z sekwencji *LTR* wirusa RSV). Ponadto w dotychczas opracowanych systemach indukwalnych obserwuje się niekontrolowaną ekspresję genu (ang. *leakage*), występującą pomimo braku indukcji. Niekontrolowana ekspresja genu jest dla eksperymentatora zjawiskiem niekorzystnym, gdyż w rezultacie całkowite wyłączenie ekspresji regulowanego genu staje się niemożliwe, przez to znacznie ogranicza możliwość zastosowania systemu do ekspresji genów, np. dla białek cytotoksycznych lub enzymatycznych. Dodatkowym minusem niektórych istniejących systemów jest zjawisko nieswoistej indukcji, które polega na aktywacji genu przez substancje podobne do specyficznych induktorów, np. deksametazon w systemie ekdysonowym (4).

Celem pracy było opracowanie takiego eukariotycznego systemu, w którym osiągany po indukcji stopień ekspresji genu dorównywałby poziomowi uzyskiwanemu w systemach opartych na promotorach wirusowych. Jednocześnie starano się wyeliminować niekontrolowaną ekspresję genu i uzyskać pełną specyficzność indukcji.

Do konstrukcji systemu wykorzystano zjawisko miejscowo swoistej rekombinacji, którą zapewnia rekombinaza Flp. Rozpoznaje ona specyficzne, asymetryczne sekwencje *FRT* (5,6). Wzajemna orientacja dwóch fragmentów *FRT* determinuje sposób działania rekombinazy Flp. Podczas gdy sekwencje *FRT* ustawione są w tej samej orientacji, rekombinaza wycina fragment DNA zawarty



Rys. 1. Schemat działania miejscowo specyficznej rekombinazy Flp: a) jednakowa orientacja sekwencji *FRT* powoduje delecję fragmentu DNA, b) zbieżna — jego inwersję.



Rys. 2. Inwersja sekwencji kodującej pod wpływem Flp umożliwia ekspresję genu.

między nimi, a gdy ustawione są zbieżnie enzym powoduje inwersję sekwencji zawartej między *FRT* (rys. 1). Wówczas gdy sekwencję tę stanowi gen w orientacji przeciwnej do kierunku transkrypcji, który znajduje się między dwiema sekwencjami *FRT* ustawionymi zbieżnie względem siebie, to dodanie rekombinazy Flp spowoduje jego inwersję. Wówczas sekwencja kodująca znajdzie się w orientacji umożliwiającej transkrypcję. Jeśli dodatkowo gen jest poprzedzony mocnym promotorem, to uzyskany poziom ekspresji powinien być wysoki (rys. 2).

2. Materiały i metody

2.1. Wektory i enzymy

Do badań wykorzystaliśmy: pcDNA3.1(+) firmy Invitrogen (San Diego, CA, USA), pOG44 — dar od S. O'Gormana (La Jolla, CA, USA) (7), pMS17.2

dar W. Szybalskiego (Madison, WI, USA) (8), pGEM3Zf(+) firmy Promega (Madison, WI, USA), pEQ176 — dar od M. Schleissa (Seattle, WA, USA).

Plazmidy namnażane były w szczepie DH5 α bakterii *E. coli* i izolowane na kolumnach firmy QIAGEN GmbH (Hilden, Germany).

Wszystkie stosowane enzymy restrykcyjne oraz polimeraza T4 pochodziły z firmy New England Biolabs (Beverly, MA, USA). Fragment Klenowa polimerazy I DNA i alkaliczna fosfataza z firmy Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Germany).

2.2. Hodowle i transfekcje komórek

Komórki linii HepG2 (ludzka hepatoma), HEK (ludzkie epitelium z nerki embrionalnej) i CHO (linia komórkowa z jajników chomika) pochodziły z firmy ATCC (ATCC, Manassas, VA, USA). Komórki HepG2 i HEK hodowano na podłożu DMEM, komórki CHO hodowano na podłożu F-12 (Life Technologies, Inc., Paisley, UK). Wszystkie podłoża były wzbogacone 10% płodową surowicą cielęcą (HyClone Lab., Inc., Logan, Utah, USA) z dodatkiem antybiotyków: penicyliny i streptomycyny. Do transfekcji komórek HepG2 i HEK plazmidowym DNA użyto DOTAP (UW Vector Core Lab., Madison, WI, USA). Do transfekcji komórek CHO wykorzystano lipofektynę (Life Technologies, Inc.). Transfekcje plazmidami p6200lacZ-L, pOG44, p6200lacZ-R i pGEM-3Zf(+) przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta.

