



## Regulacja ekspresji genów w wektorach plazmidowych: system zależny od doksycykliny i regulowany przez niedotlenienie

Sławomir Gołda\*, Paulina Kucharzewska\*, Jarosław Cisowski,  
Urszula Florczyk, Anna Zagórska, Agnieszka Jaźwa,  
Agnieszka Łoboda, Alicja Józkowicz, Józef Dulak

Zakład Biotechnologii Medycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Bio-  
technologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

### Regulation of gene expression in plasmid vectors: doxocyclin-de- pendent and hypoxia-regulated systems

#### Summary

Regulation of gene expression in gene therapy is crucial for obtaining the therapeutic effects, thanks to limitation of transgene activity to the selected cells in a given time. In this paper we have focused on plasmid expression systems regulated by doxycycline or hypoxia. We have described in details the structure, regulatory elements and biological applications of 1) the modified, commercially available Tet-On system, expressing doxycycline-controlled  $\beta$ -galactosidase and 2) hypoxia-activated FGF-4/VEGF expression plasmid containing the hypoxia responsive sequence. The presented expression systems can also be used in viral vectors, enabling not only regulated, but also high and long-term expression of transgenes.

#### Key words:

Tet-On system, Tet-Off system, HIF-1, hypoxia, regulable gene expression, gene therapy.

#### Adres do korespondencji

Józef Dulak,  
Zakład Biotechnologii  
Medycznej,  
Wydział Biochemii,  
Biofizyki i Biotechnologii,  
Uniwersytet Jagielloński,  
ul. Gronostajowa 7,  
31-271 Kraków;  
e-mail:  
jdulak@mol.uj.edu.pl

## 1. Wstęp

Podstawową cechą, a zarazem ograniczeniem większości wektorów używanych w terapii genowej jest stosowanie promotorów konstytutywnych, nie pozwalających na regulację poziomu

transkrypcji transgenu. Obecnie coraz częściej sięga się jednak po sekwencje promotorowe, które mogą być aktywowane przez czynniki wewnętrzne lub przez podawane leki, umożliwiając regulację ekspresji transgenu i jego indukcję tylko w określonych komórkach i sytuacjach patofizjologicznych.

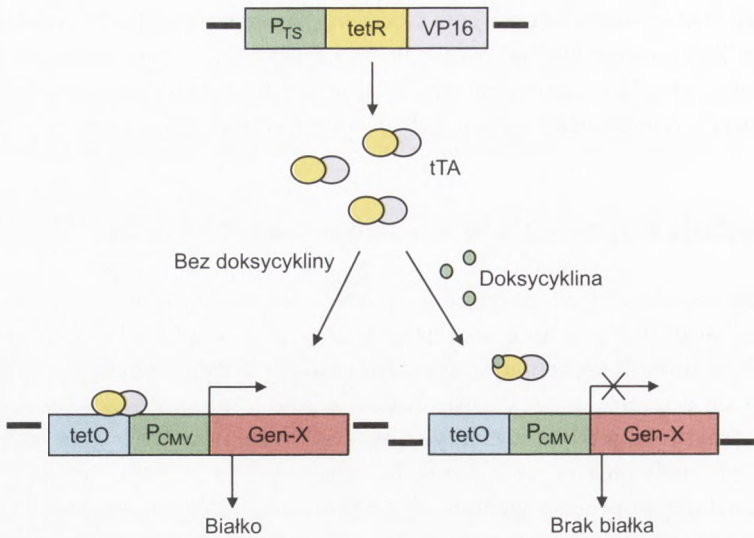
### 1.1. Regulacja ekspresji genów w systemie Tet-Off i Tet-On

Regulowaną ekspresję transgenu w wektorze plazmidowym zastosowano po raz pierwszy u bakterii. Niektóre białka uzyskiwane na skalę przemysłową w bakteriach są dla nich w dużych stężeniach toksyczne, zatem geny kodujące pożądane białka uruchamia się dopiero, wówczas gdy hodowla bakteryjna jest już w fazie zaawansowanego wzrostu. W jednym z efektywniejszych systemów tego typu wykorzystano naturalną zdolność niektórych bakterii do oporności na tetracyklinę, antybiotyk hamujący translację poprzez wiązanie się do rybosomu. Wykazano, że ulegający konstytutywnej ekspresji represor promotora dla białka wypompowującego tetracyklinę z komórki jest inaktywowany po związaniu z tetracykliną, co w konsekwencji chroni komórki bakteryjne przed antybiotykiem. Tę zależność wykorzystano do konstrukcji bakteryjnego systemu regulowanej ekspresji transgenu, a następnie przeniesiono ją na modele eukariotyczne.

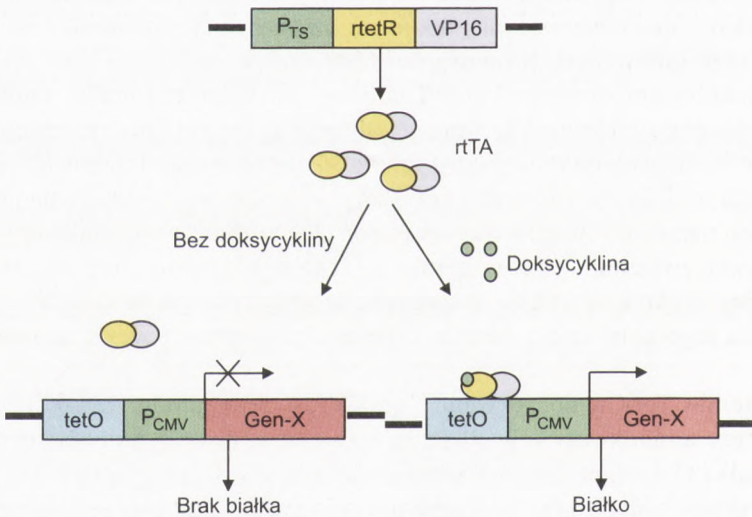
Istnieją dwa modele regulacji ekspresji genów przez antybiotyki z grupy tetracyklin: Tet-Off (1) i Tet-On (2). W systemie Tet-Off ekspresja genu jest hamowana tak długo dopóki antybiotyk nie zostanie usunięty z pożywki. W systemie Tet-On do aktywacji transgenu dochodzi po dodaniu doksycykliny (antybiotyku z grupy tetracyklin), a maksymalna ekspresja jaką udaje się uzyskać w tym systemie jest porównywalna do nieregulowanych promotorów CMV (3).

W plazmidowym systemie Tet-Off istotne znaczenie ma białko regulatorowe, którego sekwencja kodowana jest przez bakteryjny gen TetR oraz fragment genomu wirusa HSV kodującego aktywującą domenę VP16 (4). Fuzja domeny VP16 do TetR przekształca inhibitor w aktywator transkrypcji, a białko powstające na jego matrycy i noszące nazwę tTA (ang. *tetracycline-controlled transactivator*) indukuje ekspresję genu poprzez związanie się do operatora tet-O (rys. 1). Pojawienie się w komórce doksycykliny blokuje ekspresję transgenu, gdyż antybiotyk wiążąc się z białkiem tTA zmienia jego konformację uniemożliwiając przyłączenie się do promotora tetO (rys. 1).

