



Konstrukcja plazmidowych wektorów bicistronowych i zastosowanie do transfekcji *in vitro*

Paulina Kucharzewska, Anna Zagórska, Justyna Leja,
Agnieszka Jaźwa, Małgorzata Gozdecka, Alicja Józkowicz,
Józef Dulak

Zakład Biotechnologii Medycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Construction of plasmid bicistronic vectors and their application for *in vitro* transfection

Summary

Internal ribosome entry site (IRES) sequences, which stand for the basic element of cap 5'-independent translation, are currently widely used to coexpress heterologous genes from one plasmid. In this study construction of four bicistronic plasmids containing IRES and application of these vectors for transfection of *in vitro* cultured cells were described. The obtained data show that constructed bicistronic plasmids are very efficient *in vitro* in terms of simultaneous expression of fibroblast growth factor-4 (FGF-4) and vascular endothelial growth factor (VEGF) or one of these factors and green fluorescent protein (GFP) from one plasmid. Interestingly, expression of two genes, although simultaneous, is not equal. It has turned out that IRES-dependent mRNA translation is less efficient than cap 5'-dependent translation of the first gene, which should be taken into account during construction of bicistronic plasmids.

Key words:

bicistronic plasmids, IRES, gene therapy, angiogenesis.

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

biotechnologia

3 (78) 66–81 2007

1. Wstęp

Transfekcja komórek eukariotycznych jest podstawowym narzędziem biologii molekularnej, służącym do badania regulacji ekspresji genów, a także aktywności i funkcji białek. Transfekcja

polega na wprowadzeniu do komórek wektora plazmidowego zawierającego w kasie ekspresyjnej sekwencję cDNA kodującą interesujące nas białko. Często jednak, obok produkcji badanego białka, pożądana jest dodatkowo obecność białka reporterowego jak np. białka zielonej fluorescencji (GFP, ang. *green fluorescent protein*) czy lucyferazy lub białka nadającego stransfekowanym komórkom oporność na antybiotyk. Obecność białka reporterowego umożliwia określenie wydajności transfekcji lub wyselekcjonowanie do dalszych badań komórek wykazujących ekspresję badanego przez nas genu. Dodatkowa produkcja enzymu nadającego oporność na antybiotyk ułatwia selekcjonowanie komórek o stabilnej ekspresji transgenu. Koekspresja dwóch lub większej liczby genów może być także przydatna, gdy zależy nam na produkcji białka zbudowanego z kilku osobnych podjednostek, jak w przypadku interleukiny-12 (IL-12, ang. *interleukin-12*) (1), czy czynnika transkrypcyjnego regulowanego przez niedotlenienie (HIF-1, ang. *hypoxia inducible factor*) (2).

Najprostszym sposobem uzyskania jednoczesnej produkcji dwóch lub więcej heterologicznych peptydów czy białek, jak się wydaje, jest transfekcja z użyciem dwóch lub więcej plazmidów, z których każdy zawiera sekwencję jednego z genów. Nie jest to jednak metoda optymalna, ze względu na konieczność konstrukcji i izolacji każdego plazmidu z osobna. Dodatkową wadą tej strategii jest sama transfekcja, w wyniku której każdy z plazmidów może wnikać do komórki z różną wydajnością. Dlatego najlepszym rozwiązaniem jest, jak się wydaje, transfekcja komórek z udziałem jednego plazmidu. Obecnie można to osiągnąć stosując dwa podejścia. Jedno z nich polega na konstrukcji plazmidu, w którym każda z sekwencji kodujących umieszczona jest pod kontrolą odrębnego promotora (3). Takie rozwiązanie prowadzi do niezależnej ekspresji transgenów na poziomie transkrypcji, a następnie translacji. Niestety często dochodzi do zahamowania ekspresji cDNA z jednego z promotorów (4-6). Ten problem udało się ominąć w drugiej z metod, która wykorzystuje naturalnie występujący w wirusach i organizmach eukariotycznych mechanizm translacji zależnej od wewnętrznego miejsca wejścia rybosomu (IRES, ang. *internal ribosome entry site*) (7-10). Sekwencje IRES, razem z czynnikami ITAF (ang. *IRES-trans acting factors*) umożliwiają przyłączenie się rybosomów do sekwencji AUG bez konieczności skanowania regionu-5' nieulegającego translacji (5'UTR, ang. *5'-untranslated region*) w mRNA i tym samym inicjowanie translacji niezależnej od czapeczki na końcu 5' mRNA (3,11). Metoda wykorzystująca sekwencje IRES polega na konstrukcji wektora, zawierającego jeden promotor, regulujący ekspresję dwóch lub większej liczby genów rozdzielonych tymi sekwencjami. Prowadzi to do jednoczesnej transkrypcji genów (w wyniku czego powstaje policystronowe mRNA), a następnie oddzielnej translacji dzięki umieszczeniu sekwencji IRES między poszczególnymi genami (3).