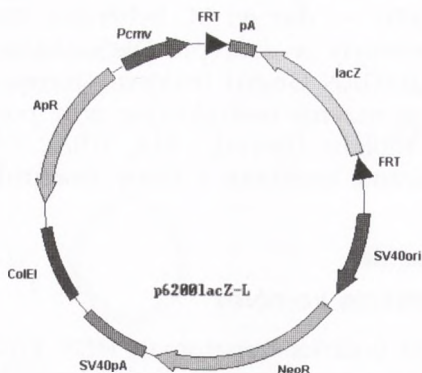
Wykorzystując obecność genu dla fosforylasy neomycyny (G418), w plazmidzie p6200lacZ-L, wyprowadzono stabilnie transfekowaną linię komórkową HEK · lacZ · L. Dla uzyskania ekspresji β -galaktozydazy, komórki transfekowano plazmidem pOG44, zawierającym gen dla rekombinazy F1p.

2.3. Badanie poziomu ekspresji genu reporterowego (*lacZ*)

Po 36-godzinach po transfekcji (dla linii HEK · lacZ · L, po 48-godzinach) przeprowadzono lizę komórek. W poszczególnych grupach eksperymentalnych oznaczono aktywność enzymatyczną β -galaktozydazy wg standardowego protokołu (9). Jako substratu użyto o-nitrofenylo- β -D-galaktopiranozydu (ONPG) (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Germany).

2.4. Kontrola inwersji DNA w plazmidach serii p6200 w komórkach bakteryjnych

Szczep bakterii *E. coli* JW172 (otrzymany od W. Szybalskiego), w których genomie znajduje się gen rekombinazy F1p pod kontrolą promotora tetracyklinowego (*Ptet-FLP*), transformowano plazmidem p6200lacZ-L i wysiano na płytce z podłożem agarowym z ampicyliną. Klony bakteryjne przeniesiono do 3 ml bulionu z ampicyliną i inkubowano dopóki zawiesina komórek nie osiągnęła OD₆₀₀ 0,3. Dla indukcji aktywności *FLP*, do podłoża dodano chlotetracyklinę (cTc, 20 μ g/ml) i bakterie inkubowano przez 2 godziny w 37°C.



Rys. 3. Plazmid p6200lacZ-L.

Po upływie tego czasu wyizolowano plazmidowy DNA z bakterii (metodą lizy alkalicznej) i poddano trawieniu enzymem Nde I.

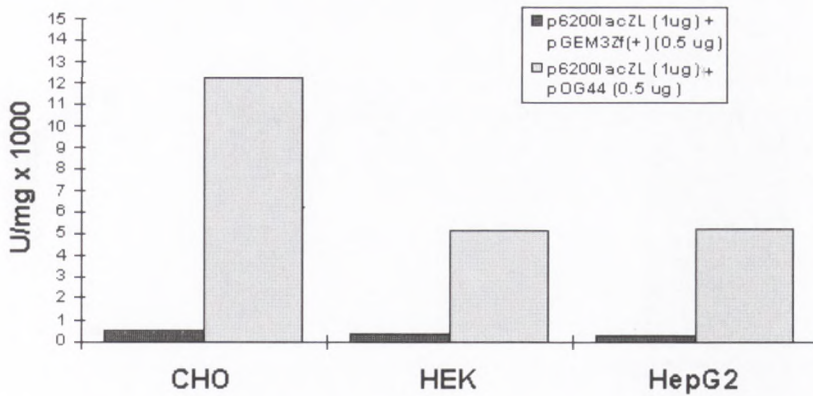
3. Wyniki i dyskusja

3.1. Konstrukcja systemu ekspresyjnego

Pierwszym krokiem było skonstruowanie wektora ekspresyjnego, w którym gen reporterowy znajdowałby się w otoczeniu sekwencji *FRT* ustawionych zbieżnie. Jako podstawę opracowanego wektora zastosowano plazmid pcDNA3.1(+). Usunięto z niego fragment Hind III-Dra III zawierający kasetę sygnału poliadenylacji BGHPoly(A), a jego końce stepiono polimerazą T4. Z plazmidu pMS17.2 wycięto fragment Nhe I-Ssp I, zawierający kasetę *FRT-polilinker-FRT*, którego końce wypełniono fragmentem Klenowa polimerazy I DNA. W wyniku ligacji obydwu fragmentów powstały dwa plazmidy (+/-) p6200.