W systemie Tet-On do sekwencji TetR-VP16 doczepiony został fragment kodujący cztery aminokwasy (rTetR) (2,5), co w konsekwencji odwróciło całkowicie funkcję białka tTA zmieniając to białko w aktywator rtTA (ang. *reverse TA*). Przy braku doksycykliny białko to nie może przyłączyć się do promotora tetO i nie dochodzi wówczas do ekspresji transgenu. Dopiero dodanie antybiotyku zmienia konformację rtTA, umożliwiając aktywację promotora tetO i w konsekwencji indukcję ekspresji genu. Typowy system Tet-On przedstawiono na rysunku 2.



Rys. 1. Schemat działania systemu ekspresyjnego Tet-Off regulowanego przez doksycyklinę. Przy braku antybiotyku białko tTA wiąże się do sekwencji aktywatorowej tetO w obrębie promotora CMV. Podanie doksycykliny powoduje zmianę konformacji białka tTA przez jego związanie z antybiotykiem i zahamowanie transkrypcji.



Rys. 2. Schemat działania systemu ekspresyjnego Tet-On regulowanego przez doksycyklinę. Dodatek antybiotyku umożliwia białku rtTA wiązanie do sekwencji aktywatorowej tetO w obrębie promotora CMV. Brak doksycykliny powoduje zahamowanie transkrypcji na skutek utraty przez rtTA zdolności do wiązania się do promotora.

W praktyce, aby ograniczyć tzw. przeciekanie plazmidu (czyli samoistną, niekontrolowaną ekspresję transgenu), do transfekcji komórek używa się często zmodyfikowanego systemu Tet-On. W układzie takim zmniejszenie niekontrolowanej ekspresji osiągnęte jest poprzez wprowadzenie dodatkowego represora, tzw. tetS. System ten został wykorzystany w obecnej pracy, a schemat jego działania jest omówiony w rozdz. 2.

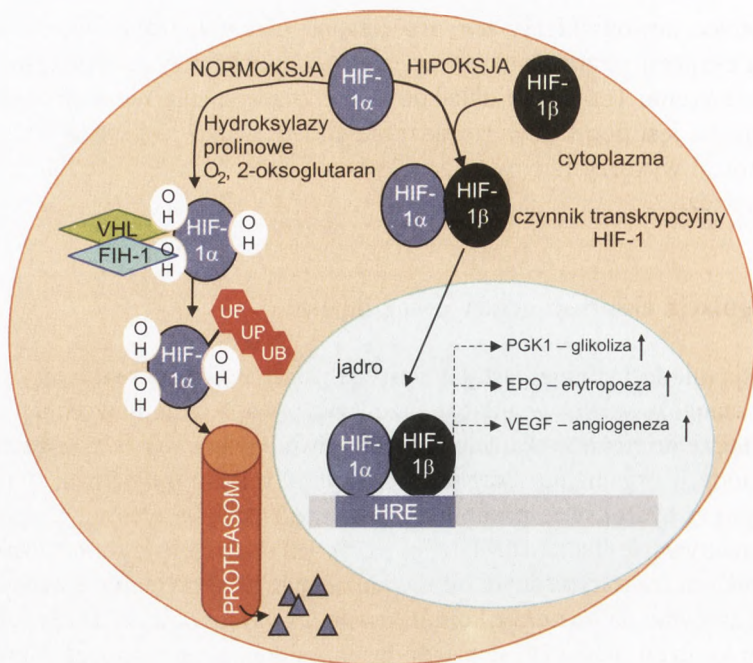
## 1.2. Regulacja ekspresji genów przez hipoksję

Hipoksja (niedotlenienie) jest jednym z istotnych bodźców regulujących ekspresję genów zaangażowanych w angiogenezę, czyli powstawanie nowych naczyń krwionośnych. Stężenie tlenu w tkankach ulega nieustannym wahaniom w zależności od stanu i kondycji organizmu. Przy prawidłowym ciśnieniu parcjalnym tlenu (w normoksji) system hydroksylaz prolinowych hamuje ekspresję wybranych grup genów poprzez inaktywację białka HIF-1 (zob. (6,7)). HIF-1 (ang. *hypoxia inducible factor-1*) jest czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym za utrzymanie równowagi energetycznej zarówno na poziomie komórkowym jak i systemowym. Do procesów podlegających kontroli białka HIF-1 należą m. in. glikoliza, erytropoeza i angiogeneza (8).

Białko HIF-1 to heterodimer zbudowany z podjednostki HIF-1 $\alpha$  i HIF-1 $\beta$  zdolnych do wiązania DNA (9). Oba białka wytwarzane są konstytutywnie, ale HIF-1 $\beta$  jest podjednostką stabilną, natomiast HIF-1 $\alpha$  jest formą o czasie półtrwania krótszym niż 5 minut w warunkach normoksji. Za rozpad podjednostki HIF-1 $\alpha$  odpowiedzialna jest ubiquitynacja prowadząca do degradacji białka w proteasomie (10) (rys. 3). U podstaw tego procesu leży posttranslacyjna modyfikacja tej podjednostki poprzez zależną od tlenu hydroksylację reszt proliny w pozycjach 402 i 564 przez hydroksylazy prolinowe (11). Taka hydroksylacja stanowi sygnał do ubiquitynacji, kierując podjednostkę HIF-1 $\alpha$  do degradacji z udziałem białka VHL (von Hippel-Lindau) będącego fragmentem rozpoznawczym ligazy wiążącej ubiquitynę E3 z białkiem przeznaczonym do degradacji (12,13).

W warunkach hipoksji zarówno hydroksylacja proliny jak i kierowana przez domenę VHL degradacja HIF-1 $\alpha$  są mało wydajne, co w konsekwencji prowadzi do wzrostu stężenia HIF-1 $\alpha$  w komórce. Stabilna podjednostka HIF-1 $\alpha$  dimeryzuje z HIF-1 $\beta$  i razem tworzą kompleks transkrypcyjny wiążący się do genomowej sekwencji HRE (ang. *hypoxia responsive element*) w obrębie promotora genu regulowanego przez hipoksję (rys. 3).

Pośród wielu genów indukowanych przez HIF-1 można wyróżnić przede wszystkim geny zaangażowane w angiogenezę takie jak czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*), receptor VEGFR-1 (flt-1), neuropilinę-1, angiopoetyny oraz indukowalną syntazę tlenu azotu (iNOS) (zob. (6,14)).



Rys. 3. Schemat szlaków sygnałowych białka HIF-1. UB – ubikwityna, HIF-1 – *hypoxia inducible factor* –1, HRE – *hypoxia responsive element*, EPO – erytropoetyna, PGK1 – kinaza fosfoglicerynianu-1, VHL – białko von Hippel-Lindau, FIH – czynnik hamujący HIF-1 (*factor inhibiting HIF-1*), VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń, HIF-1 – czynnik indukowany przez niedotlenienie-1.