W pracy przedstawiono konstrukcję czterech plazmidów bicystronowych z sekwencjami IRES oraz wykorzystanie tych wektorów do transfekcji komórek hodowanych *in vitro*. Dwa z nich (pTR-UF-12-VEGF-ires-GFP i pTR-UF-12-FGF-4-ires-GFP) zawierają po dwa geny, z których pierwszy umieszczony bezpośrednio za promotorem ko-

duje czynnik wzrostu fibroblastów-4 (FGF-4, ang. *fibroblast growth factor-4*) lub czynnik wzrostu śródbłónka naczyń (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*), drugi natomiast jest umieszczony za sekwencją IRES i koduje białko reporterowe GFP. Pozostałe (pTR-UF-22-FGF4-ires-VEGF i pTR-UF-22-VEGF-ires-FGF4) zawierają cDNA zarówno dla VEGF jak i FGF-4. Różnią się one jedynie kolejnością wklonowanych sekwencji kodujących czynniki proangiogenne w kasecie ekspresyjnej. Wektory te powstały z myślą o ich użyciu w proangiogennej terapii genowej, której celem jest stymulacja nowych naczyń krwionośnych w niedotlenionych obszarach mięśnia sercowego (12-13).

Angiogeneza jest procesem bardzo złożonym (14,15). Dotychczasowe próby terapii genowej wskazują, że stymulacja angiogenezy za pomocą wektorów plazmidowych lub wirusowych kodujących tylko jeden czynnik proangiogeny jest niewystarczająca i prowadzi do powstania niedojrzałych naczyń (16). Rozwiązaniem może być terapia z użyciem wektora kodującego dwa czynniki proangiogenne, z których jeden stymuluje powstawanie naczyń, a drugi ich dojrzewanie (17,18). Dlatego skonstruowano wektory bicistronowe kodujące jednocześnie VEGF (izoforma 165), który silnie indukuje angiogenezę oraz FGF-4, stymulujący powstawanie dojrzałych naczyń krwionośnych.

2. Materiały i metody

2.1. Konstrukcja i przygotowanie plazmidowych wektorów bicistronowych

Do konstrukcji plazmidowych wektorów bicistronowych, kodujących proangiogenne czynniki wzrostu VEGF i FGF-4, wykorzystano plazmidy pTR-UF-12-ires-GFP i pTR-UF-22-ires-GFP (otrzymane dzięki uprzejmości Sergei Zolotukhina, Department of Pediatrics, Division of Cellular and Molecular Therapy, University of Florida, USA). Mapy tych plazmidów przedstawiono na rysunku 1. Ostatecznie skonstruowano cztery rodzaje wektorów bicistronowych. Dwa z nich zawierają jedną z sekwencji kodujących czynniki angiogenne, a mianowicie cDNA dla FGF-4 lub VEGF oraz cDNA kodujące gen reporterowy GFP. Są to plazmidy pTR-UF-12-FGF4-ires-GFP i pTR-UF-12-VEGF-ires-GFP. Pozostałe dwa: pTR-UF-22-FGF4-ires-VEGF i pTR-UF-22-VEGF-ires-FGF4 kodują obie sekwencje cDNA zarówno dla FGF4 jak i VEGF. Jedyna różnica między nimi polega na kolejności wklonowanych sekwencji cDNA kodujących FGF-4 i VEGF w kasecie ekspresyjnej.

2.1.1. Konstrukcja wektora pTR-UF-12-FGF-4-ires-GFP

Plazmid pTR-UF-12-FGF-4-ires-GFP powstał na podstawie wektora pTR-UF-12-ires-GFP. Pierwszym krokiem w konstrukcji tego plazmidu było sklonowanie sekwencji cDNA kodującej FGF-4 z plazmidu pCAGGS-HST (otrzymanego od Takahiro Ochiya, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan), przy użyciu PCR

oraz dwóch starterów FGF4_NHf i FGF4_NNr (tab.). Aby umożliwić wklonowanie namnożonego insertu do plazmidu, każdy ze starterów wykorzystanych w PCR zawierał przy końcach 5' po dwa miejsca cięcia dla następujących enzymów restrykcyjnych: NotI i HindIII oraz NsiI i NotI. Sekwencje tych primerów przedstawiono w tabeli. Reakcja została przeprowadzona w obecności polimerazy DyNAzyme™ pol EXT (Finnzymes) w 30 cyklach z temperaturą przyłączania primerów 54°C. Tak otrzymany produkt PCR strawiono enzymami restrykcyjnymi HindIII i NsiI, a następnie oczyszczono za pomocą zestawu Clean-Up (A&A Biotechnology). Wykorzystując te same enzymy restrykcyjne przecięto plazmid pTR-UF-12-ires-GFP, który po oczyszczeniu z 1% żelu agarozowego za pomocą zestawu Gel-Out (A&A Biotechnology) został zligowany z insertem kodującym FGF-4. Ligację prowadzono przez noc w 16°C w obecności ligazy DNA T4 (New England Biolabs). Otrzymana mieszanina ligacyjna posłużyła do transformacji bakterii XL10-Gold Ultracompetent Cells (Stratagene), które następnie zostały wysiane na płytkę LB z ampicyliną (100 µg/mL). Płytkę inkubowano przez noc w 37°C. Wybrane klony bakteryjne namnożono w 5 mL medium LB z ampicyliną (100 µg/mL) i użyto do izolacji wektora plazmidowego za pomocą zestawu Plasmid Mini Purification Kit (A&A Biotechnology). Czystość otrzymanego DNA plazmidowego została potwierdzona spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm i 280 nm oraz przez elektroforezę w żelu agarozowym, a prawidłowość wektora i obecność sekwencji cDNA kodującej FGF-4 została zweryfikowana za pomocą analizy restrykcyjnej i sekwencjonowania.