Do analizy aktywności skonstruowanego wektora użyto genu reporterowego *lacZ-poly(A)*, kodującego β -galaktozydazę. Został on wycięty Xho I-BamH I z plazmidu pEQ176, którego końce wypełniono fragmentem Klenowa polimerazy I DNA i wstawiono do plazmidu p6200 w miejsce EcoRV — w obu orientacjach. Powstały wówczas plazmidy p6200lacZ-L (o orientacji przeciwnej) i p6200lacZ-R (o orientacji genu zgodnej z promotorem) (rys. 3).

Drugim elementem systemu jest plazmid pOG44 zawierający gen rekombinazy Flp pod kontrolą konstytutywnego promotora P_{CMV} (7).



Rys. 4. Kontrola funkcjonowania systemu ekspresyjnego w różnych liniach komórkowych.

Komórki kotransfekowane plazmidami p6200lacZ-L i pOG44 (niosącym gen *FLP*) wykazują kilkudziesięciokrotnie wyższy poziom ekspresji niż w przypadku gdy są one transfekowane plazmidami p6200lacZ-L i pGEM3Zf(+) (nie kodującym Flp).

Poziom ekspresji genu badano 48 godzin po transfekcji $2 \cdot 10^5$ komórek poprzez aktywność właściwą enzymu β -galaktozydazy w liczącym komórkowym.

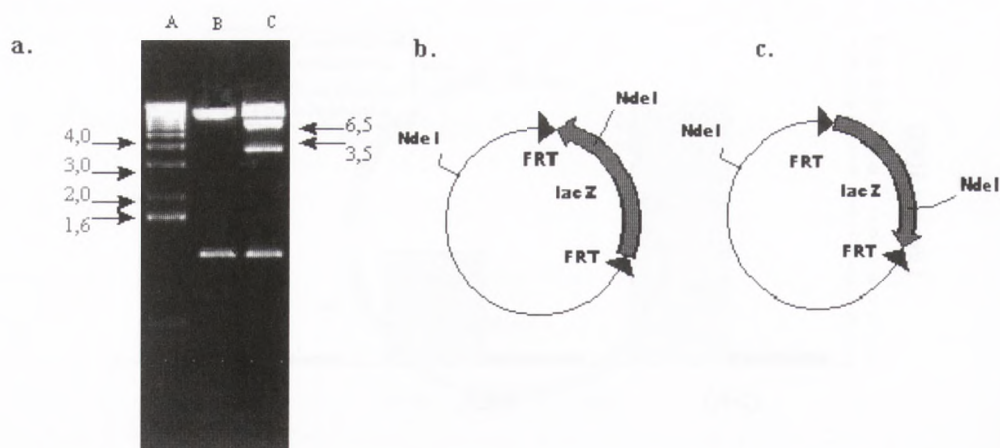
3.2. Indukcja genu reporterowego w komórkach eukariotycznych

Miarą poziomu ekspresji genu w komórce była aktywność β -galaktozydazy wyrażona jako aktywność właściwa enzymu (U/mg białka komórkowego). Dla wszystkich przebadanych linii komórkowych transfekowanych plazmidami p6200lacZ-L (gen w orientacji przeciwnej do promotora) i pOG44 (niosącym gen *FLP*) uzyskano kilkudziesięciokrotnie wyższy poziom ekspresji niż w przypadku, gdy komórkom nie dostarczono genu rekombinazy Flp (rys. 4). Równocześnie ekspresja ta była co najmniej na takim samym poziomie, jak w przypadku komórek transfekowanych plazmidem p6200lacZ-R, w którym gen reporterowy znajduje się w orientacji umożliwiającej transkrypcję.

Pomimo przyjętego założenia, że ustawienie genu w orientacji przeciwnej do promotora ma wyeliminować nieswoistą ekspresję, zaobserwowano niski poziom niekontrolowanej ekspresji związany najprawdopodobniej z obecnością sekwencji SV40ori (10) znajdującej się bezpośrednio za kasetą *FRT-GEN-FRT*.