Inaczej niż w przypadku systemu Tet-On używanego głównie *in vitro* oraz u zwierząt, systemy regulowanej ekspresji genów oparte na białku regulatorowym HIF-1 $\alpha$  i sekwencji HRE mogą stanowić obiecujące narzędzie w terapii genowej u ludzi. Wektory zawierające czynniki proangiogenne pod kontrolą sekwencji HRE mogłyby stać się pomocne np. w leczeniu choroby niedokrwiennej serca lub w niedokrwieniu kończyn u ludzi.

Celem pracy było przygotowanie plazmidów i zbadanie możliwości regulowania ekspresji transgenów *in vitro* przez tetracyklinę w systemie Tet-On i przez niedotlenienie poprzez zastosowanie sekwencji regulatorowej HRE.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Hodowle komórek NIH 3T3 oraz HEK293

Wszystkie eksperymenty, w których wykorzystano regulowany przez doksycyklinę system ekspresji genów Tet-On wykonane zostały na linii mysich fibroblastów

NIH 3T3 zakupionych w *American Type Tissue Culture Collection* (Manassas, VA, USA). Komórki te hodowano w pożywce DMEM HG (4,5 g/L glukozy; Gibco) wzbogaconej w 10% surowicę wołową oraz penicylinę (100 U/mL) i streptomycynę (10 µg/mL).

Do badania poziomu ekspresji genów FGF-4 oraz VEGF-A pochodzącej z regulowanego przez niedotlenienie plazmidu pTR-UF-22-HRE-minCMV-FGF4-ires-VEGF wykorzystano linię komórkową HEK-293 (ang. *human embryonic kidney epithelial cell line*, Stratagene), dostarczoną przez Stefana Kochanka (Ulm, Niemcy). Komórki te hodowano podobnie jak NIH 3T3.

## 2.2. Konstrukcja wektora pTR-UF-22-HRE-minCMV-FGF4-ires-VEGF zawierającego geny FGF4 i VEGF indukowane przez hipoksję

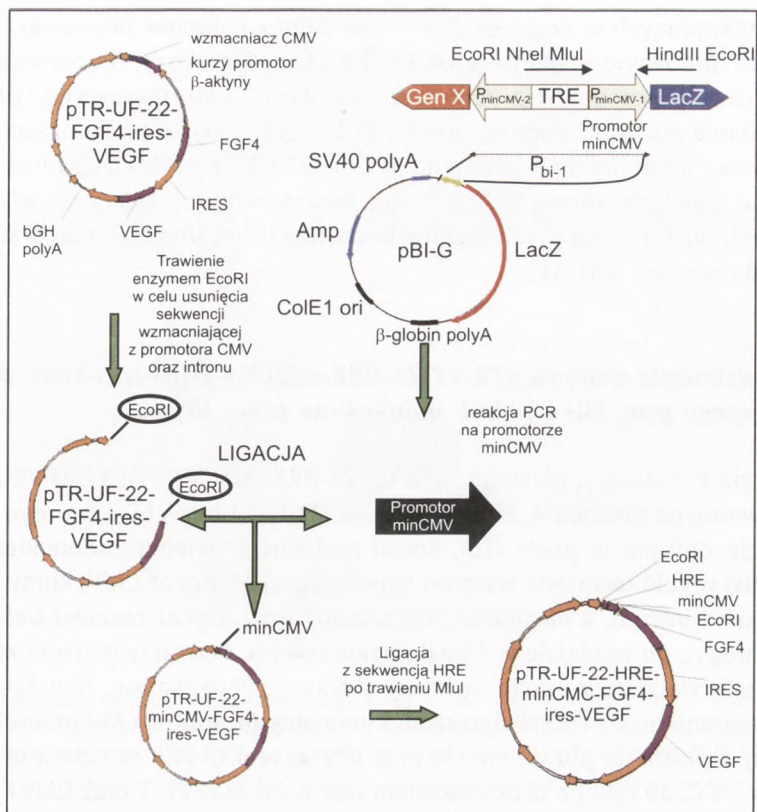
Strategia konstrukcji plazmidu pTR-UF-22-HRE-minCMV-FGF4-ires-VEGF została przedstawiona na rysunku 4. Plazmid pTR-UF-22-FGF4-ires-VEGF, którego dokładną konstrukcję opisano w pracy (15), został poddany trawieniu endonukleazą EcoRI (Fermentas) w celu usunięcia wstawki (zawierającej fragment CMV, kurzy promotor  $\beta$ -aktyny oraz intron), a następnie oczyszczony przy użyciu zestawu Gel-Out (A&A Biotechnology), po rozdzielaniu w 1% żelu agarozowym. Przecięty plazmid został poddany defosforylacji przy użyciu fosfatazy (Antarctic Phosphatase, New England Biolabs) w celu uniknięcia recykularyzacji. Minimalny promotor CMV (minCMV) został powielony z plazmidu pBI (Clontech) przy użyciu reakcji PCR (temperatura łączenia starterów 54°C, 30 cykli) z zastosowaniem starterów nCMV1\_F oraz CMV1\_R (tab.).

Tabela

Para starterów użytych do klonowania promotora minCMV

Starter	Sekwencja
nCMV1_F	5' TATGAATTGGCTAGCACGCGTGTCCGAGTAGGCGGTGTACG 3'
CMV1_R	5' ACGGAATTC AAGCTTGTACCGAGCTCGGATTCCGGG 3'

Produkt reakcji PCR rozdzielono w 2% żelu agarozowym, wyizolowano zestawem Gel-Out (A&A Biotechnology), a następnie poddano ligacji (ligazą T4; New England Biolabs) z przeciętym uprzednio plazmidem pTR-UF-22-FGF4-ires-VEGF. Mieszaninę ligacyjną transformowano kompetentne komórki *E. coli* (X-Gold; Stratagene) metodą z zastosowaniem szoku termicznego. Po wyizolowaniu plazmidu z transformantów potwierdzono zarówno obecność jak i prawidłową orientację promotora minCMV reakcją PCR. W kolejnym etapie plazmid pTR-UF-22-minCMV-FGF4-ires-VEGF został poddany trawieniu enzymem MluI (Promega), a następnie ponownie rozdzie-



Rys. 4. Strategia konstrukcji plazmidu pTR-UF-22-HRE-minCMV-FGF4-ires-GFP. Szczegółowy opis w tekście.