Tabela

Nazwy i sekwencje starterów, które wykorzystano do reakcji PCR w celu sklonowania sekwencji kodujących FGF-4 i VEGF z odpowiednich plazmidów oraz długości tych sekwencji

Gen	Nazwa startera	Sekwencja startera	Długość produktu
FGF-4	FGF4_NHf	5' TAGCGGCCGCA <u>AGCTT</u> ATGTCGGGGCCCGGGAC 3'	632 bp
	FGF4_NNr	5' ATGCGGCCGCATGCATTCACAGCCTGGGGAGGAAG 3'	
VEGF	VEGF_NSf	5' TAGCGGCCGCACTAGTACCATGAACCTTCTGCTGTC 3'	595 bp
	VEGF_NNr	5' TTGCGGCCGCATGCATTCACCGCCTCGGCTTGTC 3'	

Każdy ze starterów zawiera po dwa miejsca cięcia dla różnych enzymów restrykcyjnych: NotI (podkreślenie pojedyncze), HindIII (podkreślenie podwójne), NsiI (podkreślenie wykropkowane), SpeI (podkreślenie przerywane), w celu wklonowania uzyskanego insertu do odpowiedniego plazmidu. f, lewy starter (ang. *forward*); r, prawy starter (ang. *reverse*); bp, par zasad.

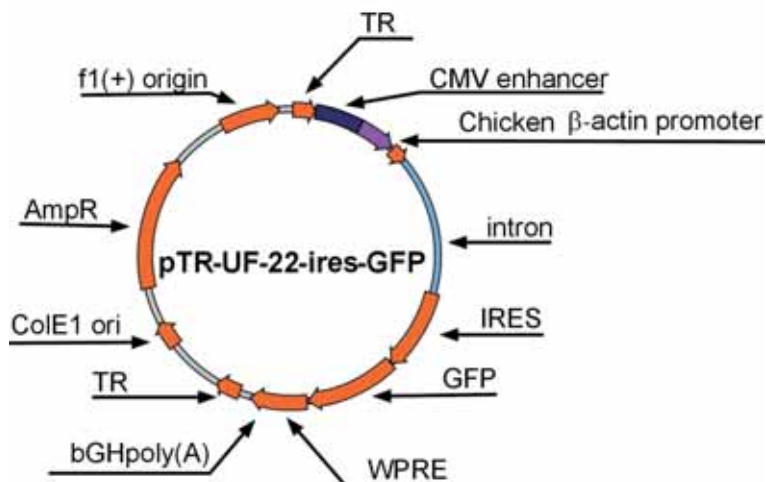
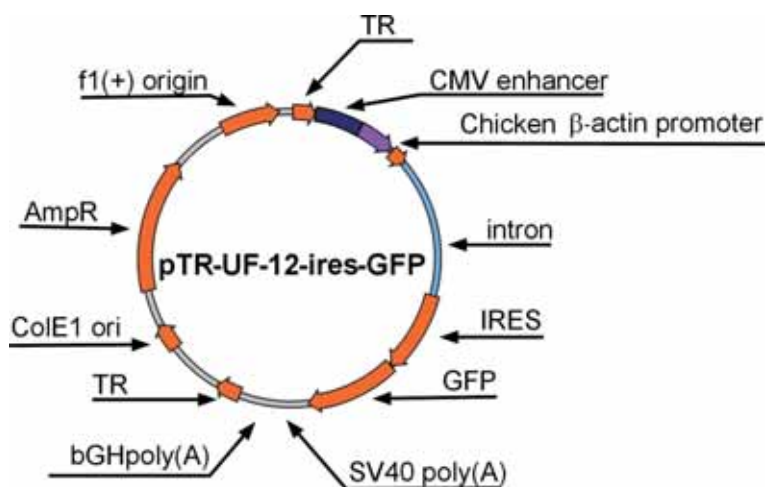
2.1.2. Konstrukcja wektora pTR-UF-12-VEGF-ires-GFP

Plazmid pTR-UF-12-VEGF-ires-GFP został skonstruowany w sposób analogiczny jak poprzedni wektor plazmidowy. Sekwencja cDNA kodująca VEGF została sklonowana z plazmidu pSG5-VEGF-A (19) przy użyciu PCR oraz dwóch starterów VEGF_NSf i VEGF_NNr (tab.), zawierających po dwa miejsca cięcia dla enzymów re-

strykcyjnych: NotI i SpeI oraz NsiI i NotI. Tak otrzymany produkt PCR został wklonowany do plazmidu pTR-UF-12-ires-GFP. Uzyskany plazmid pTR-UF-12-VEGF-ires-GFP został wyizolowany i zweryfikowany jak opisano.