3.3. Kontrola działania kasety *FRT-GEN-FRT* w plazmidach serii p6200

W celu pokazania, że obserwowana indukcja ekspresji jest wynikiem inwersji genu w plazmidach serii p6200, przeprowadzono doświadczenie potwierdzające ten fakt w układzie prokariotycznym. W komórkach bakteryjnych w wyniku indukcji cTc następuje ekspresja Flp, która powoduje inwersję *lacZ* w plazmidach p6200lacZ. Obrazuje to analiza restrykcyjna wy-



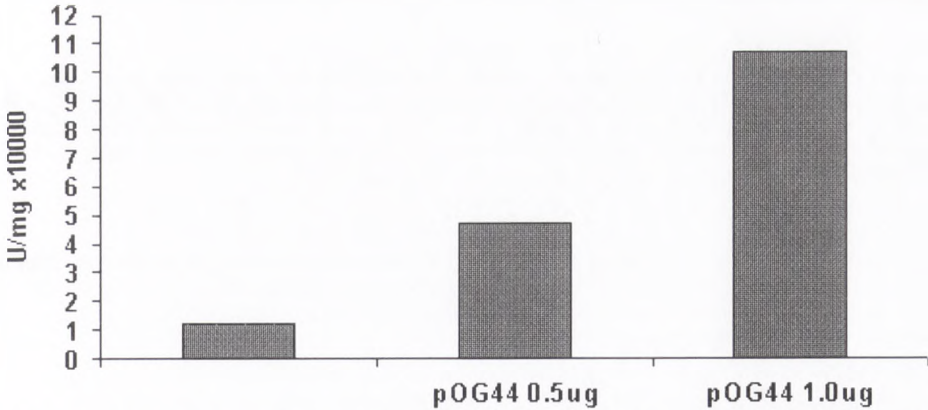
Rys. 5. Inwersja genu *lacZ* w plazmidzie p6200*lacZ*-L, którym stransformowano bakterie *E. coli* zawierające gen rekombinazy Flp pod kontrolą promotora tetracyklinowego: a) elektroforeza na 0,8% żelu agarozowym trawionych enzymem Nde I plazmidowych DNA wyizolowanych z bakterii hodowanych bez cTc (ścieżka B) — 2 prążki 1,5 kb i 8,5 kb oraz z cTc (ścieżka C) — dwa dodatkowe prążki 3,5 kb i 6,5 kb; ścieżka A — marker 1 kb Gibco. Schemat trawienia p6200*lacZ*-L enzymem Nde I przed b) i po inwersji c).

izolowanego z bakterii DNA plazmidowego. Po indukcji, oprócz prążków wynikających z obecności plazmidu p6200*lacZ*-L (1,3 kb i 8,7 kb) pojawiają się dwa dodatkowe prążki odpowiadające fragmentom o długości 3,5 kb i 6,5 kb charakterystyczne dla zinvertowanego plazmidu (rys. 5). Jest to dowód, że plazmidy p6200 zawierają funkcjonalną kasetę *FRT*-*polilinker*-*FRT*, a zatem po indukcji następuje inwersja sekwencji DNA, umieszczonej wcześniej w *polilinkerze* pomiędzy sekwencjami *FRT*. Fakt, że nie cały DNA ulega zinvertowaniu, czyli współistnienie „starych” i „nowych” prążków, jest cechą charakterystyczną systemu Flp/*FRT* (11).

3.4. Indukcja ekspresji *lacZ* w komórkach linii HEK · *lacZ* · L

Pokazano, że Flp może indukować ekspresję genu *lacZ* w komórkach stabilnie transfekowanych plazmidem p6200*lacZ* · L. Badając poziom ekspresji genu reporterowego w komórkach HEK · *lacZ* · L uzyskano wzrastającą aktywność β -galaktozydazy przy wzroście ilości plazmidu pOG44, użytego do transfekcji (rys. 6). Analiza plazmidowego lub genomowego DNA z komórek eukariotycznych powinna potwierdzić, że pojawienie się produktu genu *lacZ* pod wpływem działania Flp jest wynikiem inwersji tego genu.