**Oligo HRE górna nić**

5' CGCGTGCTGTGCAGGACGTGACAGCTGTGCAGGACGTGACAGCTGTGCAGGACGTGACAA 3'

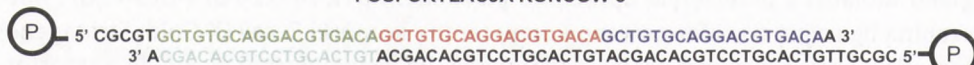
**Oligo HRE dolna nić**

5' CGCGTTGTCACGTCTGCACAGCTGTACAGTCTGCACAGCTGTACAGTCTGCACAGCA 3'

**HYBRYDYZACJA**

5' CGCGTGCTGTGCAGGACGTGACAGCTGTGCAGGACGTGACAGCTGTGCAGGACGTGACAA 3'  
3' ACGACAGTCTGCAGTGTACGACAGTCTGCAGTGTACGACAGTCTGCAGTGTGCGC 3'

**FOSFORYLACJA KOŃCÓW 5'**



Rys. 5. Oligonukleotydy kodujące 3xPGK1 HRE z miejscami cięcia dla MluI. Oba oligonukleotydy uzyskano drogą syntezy chemicznej, a następnie poddano hybrydyzacji i fosforylacji na końcach 5', niezbędnej do wklonowania fragmentu do plazmidu (rys. 4).

lony w 1% żelu agarozowym, wycięty i oczyszczony zestawem Gel-Out (A&A Biotechnology) oraz poddany defosforylacji. Do dalszego klonowania użyto dwóch oligonukleotydów kodujących sekwencję 3xPGK1 HRE, sklonowaną z promotora genu kinazy fosfoglicerynowej – PGK1 (16) i zawierających na obydwu końcach miejsce restrykcyjne dla enzymu MluI (rys. 5). Obydwa nukleotydy wymieszano ze sobą i poddano denaturacji w 95°C przez 10 minut, a następnie schłodzono do 50°C w tempie 1°C/min. Po osiągnięciu 50°C obniżono temperaturę skokowo do 4°C.

Tak przygotowaną sekwencję HRE poddano fosforylacji z użyciem kinazy polinukleotydowej T4 (New England Biolabs), a następnie wklonowano do uprzednio strawionego MluI plazmidu pTR-UF-22-minCMV-FGF4-ires-VEGF. Obecność wstawki HRE, po wcześniejszej amplifikacji plazmidu w komórkach bakterii X-Gold, potwierdzona została analizą restrykcyjną oraz sekwencjonowaniem.

### **2.3. Przejściowa transfekcja komórek HEK293 wektorami plazmidowymi (system regulowany przez niedotlenienie)**

Dzień przed transfekcją komórki wysiewano na szalki 24-dółkowe, tak aby następnego dnia uzyskać konfluencję 50-70%. Transfekcje wykonywano za pomocą oligodendrymeru SuperFect (Qiagen) zgodnie z zaleceniami producenta. W tym celu w probówce przygotowywano mieszaninę transfekcyjną składającą się z: 1 µg plazmidowego DNA, 60 µL pożywki wolnej od surowicy i antybiotyków oraz 5 µL odczynnika SuperFect. Po 10 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej do mieszaniny dodawano 350 µL pełnej pożywki i podawano na komórki (410 µL/dółek). Po upływie 6 godzin usuwano mieszaninę transfekcyjną i po przepłukaniu komórek PBS dodawano 0,5 mL świeżej pożywki. Komórki hodowano przez następne 48 h.

## **3. Stymulacja HIF-1 w komórkach HEK293 – inkubacja z DMOG**

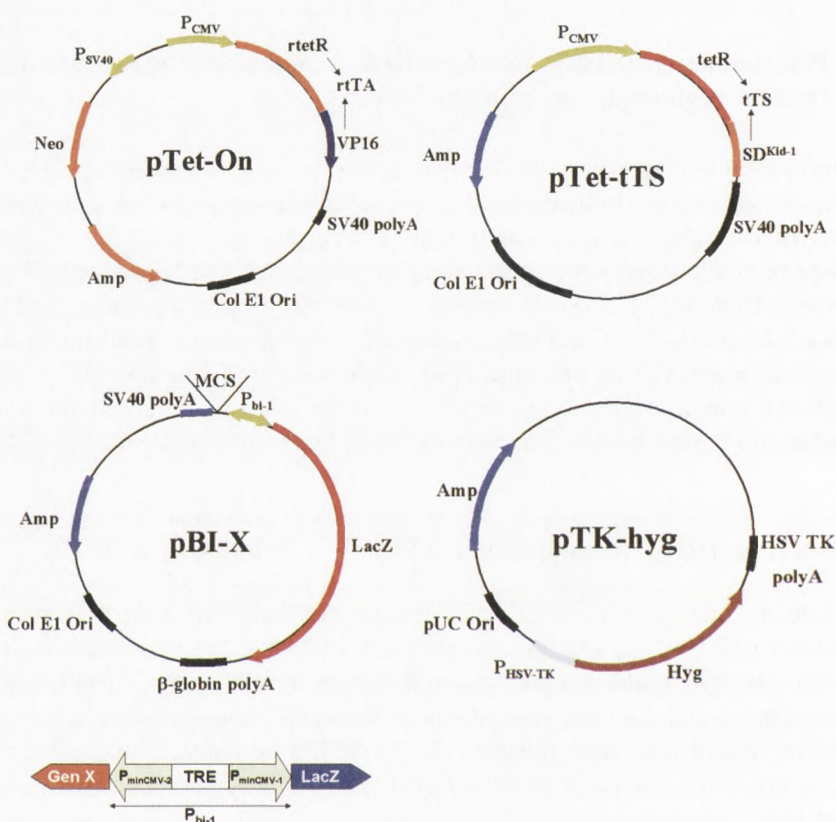
W celu dokonania indukcji czynnika transkrypcyjnego HIF-1 24 h po transfekcji plazmidami pTR-UF-22-minCMVFGF4-ires-VEGF i pTR-UF-22-HRE-minCMV-FGF4-ires-VEGF komórki były poddawane działaniu dimetylooksoalliloglicyny, (DMOG 500 µM; Alexis Biochemicals), będącej czynnikiem imitującym hipoksję poprzez hamowanie aktywności hydroksylaz prolinowych (17). Po 24 h od dodania DMOG zbierano pożywki, w których oznaczano poziom FGF-4 oraz VEGF-A przy zastosowaniu testu ELISA (R&D).