2.1.3. Konstrukcja wektora pTR-UF-22-FGF-4-ires-VEGF

Plazmid bicystronowy pTR-UF-22-FGF-4-ires-VEGF powstał na podstawie plazmidu pTR-UF-22-ires-GFP (rys. 1). Konstrukcję rozpoczęto od przecięcia plazmidu pTR-UF-12-FGF-4-ires-GFP enzymami restrykcyjnymi XbaI i EcoRV. Tak otrzymano insert zawierający sekwencję cDNA dla FGF-4, który wklonowano do uprzednio



przeciętego enzymami XbaI i EcoRV plazmidu pTR-UF-22-ires-GFP. Spośród uzyskanych klonów bakteryjnych wybrano dwa, które namnożono i wyizolowano plazmid, zweryfikowany następnie za pomocą analizy restrykcyjnej. W następnym etapie prawidłowy plazmid pTR-UF-22-FGF-4-ires-GFP został przecięty enzymem NotI i po oczyszczeniu pozbawiony reszt fosforanowych na obu końcach 5' przy użyciu fosfatazy – Antarctic Phosphatase (New England Biolabs). Tak przygotowany plazmid zligowano z sekwencją kodującą VEGF, którą wcześniej sklonowano z plazmidu pSG5-VEGF-A za pomocą PCR i strawiono na końcach enzymem NotI. Uzyskany plazmid pTR-UF-22-FGF-4-ires-VEGF został wyizolowany i zweryfikowany jak opisano.

2.1.4. Konstrukcja wektora pTR-UF-22-VEGF-ires-FGF-4

Plazmid pTR-UF-22-ires-GFP przecięto enzymem restrykcyjnym NotI, a następnie oczyszczono z 1% żelu agarozowego i pozbawiono reszt fosforanowych na obu końcach 5' przy użyciu fosfatazy – Antarctic Phosphatase. Tak przygotowany plazmid zligowano z sekwencją kodującą FGF-4, którą wcześniej sklonowano z plazmidu pCAGGS-HST za pomocą PCR i strawiono enzymem NotI jak opisano. Uzyskany plazmid pTR-UF-22-ires-FGF-4 scharakteryzowano za pomocą analizy restrykcyjnej. Następnie insert zawierający sekwencję kodującą VEGF wycięto z plazmidu pTR-UF-12-VEGF-ires-GFP za pomocą enzymów XbaI i EcoRV i zligowano z plazmidem pTR-UF-22-ires-FGF-4, który wcześniej przecięto tymi samymi enzymami restrykcyjnymi. Otrzymany plazmid pTR-UF-22-VEGF-ires-FGF-4 wyizolowano i scharakteryzowano w sposób opisany.

2.2. Hodowla komórkowa

W eksperymentach sprawdzających aktywność skonstruowanych wektorów wykorzystano linię komórkową HEK293 (ang. *human embryonic kidney epithelial cell line*) (Stratagene). Komórki te hodowano w pożywce DMEM o wysokiej zawartości gluko-

Rys. 1. Schematyczne mapy plazmidów wykorzystanych do konstrukcji plazmidów bicystronowych kodujących czynniki angiogenne FGF-4 i VEGF. Plazmidy te posiadają następujące elementy funkcjonalne: CMV enhancer – sekwencja wzmacniająca z cytomegalowirusa; Chicken β -actin promoter – promotor z genu kurzej β -aktyny; intron – sekwencja intronowa; IRES – wewnętrzne miejsce przyłączenia rybosomów (ang. *internal ribosome entry site*); GFP – sekwencje kodująca zielone białko fluorescencyjne; SV40 poly(A) – sygnał poliadenylacji z wirusa SV40; bGHPoly(A) – sygnał poliadenylacji z genu kodującego bydłęcy hormon wzrostu (ang. *bovine growth hormone polyadenylation signal*); ColE1 ori – miejsce inicjacji replikacji, ori; f1(+)-ori – miejsce inicjacji replikacji z bakteriofaga f1; ApR – gen oporności na ampicylinę, TR – końcowe powtórzenia z wirusa AAV (ang. *AAV terminal repeats*); WPRE – posttranskrypcyjny element regulatorowy z genomu świstaka amerykańskiego (ang. *woodchuck posttranscriptional regulatory element*).



zy 4,5 g/L (Gibco) wzbogaconej w 10% płodową surowicę bydlęcą (Gibco), 2 mM L-glutaminę (Gibco) oraz antybiotyki: penicylinę, 100 U/mL (Gibco) i streptomycynę, 10 µg/mL (Gibco).

2.3. Przejściowa transfekcja komórek wektorami plazmidowymi

Skonstruowane plazmidy bicystronowe wprowadzono do komórek HEK-293 hodowanych *in vitro* przy użyciu odczynnika SuperFect Transfection Reagent (Qiagen). Dzień przed transfekcją, komórki HEK293 były wysiewane na każdy dołek 24-dółkowej płytki w ilości 1×10^5 komórek. W dniu transfekcji przygotowywano mieszaniny transfekcyjne dla każdego z plazmidów, na które składały się: 1 µg plazmidu, 60 µL pożywki bez surowicy oraz 5 µL dendrymeru SuperFect. Tak uzyskane mieszaniny inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej, aby umożliwić powstanie kompleksów transfekcyjnych. Po 10-minutowej inkubacji mieszanin transfekcyjnych, do każdej z nich dodawano po 350 µl pełnej pożywki hodowlanej. Następnie zbierano pożywkę z komórek HEK-293, przemywano je jeden raz PBS, po czym dodawano do każdego dołka po 410 µl odpowiedniej pożywki hodowlanej zawierającej kompleksy transfekcyjne. Po 3-godzinnej inkubacji komórek z kompleksami DNA-dendrimery, medium z komórek zbierano, komórki przemywano PBS i dodawano 0,5 mL świeżej pożywki hodowlanej do każdego z dołków płytki. Komórki HEK-293 były hodowane w 37°C w inkubatorze z 5% CO₂ przez następne 48 lub 72 godziny. 48 godzin po transfekcji komórek HEK-293 plazmidami pTR-UF-12-FGF4-ires-GFP i pTR-UF-12-VEGF-ires-GFP robiono zdjęcia za pomocą aparatu cyfrowego połączonego z mikroskopem fluorescencyjnym.