Na podstawie uzyskanych wyników widzimy, że wektor zawierający kasetę silny promotor-*FRT*-*polilinker*-*FRT* może stanowić podstawę wydajnego systemu ekspresyjnego. Podobny system ekspresyjny, ale oparty na wycinaniu fragmentu DNA, uniemożliwiającego ekspresję genu, opracował O’Gorman (6). Takie podejście wymaga jednak konstruowania nowego wektora dla każ-



Rys. 6. Indukcja ekspresji β -galaktozydazy w komórkach linii transgenicznej HEK \cdot lacZ \cdot L. Transfekcja komórek plazmidem pOG44 powoduje indukcję ekspresji genu mierzoną aktywnością β -galaktozydazy w lizatach komórkowych.

dego genu. Opisany przez nas system umożliwia łatwe wklonowanie dowolnego genu w polilinker znajdujący się pomiędzy sekwencjami *FRT*. Ponadto jego zaletą jest możliwość zastosowania dowolnego promotora konstytutywnego. Prowadzone są również prace nad wyeliminowaniem niekontrolowanej ekspresji genu, która wystąpiła w niewielkim stopniu pomimo założenia, że ustawienie genu w orientacji odwrotnej względem promotora wyklucza całkowicie ekspresję genu. Wspomniano wcześniej, że niekontrolowaną ekspresję genu przypisuje się obecności sekwencji *SV40ori* znajdującej się tuż za kasetą *FRT-polilinker-FRT*. Doświadczenie polega na wymianie kasety *SV40ori-Neo* w wektorze p6200LacZ \cdot L na kasetę *TK-Hygro*, a zatem wprowadzeniu genu dla fosfotransferazy hygromycyny, warunkującej oporność na hygromycynę, pod słabym, jednokierunkowym promotorem kinazy tymidynowej (z wirusa HSV-1). Dzięki temu wyeliminowana zostanie niekontrolowana ekspresja, przy założeniu, że jest ona wynikiem dwukierunkowej aktywności silnego promotora *SV40ori*.

Minusem systemu jest konieczność kotransfekcji komórek dwoma plazmidami, a także brak możliwości wyłączania ekspresji genu. Obecnie trwają prace nad rozwiązaniem tego problemu, poprzez umieszczenie genu *FLP* pod kontrolą słabego, indukowanego promotora i oparciu całego systemu na jednym wektorze. Ułatwi to w przyszłości pracę z systemem poprzez uniknięcie kotransfekcji oraz możliwość bezpośredniej indukcji ekspresji rekombinazy *F1p*.

Praca była finansowana z grantu nr 4 PO5A 027 11 z Komitetu Badań Naukowych.

Literatura

1. Lutz R., Bujard H., (1997), *Nucleic Acids Res.*, 25, 1203.
2. Gossen M., Bonin A. L., Bujard H., (1993), *Trends Biochem. Sci.*, 18, 471-475.
3. Gossen M., Bujard H., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5547-5551.
4. No D., Yao T.-P., Evans R. M., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 3346-3351.
5. Kilby N. J., Snaith M. R., Murray J. A., (1993), *Trends Genet.*, 9, 413-421.
6. Broach J. R., Hicks J. B., (1980), *Cell*, 21, 501-508.
7. O'Gorman S., Fox D. T., Wahl G. M., (1991), *Science*, 251, 1351-1355.
8. Sęktas M., Szybalski W., (1998), *Molecular Biotechnology*, 9, 17-24.
9. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., (1989), *Molecular Cloning: A laboratory Manual* 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY.
10. Hertz G. Z., Mertz J. E., (1988), *Virology*, 163, 579-590.
11. Futcher, A. B., (1988), *Yeast*, 4, 27-40.

Eukaryotic expression system operating on the basis of Flp recombinase activity

Summary

Eukaryotic expression vectors are usually used for basic research and gene therapy. The major drawback of all vectors is a nonspecific leakage of the message which significantly hampers the use of vectors for the expression of cytotoxic proteins or enzymes. Production of proteins in eukaryotic cells would be facilitated by the use of very strong inducible promoters that are well controlled. Such expression systems are presently not available because eukaryotic inducible promoters are usually weak.

We designed eukaryotic inducible expression system in which strong expression of reporter gene was achieved. Our system is based on the activity of yeast site-specific recombinase Flp which recognizes two *FRT* sequences and inverts the orientation of the DNA fragment present between them. When placed in reverse orientation in relation to the promoter, a gene of interest may not be expressed, whereas inversion of such a gene gives full expression. We introduced the gene of interest between *FRT* sequences and used Flp for the inversion of the gene from reverse to forward orientation. This way, a strong constitutive promoter switches to the inducible mode while preserving its strong promoting activity.

Key words:

eukaryota, expression system, Flp recombinase.

Adres do korespondencji:

Michał Bereta, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków, e-mail: michalb@mol.uj.edu.pl