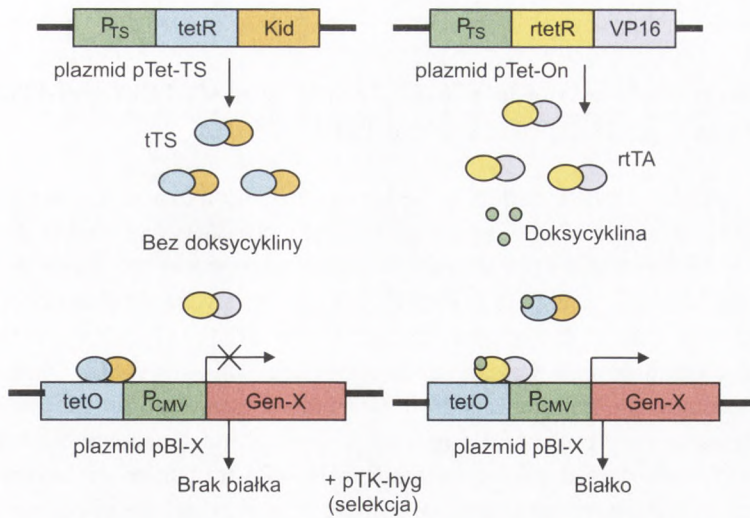
#### 4. Stabilna transfekcja komórek NIH 3T3 – zmodyfikowany system Tet-On regulowany przez doksycylinę

Do transfekcji komórek NIH 3T3 użyto gotowego zestawu plazmidów firmy Clontech. W zestawie tym znajdowały się 4 plazmidy: pTet-On, pBI-X, pTet-TS i pTK-hyg (rys. 6). Wszystkie transfekcje przeprowadzono na komórkach rosnących w butelkach o powierzchni 25 cm<sup>2</sup>. Do pierwszej transfekcji użyto 0,5 µg plazmidu pTet-On oraz 5 µg plazmidu pTet-TS.

W plazmidzie pTet-On pod kontrolą pełnego promotora CMV znajduje się gen białka rtTA, które pod nieobecność doksycyliny nie jest w stanie wiązać się z operatorem Tet-O i aktywować transkrypcji genu wprowadzonego w plazmidzie pBI-X.



Rys. 6. Plazmidy użyte w doświadczeniach z czteroplazmidowym zmodyfikowanym systemem Tet-On. A. Plazmid pTet-On koduje aktywatorowe białko rtTA, aktywowane po dodaniu doksycyliny. B. Plazmid pTet-TS koduje białko inhibitorowe tTS, ulegające inaktywacji po dodaniu doksycyliny. C. Plazmid pBI-X zawiera sekwencję β-galaktozydazy oraz sekwencję MCS, dzięki której do plazmidu można wprowadzić dowolny gen X. D. Plazmid pTK-hyg koduje białko oporności na hygromycynę umożliwiające selekcję komórek opornych na ten antybiotyk.



Rys. 7. Schemat działania zmodyfikowanego systemu ekspresyjnego Tet-On/TetS. Dodatek antybiotyku umożliwia białku rtTA wiązanie się do sekwencji aktywatorowej tetO i jednocześnie inaktywuje białko inhibitora transkrypcji tTS wiążące się w tym samym miejscu. Usunięcie doksycykliny powoduje odłączenie się białka rtTA, aktywację inhibitora tTS i zahamowanie transkrypcji genu X.

W celu uniknięcia przeciekania z plazmidu pBI-X genu X dodatkowo zastosowano kotransfekcję z drugim plazmidem pTet-TS kodującym białko tTS hamujące transkrypcję pod nieobecność doksycykliny. Białko tTS składa się z aktywatora tetR połączonego z hamującą domeną  $SD^{Kid-1}$ . Procedurę transfekcji wykonano stosując oligodendrymery SuperFect jak przy transfekcji przejściowej.

Po około trzech tygodniach selekcji w pożywce zawierającej 450  $\mu\text{g}/\text{mL}$  genetycyny (G418; Gibco) komórki odporne na antybiotyk, czyli zawierające plazmid pTet-On z opornością na neomycynę, poddano kolejnej kotransfekcji, do wykonania której użyto 5  $\mu\text{g}$  plazmidu pBI-X kodującego  $\beta$ -galaktozydazę (gen reporterowy) i wklonowany w miejsce MCS inny transgen (praca w przygotowaniu) oraz 0,1  $\mu\text{g}$  plazmidu pTK-hyg umożliwiającego niezależną selekcję pozytywnych klonów w obecności hygromycyny (rys. 6).

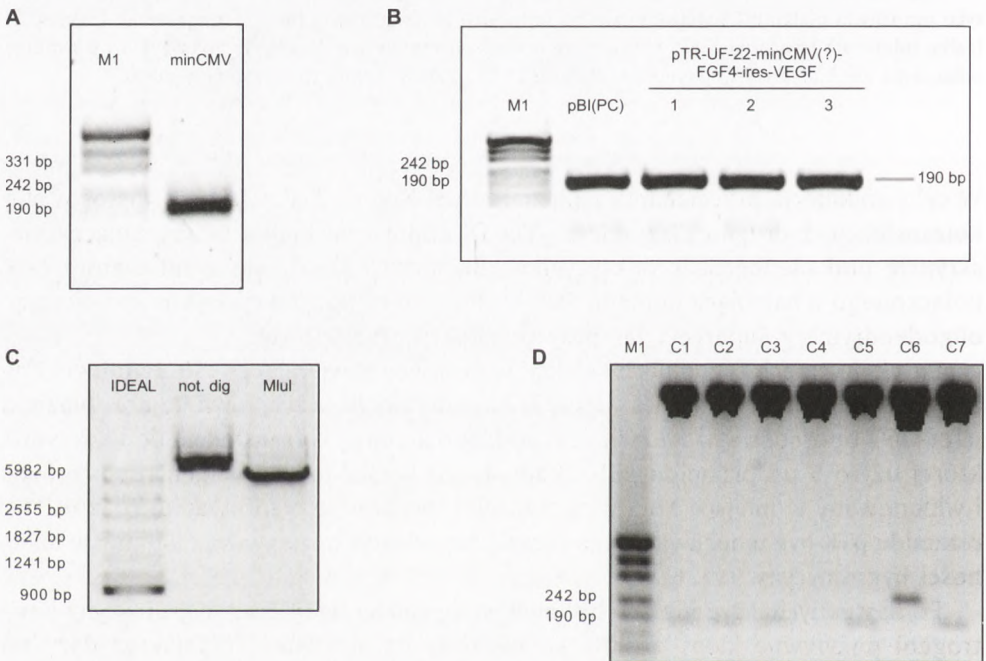
Po następnych 3 tygodniach hodowli w obecności G418 oraz hygromycyny (Invitrogen) pozytywne klony zostały sprawdzone na aktywność  $\beta$ -galaktozydazy po podaniu różnych dawek doksycykliny (Sigma). Ogólny schemat działania uzyskanego w ten sposób systemu Tet-On/Tet-S przedstawiono na rysunku 7.

**Analiza statystyczna.** Doświadczenia wykonywano w duplikatach i powtarzano co najmniej dwukrotnie. Istotność statystyczną sprawdzano testem t-studenta.