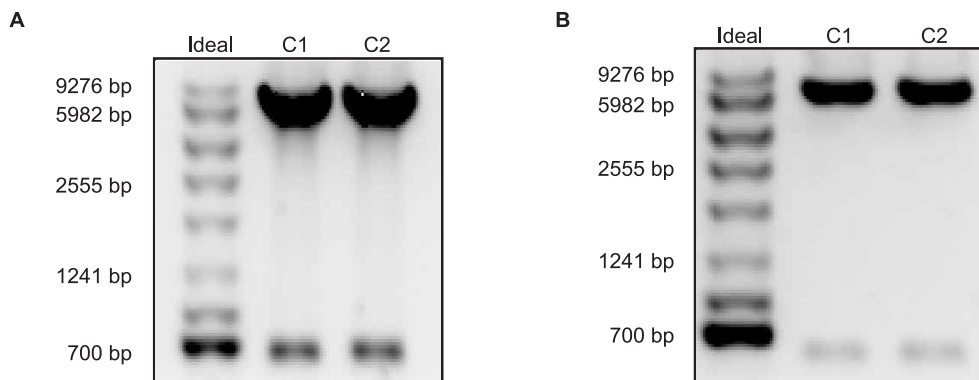
2.4. Pomiar stężenia VEGF i FGF-4 przy użyciu testu ELISA

Produkcja białek VEGF i FGF-4 kodowanych przez skonstruowane plazmidy bicystronowe była mierzona za pomocą testów Human VEGF ELISA i Human FGF-4 ELISA (R&D Systems), zgodnie z protokołami dostarczonymi przez producenta. Oznaczenia wykonywano w pożywkach zebranych z komórek HEK-293, 48 i 72 godziny po transfekcji.

3. Wyniki

3.1. Klonowanie i weryfikacja plazmidów bicystronowych

Ostatecznie skonstruowano cztery rodzaje wektorów bicystronowych. Dwa z nich zawierają sekwencje cDNA zarówno dla VEGF jak i FGF-4, przy czym w plazmidzie pTR-UF-22-VEGF-ires-FGF-4 sekwencja cDNA kodująca VEGF została umiesz-



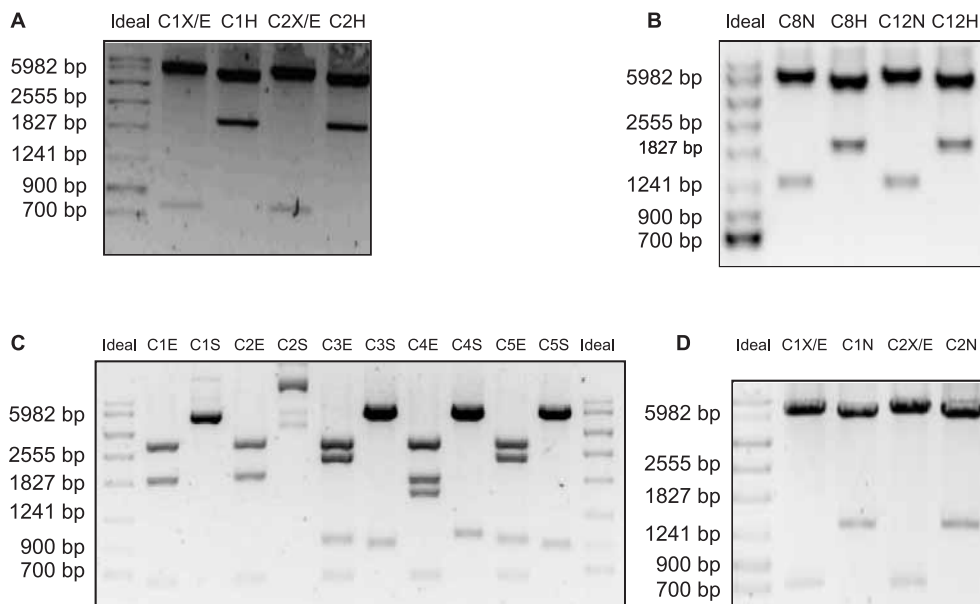
Rys. 2. Wyniki analizy restrykcyjnej dla plazmidów bicystronowych kodujących tylko jeden z czynników angiogennych, FGF-4 lub VEGF. A. Plazmid pTR-UF-12-FGF4-ires-GFP wyizolowany z dwóch klonów bakteryjnych (C1 i C2) i przecięty enzymami restrykcyjnymi HindIII i NsiI. W wyniku trawienia prawidłowy plazmid daje dwa prążki od długościach 632 i 6754 par zasad. B. Plazmid pTR-UF-12-VEGF-ires-GFP uzyskany z dwóch klonów bakteryjnych (C1 i C2) i przecięty enzymami restrykcyjnymi SpeI i NsiI, dwa prążki o długościach 595 i 6764 par zasad potwierdzają obecność w plazmidzie insertu kodującego czynnik VEGF i tym samym prawidłową konstrukcję wektora. Ideal – marker masowy.

czona bezpośrednio za złożonym promotorem, składającym się z promotora β -aktyny i wzmacniacza CMV, natomiast cDNA dla FGF-4 znajduje się za sekwencją IRES. W drugim plazmidzie pTR-UF-22-FGF-4-ires-VEGF kolejność sekwencji kodujących VEGF i FGF-4 jest odwrotna. Oprócz wektorów bicystronowych z cDNA dla obu czynników angiogennych, skonstruowano plazmidy zawierające sekwencję kodującą VEGF lub FGF-4 umieszczoną bezpośrednio za promotorem i gen reporterowy – GFP za sekwencją IRES. Są to odpowiednio plazmidy pTR-UF-12-VEGF-ires-GFP oraz pTR-UF-12-FGF-4-ires-GFP.

Wszystkie cztery plazmidy bicystronowe zostały skonstruowane w sposób jaki opisano w rozdziale 2. Wektor pTR-UF-12-FGF4-ires-GFP powstał w wyniku wkłobania do uprzednio przeciętego enzymami HindIII i NsiI plazmidu pTR-UF-12-ires-GFP insertu kodującego cDNA dla FGF4. Analiza restrykcyjna DNA plazmidowego potwierdziła prawidłowość konstrukcji (rys. 2A).

Plazmid pTR-UF-12-VEGF-ires-GFP powstał w sposób analogiczny do poprzedniego wektora, z tą różnicą, że insert kodujący sekwencję dla VEGF został zligowany z plazmidem pTR-UF-12-ires-GFP przy użyciu miejsc cięcia dla enzymów SpeI i NsiI. Analiza restrykcyjna potwierdziła prawidłową konstrukcję wektora (rys. 2B).

W celu otrzymania plazmidu pTR-UF-22-FGF4-ires-VEGF w pierwszej kolejności uzyskano wektor pośredni – pTR-UF-22-FGF4-ires-GFP. Powstał on w wyniku wkłobania sekwencji kodującej FGF4 z plazmidu pTR-UF-12-ires-GFP do plazmidu pTR-UF-22-ires-GFP za pomocą enzymów restrykcyjnych XbaI i EcoRV. Przejściowy plazmid pTR-UF-22-FGF4-ires-GFP został wyizolowany, a następnie sprawdzony za pomocą enzymów restrykcyjnych XbaI/EcoRV oraz HindIII (rys. 3A). Plazmid



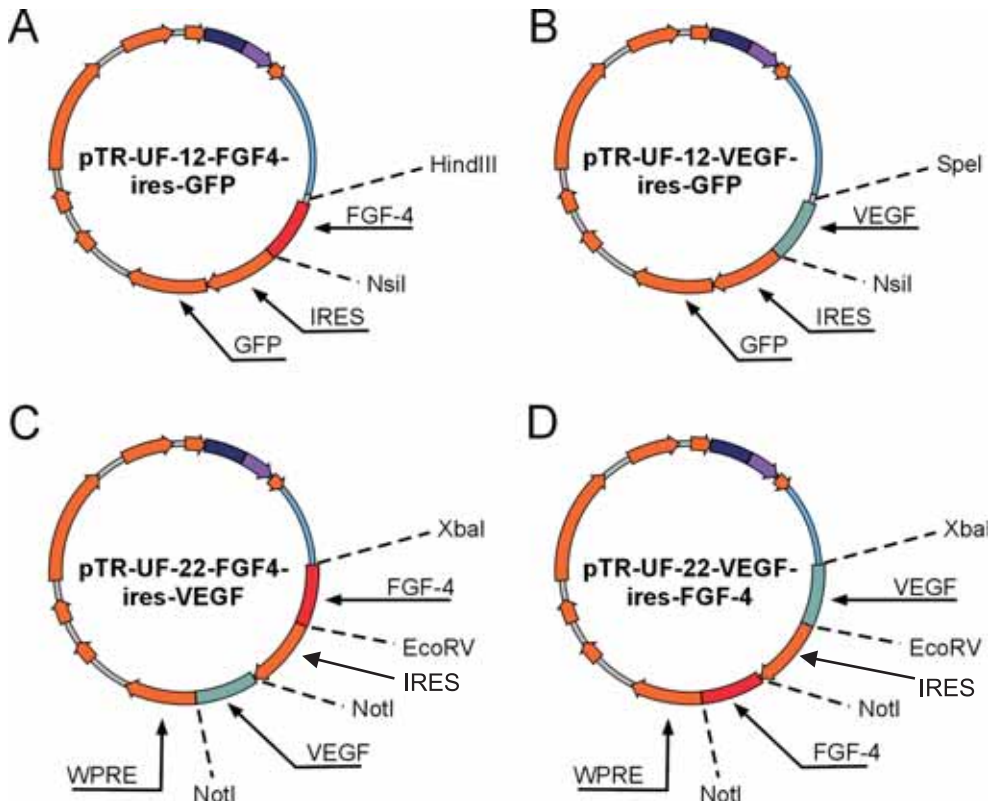
Rys. 3. Wyniki analizy restrykcyjnej dla plazmidów przejściowych i plazmidów bicystronowych kodujących obydwa czynniki angiogenne. A. Prawidłowy plazmid przejściowy pTR-UF-22-FGF4-ires-GFP wyizolowany z dwóch klonów bakteryjnych i pocięty enzymami restrykcyjnymi XbaI i EcoRV lub HindIII. Dwa prążki o długościach 765 i 6902 par zasad w przypadku cięcia enzymami XbaI i EcoRV oraz prążki 1959 i 5708 par zasad uzyskane po cięciu HindIII potwierdzają obecność w plazmidzie insertu kodującego czynnik FGF-4. B. Analiza restrykcyjna z użyciem enzymów HindIII i NsiI prawidłowego plazmidu pTR-UF-22-FGF4-ires-VEGF uzyskanego z kolonii bakteryjnych nr 8 i 12. Trawienie prawidłowego plazmidu enzymami NsiI i HindIII daje odpowiednio po dwa prążki o długościach 1314 i 6425 par zasad oraz 1959 i 5780 par zasad. C. Plazmid przejściowy pTR-UF-22-ires-FGF4 uzyskany z 5 kolonii bakteryjnych i pocięty enzymami Eco109I i SacI. Tylko plazmidy wyizolowane z kolonii bakteryjnych nr 3 i 5 dają w wyniku trawienia właściwe prążki o długościach 640, 948, 2434 i 3082 par zasad dla enzymu Eco109I oraz 908 i 6196 par zasad dla SacI. D. Analiza restrykcyjna z użyciem enzymów XbaI i EcoRV lub HindIII prawidłowego plazmidu pTR-UF-22-VEGF-ires-FGF4 uzyskanego z dwóch kolonii bakteryjnych. Dwa prążki o długościach 724 i 6943 par zasad w przypadku cięcia enzymami XbaI i EcoRV oraz prążki 1281 i 6386 par zasad po cięciu enzymem NsiI potwierdzają prawidłową konstrukcję wektora. Ideal – marker masowy.