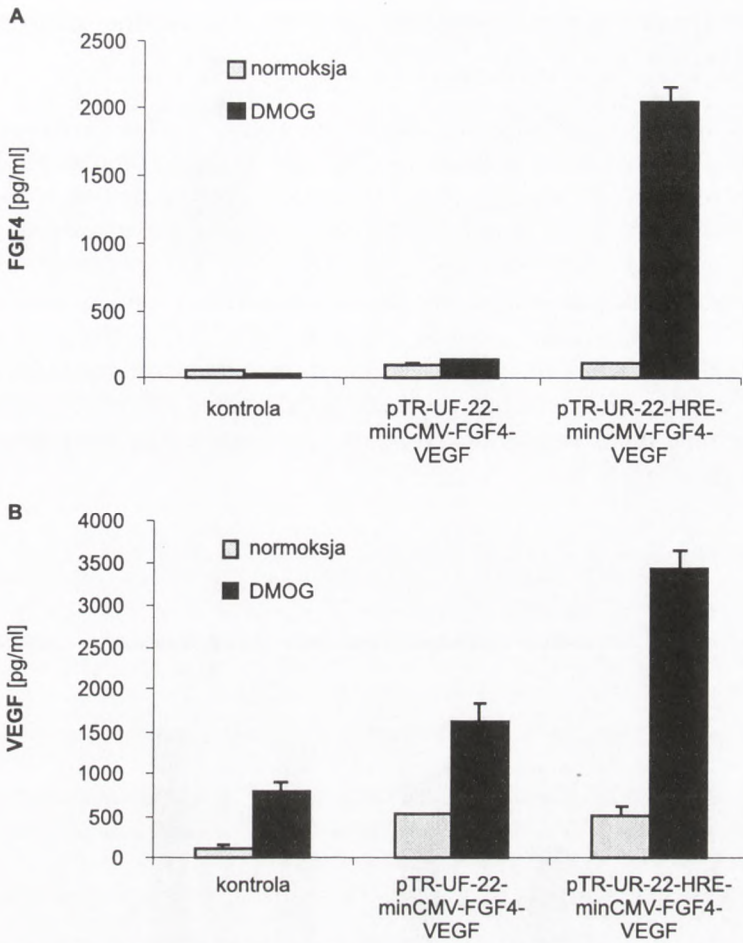
## 5. Wyniki

### 5.1. Wykorzystanie plazmidu pTR-UF-22-HRE-minCMV-FGF4-ires-VEGF do regulowanej przez DMOG ekspresji FGF4 i VEGF-A

Wektor pTR-UF-22-HRE-minCMV-FGF4-ires-VEGF skonstruowano według procedury opisanej w rozdz. 2. Po ligacji promotora minCMV (rys. 5,8A) do wektora pTR-UF-22-FGF4-ires-VEGF i transformacji bakterii otrzymano trzy kolonie. Uzyskane z nich plazmidy zostały poddane reakcji PCR w celu sprawdzenia obecności i orientacji wstawki (rys. 8B) z zastosowaniem starterów nCMV1\_F, CMV1\_R (tab.) oraz FGF\_R (komplementarnego do fragmentu sekwencji FGF-4) (rys. 8C). Okazało się, że wszystkie analizowane kolonie zawierały plazmidy z wstawką o prawidłowej orientacji. W następnym etapie plazmid poddano trawieniu endonukleazą MluI (rys. 5,8D) i połączono z uprzednio uzyskaną sekwencją HRE. Po transformacji bakterii uzyskano 7 koloni, które następnie poddano analizie restrykcyjnej na obecność plazmidu



Rys. 8. Konstrukcja plazmidu pTR-UF-22-minCMV-FGF4-ires-VEGF. A. Elektroforeza DNA promotora minCMV uzyskanego za pomocą PCR z plazmidu pBI. B. Wyniki reakcji PCR sprawdzającej obecność promotora minCMV (190 bp) potwierdzające jego obecność w trzech badanych koloniach. C. Reakcja PCR sprawdzająca obecność promotora minCMV we wszystkich plazmidach (wielkość fragmentu DNA – 705 bp), CF –startery nCMV1\_F i FGF, CR – startery CMV\_R i FGF. D. Elektroforeza strawionego endonukleazą MluI plazmidu pTR-UF-22-HRE-minCMV-FGF4-ires-VEGF (6113 bp). E. Analiza restrykcyjna plazmidów pochodzących z ośmiu kolonii sprawdzająca obecność sekwencji HRE, obecność fragmentu DNA 256 bp w próbce reprezentującej klon 6 wskazuje na obecność wstawki HRE w plazmidzie.



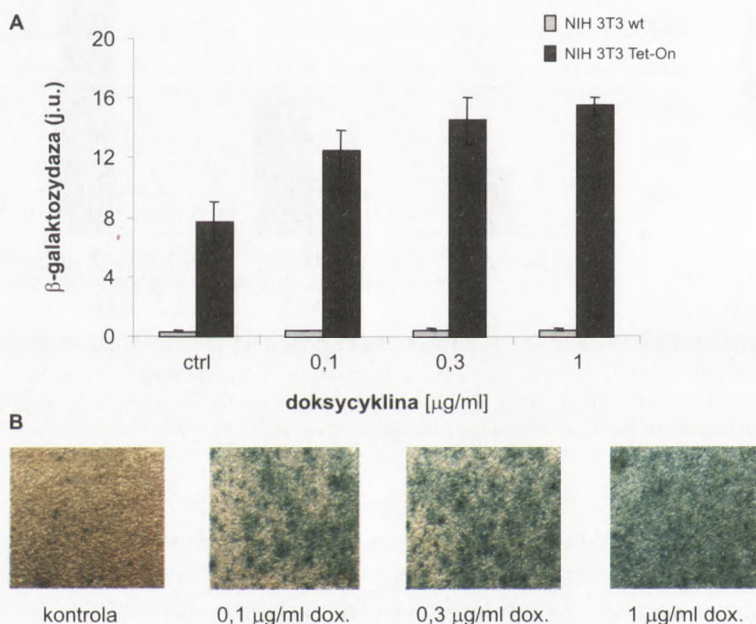
Rys. 9. Test ELISA na obecność białek FGF-4 (A) i VEGF (B) w pożywce znad komórek HEK293 transfekowanych plazmidem pTR-UF-22-HRE-minCMV-FGF4-ires-VEGF. Komórki hodowano w warunkach normoksji oraz stymulowano DMOG (500  $\mu$ M, 24 h) imitującym hypoksję. Kontrolę stanowiły komórki nie transfekowane lub transfekowane plazmidem pTR-UF-22-minCMV-FGF4-ires-VEGF pozbawionym sekwencji HRE. Wyniki pokazują średnią  $\pm$  SD dwóch doświadczeń wykonanych w duplikatach.

pTR-UF-22-HRE-minCMV-FGF4-ires-VEGF z zastosowaniem enzymu EcoRI. Tylko jedna kolonia (numer 6) zawierała pożądaną plazmid (rys. 5,8E). Został on namnożony i użyty do doświadczeń sprawdzających możliwość indukcji ekspresji FGF-4 oraz VEGF.

Pomiary stężenia białek VEGF i FGF-4 w pożywkach zebranych znad komórek HEK293 transfekowanych plazmidem pTR-UF-22-HRE-minCMV-FGF4-ires-VEGF i stymulowanych DMOG przez 24 h (rys. 9A,B) wykazały dużą skuteczność sekwencji HRE regulującej aktywność promotora minCMV. Promotor ten po stymulacji DMOG podniósł 15-krotnie ekspresję FGF-4 i 2-krotnie ekspresję VEGF, w porównaniu z promotorem pozbawionym sekwencji HRE.