pTR-UF-22-FGF4-ires-GFP przecięto enzymem restrykcyjnym NotI i zligowano z cDNA dla VEGF. Na podstawie analizy restrykcyjnej z wykorzystaniem enzymów NsiI lub HindIII potwierdzono prawidłową konstrukcję wektora wyizolowanego tylko z dwóch spośród piętnastu kolonii bakteryjnych (kolonia nr 8 i 12) (rys. 3B).

Przygotowanie czwartego wektora bicystronowego pTR-UF-12-VEGF-ires-FGF4 rozpoczęto od usunięcia z plazmidu pTR-UF-22-ires-GFP za pomocą enzymu NotI sekwencji kodującej GFP i wklonowania w to miejsce cDNA dla FGF-4. Tak powstał wektor

przejsiowy pTR-UF-22-ires-FGF4, którego poprawność sprawdzono za pomocą enzymów Eco0109 lub SacI. Spośród pięciu kolonii, z których wyizolowano plazmidy, tylko dwie (nr 3 i 5) zawierały prawidłowe konstrukty (rys. 3C). Następnie plazmid pTR-UF-22-ires-FGF4 przecięto enzymami XbaI i EcoRV i zligowano z sekwencją kodującą VEGF. Aby sprawdzić poprawność konstrukcji otrzymanego plazmidu pTR-UF-22-VEGF-ires-FGF4, wybrano dwa kłony uzyskane po transformacji bakterii mieszaniną liganą i namnożono w celu izolacji DNA plazmidowego. Wyizolowany DNA został strawiony enzymami restrykcyjnymi XbaI/EcoRV lub HindIII. Na podstawie analizy restrykcyjnej plazmidów wykazano ich prawidłową konstrukcję (rys. 3D).

Wszystkie cztery poprawne plazmidy bicystronowe namnożono w bakteriach XL10-Gold Ultracompetent Cells i wyizolowano za pomocą Plasmid Midi Purification Kit. Jakość DNA plazmidowego została sprawdzona spektrofotometrycznie, natomiast prawidłowość sekwencji kodujących FGF-4 i VEGF została potwierdzona poprzez sekwencjonowanie. Mapy wszystkich uzyskanych plazmidów bicystronowych przedstawiono na rysunku 4.

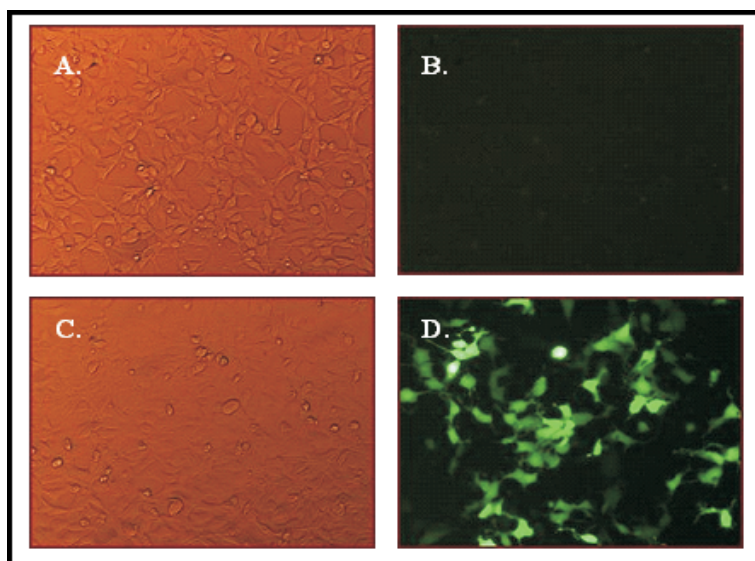


Rys. 4. Mapy czterech skonstruowanych plazmidów bicystronowych wraz z zaznaczonymi miejscami cięcia dla enzymów restrykcyjnych, za pomocą których wklonowano sekwencje cDNA kodujące czynniki angiogenne FGF-4 i VEGF do odpowiednich plazmidów.