## 5.2. Wykorzystanie systemu regulowanego przez doksycyklinę ekspresji genów Tet-On

Komórki NIH 3T3 transfekowano plazmidami pTet-On i pTet-TS, a następnie po selekcji w pożywce z G418 wykonano kolejną transfekcję plazmidem pBI-X (zawierającym gen reporterowy kodujący  $\beta$ -galaktozydazę) oraz plazmidem pTK-hyg (niosącym oporność na hygromycynę). W efekcie otrzymano klony komórek stabilnie zmodyfikowanych, w których ekspresja  $\beta$ -galaktozydazy jest regulowana przez doksycyklinę. Pomiar aktywności  $\beta$ -galaktozydazy w jednym z klonów przedstawiono na rysunku 10. Zaobserwowano indukcję ekspresji  $\beta$ -galaktozydazy po dodaniu antybiotyku, widoczną szczególnie w barwieniu histochemicznym (rys. 10B). Bardziej czuły pomiar spektrofotometryczny wykazał jednak także aktywność tego enzymu w komórkach nie traktowanych doksycykliną, co wskazuje na pewną nieszczelność systemu regulacji (rys. 10A).



Rys. 10. Aktywność  $\beta$ -galaktozydazy w zmodyfikowanej genetycznie linii mysich fibroblastów NIH 3T3 traktowanych doksycykliną. (A) Oznaczenie spektrofotometryczne aktywności  $\beta$ -galaktozydazy. (B) Reakcja histochemiczna z X-gal wykazująca aktywność  $\beta$ -galaktozydazy. Komórki NIH 3T3 stabilnie transfekowane plazmidem z genem lacZ pod kontrolą promotora tetO (Tet-On) oraz komórki nietransfekowane (wt) stymulowano doksycykliną (0,1-1  $\mu\text{g/ml}$ ) przez 24 h, a następnie sprawdzono aktywność  $\beta$ -galaktozydazy. Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SD z 3 eksperymentów, wykonanych w duplikatach. Wartości wyrażone są jako procent kontroli.

## 6. Dyskusja

W prezentowanej pracy opisano dwa systemy regulacji ekspresji genów wykorzystywane w eksperymentalnej terapii genowej. Umożliwiają one uzyskanie ekspresji wprowadzonego transgenu po podaniu antybiotyku doksycykliny lub poprzez indukcję czynnika transkrypcyjnego HIF-1, spowodowaną niedotlenieniem lub stymulacją farmakologiczną.

System regulacji ekspresji genów przez doksycyklinę został przedstawiony na przykładzie indukcji  $\beta$ -galaktozydazy w komórkach NIH 3T3. Gen tego enzymu zawarty jest w plazmidzie pBI posiadającym dodatkowo sekwencję MCS umożliwiającą wklonowanie dowolnego genu, którego ekspresję można regulować analogicznie do ekspresji  $\beta$ -galaktozydazy. Wykorzystując ten wektor można w łatwy sposób włączać i wyłączać badany gen, mając jednocześnie możliwość wizualnej oceny poziomu jego ekspresji poprzez pomiar aktywności  $\beta$ -galaktozydazy. W naszych badaniach system ten wykorzystano do konstrukcji plazmidu zawierającego obok genu reporterowego również sekwencję kodującą reduktazę biliwerdyny (BVR). Umożliwiło to znalezienie odpowiedzi na szereg pytań związanych z funkcją i rolą BVR *in vitro* (praca w przygotowaniu).

Istotne znaczenie dla tego systemu ma wprowadzenie do komórek plazmidu pTet-tTS kodującego białko tTS hamujące tzw. przeciekanie genu z plazmidu pBI. Niestety, w praktyce rzadko udaje się osiągnąć całkowite wyciszenie genu w plazmidzie pBI, co potwierdziły również nasze obserwacje.

System Tet-On zastosowano m.in. do produkcji szczepionek przeciwko wirusowi HIV-1 (18). W tym celu stworzono wariant wirusa, którego replikacja ściśle zależała od poziomu białka aktywatorowego rtTA regulowanego przez doksycyklinę. Dzięki temu replikacja wirusa HIV-rtTA mogła być czasowo włączana przez podanie odpowiednich dawek antybiotyku, co umożliwiało dość ścisłą kontrolę odpowiedzi układu odpornościowego (18).

Innym przykładem zastosowania tego systemu może być wykazanie znaczenia białka c-Src w rozwoju raka piersi. W tym celu stworzono linię komórek MCF7 z indukowaną przez doksycyklinę negatywną, dominującą formą białka c-Src (c-SrcDN). Zbadano zależności pomiędzy białkiem c-Src, a szeregiem białek sygnałowych oraz zaobserwowano, że nadekspresja białka c-SrcDN ogranicza migrację i proliferację komórek. Następnie wykazano, że podanie komórek MCF7 zawierających gen SrcDN do myszy typu *nude* (z upośledzonym układem odpornościowym) prowadziło do rozwoju nowotworu, a jednoczesne podanie doksycykliny bardzo drastycznie ograniczało rozwój guza (19).

W pracach nad plazmidem aktywowanym przez niedotlenienie uzyskano wektor pTR-UF-22-HRE-minCMV-FGF4-ires-VEGF kodujący czynniki angiogenne FGF-4 i VEGF-A. Plazmid ten zawiera syntetyczną sekwencję HRE (3 powtórzenia sekwencji HRE z promotora genu PGK-1) regulującą aktywność promotora minCMV. Taki syntetyczny promotor (HREminCMV), o potencjalnie dużych możliwościach zastosowania

w terapii genowej, powinien wykazywać niską aktywność w normoksji, a wysoką w tkankach niedotlenionych. Niewielka samoistna ekspresja transgenu jest istotna, ponieważ ogranicza ona działanie białka poza tkanką docelową, natomiast wysokie stężenie czynnika terapeutycznego w miejscu pożądanym zwiększa prawdopodobieństwo, że występuje on w dawce wystarczającej do wywołania efektu biologicznego.

Wyniki testu ELISA wykazały dużą skuteczność syntetycznego konstruktu HRE-minCMV, bowiem stymulacja DMOG, związkiem aktywującym HIF-1, prowadziła do 15-krotnego wzrostu stężenia FGF-4 i 2-krotnego VEGF-A. Na podstawie stężenia FGF-4 i VEGF w pożywce stwierdzono również, że podstawowa aktywność konstruktu HRE-minCMV w normoksji jest niska. Warto zauważyć, że w warunkach symulacji niedotlenienia przez DMOG (zahamowania aktywności hydroksylaz prolinowych) poziom VEGF-A był wyższy niż FGF-4. Mogło to wynikać stąd, że aktywowany HIF-1 indukuje ekspresję także endogennego VEGF-A, wykrywanego przez ten sam test ELISA. Endogenny VEGF może być też indukowany w odpowiedzi na samą procedurę transfekcji, dlatego w komórkach kontrolnych transfekowanych plazmidem pozbawionym sekwencji HRE poziom białka VEGF w stosunku do komórek nie transfekowanych był wyższy. Ekspresja FGF-4 w komórkach kontrolnych nie przekraczała natomiast progu detekcji.

Plazmid zawierający geny czynników proangiogennych, takich jak FGF-4 i VEGF-A, pod kontrolą promotora HRE-minCMV mógłby znaleźć zastosowanie na przykład w terapii genowej choroby niedokrwiennej serca lub leczeniu niedokrwienia kończyn. Co ważne, opisany w pracy wektor plazmidowy może być użyty do produkcji wektorów AAV (ang. *adeno-associated virus*), które mogą zapewnić długotrwałą i wyższą ekspresję transgenów w docelowych tkankach.

Ograniczenie ekspresji czynników proangiogennych, a zwłaszcza VEGF, wyłącznie do obszaru tkanek niedotlenionych, może mieć zasadnicze znaczenie dla zdrowia pacjenta. Niekontrolowana nadekspresja VEGF może bowiem prowadzić do powstania naczynek (20), a także, poprzez stymulację angiogenezy, może nasilać rozwój ukrytych nowotworów.

Kilka interesujących przykładów zastosowania wektorów regulowanych przez niedotlenienie opisano w eksperymentalnej terapii chorób układu krążenia. Uzyskano w ten sposób zwiększenie ekspresji VEGF w niedotlenionych tkankach transdukowanych wektorem AAV zawierającym gen VEGF pod kontrolą HRE (21). Różne modyfikacje systemu regulacji ekspresji zależnej od HIF-1 wykorzystano także do indukcji oksygenazy hemowej-1 w niedotlenionych kardiomiocytach (22-26) i komórkach progenitorowych śródbłonna (27). Szerszy opis tych strategii można znaleźć w pracach przeglądowych (28,29).

Skuteczność systemów regulowanej ekspresji genów została potwierdzona w pracach badawczych, co stwarza nadzieję na ich wykorzystanie w próbach klinicznych. Mogą być one szczególnie przydatne tam, gdzie wymagana jest precyzyjna kontrola zarówno miejsca jak i poziomu ekspresji transgenu.

Badania finansowano z projektu PBZ-KBN 096 P05 2004 i PBZ-KBN 107 P04 2004 (Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego). Agnieszka Jaźwa jest stypendystką Funduszu im. Stanisława Estreichera. Alicja Józkowicz jest beneficjentem Wellcome Trust (International Senior Research Fellowship).

Agnieszka Łoboda jest stypendystką Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.

## Literatura

1. Gossen M., Bujard H., (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 5547-5551.
2. Gossen M., Freundlieb S., Bender G., Muller G., Hillen W., Bujard H., (1995), Science, 268, 1766-1769.
3. Yin D. X., Zhu L., Schimke R. T., (1996), Anal. Biochem., 235, 195-201.
4. Triezenberg S. J., Kingsbury R. C., McKnight S. L., (1988), Genes Devel., 2, 718-729.
5. Hillen W., Berens C., (1994), Annual. Rev. Microbiol., 48, 345-369.
6. Zagórska A., Dulak J., (2004), Acta Biochim. Pol., 51, 563-585.
7. Lahiri S., Roy A., Baby S. M., Hoshi T., Semena G. L., Prabhakar N. R., (2006), Prog. Biophys. Mol. Biol., 91, 249-286.
8. Semenza G. L., (2004), Physiology (Bethesda), 19, 176-182.
9. Semenza G. L., Wang G. L., (1992), Mol. Cell Biol., 12, 5447-5454.
10. Huang L. E., Gu J., Schau M., Bunn H. F., (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 7, 7987-7992.
11. Bruick R. K., McKnight S. L., (2001), Science, 9, 1337-1340.
12. Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara J. M., Lane W. S., Kaelin W. G. Jr., (2001), Science, 20, 464-468.
13. Jaakkola P., Mole D. R., Tian Y. M., Wilson M. I., Gielbert J., Gaskell S. J., Kriegsheim A. V., Hestreit H. F., Mukherji M., Schofield C. J., Maxwell P. H., Pugh C. W., Ratcliffe P. J., (2001), Science, 20, 468-472.
14. Semenza G. L., (2002), Bioch. Pharm., 64, 993-998.
15. Kucharzewska P., Zagórska A., Leja J., Jaźwa A., Gozdecka M., Józkowicz A., Dulak J., (2007), Biotechnologia, 3, 66-81.
16. Wegiel B., (2004), *Genetic approach to the role of heme oxygenase 1 in human keratinocytes. Construction of AAV vectors*, praca magisterska, Wydział Biotechnologii UJ, Kraków.
17. Łoboda A., (2006), *Transkrypcja angiogeny komórki śródbłonna mikronaczyń – wpływ niedotlenienia i oksygenazy hemowej*, praca doktorska, Wydział Biotechnologii UJ, Kraków.
18. Zhou X., Vink M., Berkhout B., Das A. T., (2006), Retrovirology, 3, 82.
19. Gonzalez L., Agullo-Ortuno M. T., Garcia-Martinez J. M., Calcabrini A., Gamallo C., Palacios J., Aranda A., Martin-Perez J., (2006), J. Biol. Chem., 281, 20851-20864.
20. Lee R. J., Springer M. L., Blanco-Bose W. E., Shaw R., Ursell P. C., Blau H., (2000), Circulation, 102, 898-901.
21. Su H., Joho S., Huang Y., Barcena A., Arakawa-Hoyt J., Grossman W., Kan Y. W., (2004), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 16280-16285.
22. Tang Y., Jackson M., Qian K., Phillips M. I., (2002), Hypertension, 39, 695-698.
23. Tang Y. L., Tang Y., Zhang Y. C., Qian K., Shen L., Phillips M. I., (2004), Hypertension, 43, 746-751.
24. Tang Y. L., Tang Y., Zhang Y. C., Agarwal A., Kashara H., Qian K., Shen L., Phillips M. I., (2005), Gene Ther., 12, 1163-1170.
25. Pachori A. S., Melo L. G., Hart M. L., Noiseux N., Zhang L., Morello F., Solomon S. D., Stahl G. L., Pratt R. E., Dzau V. J., (2004), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 12282-12287.
26. Pachori A. S., Melo L.G., Zhang L., Solomon S. D., Dzau V. J., (2006), J. Am. Coll. Cardiol., 47, 635-643.
27. Tang Y. L., Tang Y., Zhang Y. C., Qian K., Shen L., Phillips M. I., (2005), J. Am. Coll. Cardiol., 46, 1339-1350.
28. Dulak J., Zagórska A., Wegiel B., Łoboda A., Józkowicz A., (2006), Cell Biochem. Biophys., 44, 31-42.
29. Jaźwa A., Józkowicz A., Dulak J., (2007), Current Gene Therapy, 7, 7-23.