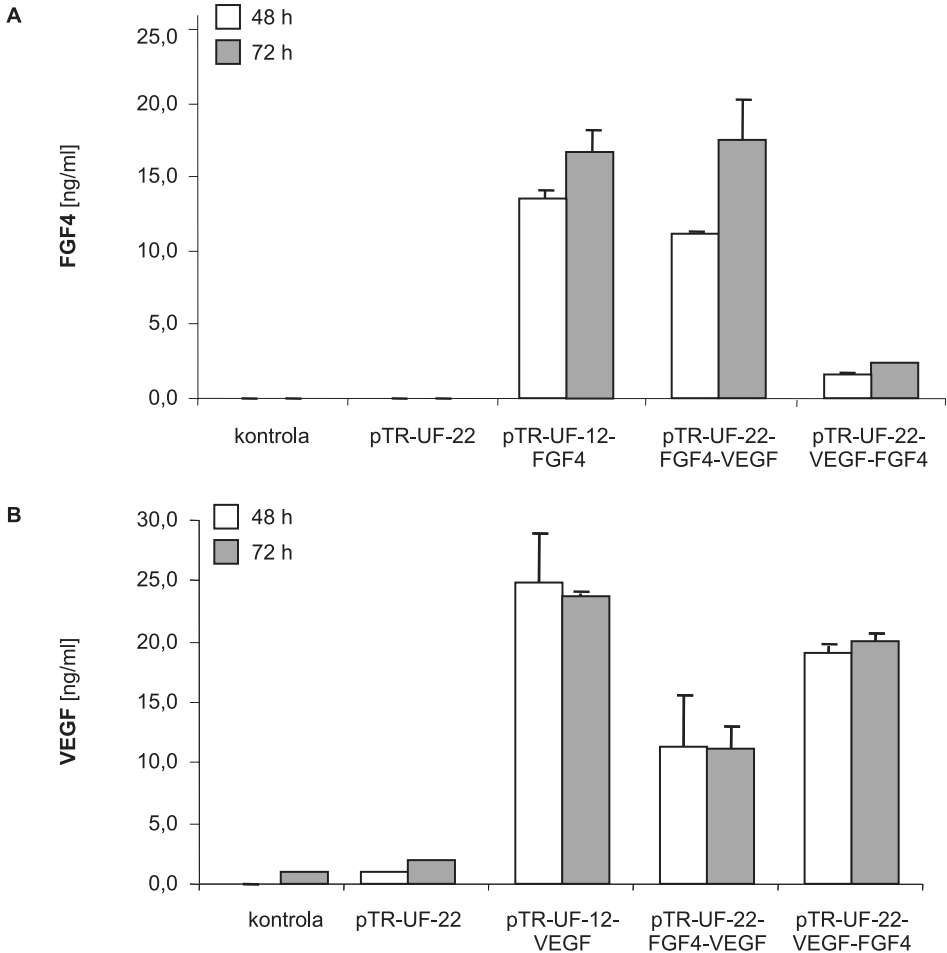
3.2. Ekspresja białek GFP, FGF-4 i VEGF z plazmidów bicistronowych

Analiza restrykcyjna skonstruowanych plazmidów bicistronowych: pTR-UF-12-FGF4-ires-GFP, pTR-UF-12-VEGF-ires-GFP, pTR-UF-22-FGF4-ires-VEGF i pTR-UF-22-VEGF-ires-FGF4 oraz sekwencjonowanie wklonowanych sekwencji cDNA dla czynników angiogennych FGF-4 i VEGF wykazały ich poprawną budowę. Aby jednak potwierdzić, że skonstruowane wektory są w pełni funkcjonalne i wykazują aktywność *in vitro*, należało sprawdzić, czy zachodzi z nich ekspresja białek GFP, FGF-4 i VEGF. W tym celu plazmidy wprowadzono do komórek HEK293 hodowanych *in vitro* za pomocą dendrymerów Superfect. Transfekcja plazmidów pTR-UF-12-FGF4-ires GFP i pTR-UF-12-VEGF-ires-GFP wykazała ekspresję genu reporterowego GFP (obserwacje w mikroskopie fluorescencyjnym – rys. 5), co potwierdziło właściwe działanie sekwencji IRES. Dzięki ekspresji białka reporterowego GFP możliwe było także oszacowanie wydajności transfekcji, która w przypadku komórek HEK293 była wysoka i wyniosła około 50% w 48 godzin po dodaniu kompleksów transfekcyjnych do komórek.

Zarówno FGF-4 jak i VEGF są białkami posiadającymi sekwencje sygnałowe odpowiedzialne za ich wydzielanie z komórek (20-21), dlatego poziom ich ekspresji został zmierzony w pożywkach hodowlanych zebranych z nadstransfekowanych komórek HEK293 za pomocą testów ELISA. Do tych pomiarów wykorzystano pożywki



Rys. 5. Komórki HEK-293 transfekowane jednym z plazmidów bicistronowych pTR-UF-12-FGF4-ires-GFP przy użyciu dendrymerów SuperFect. A-B. Komórki kontrolne (niestransfekowane) widziane odpowiednio w mikroskopie świetlnym i fluorescencyjnym. C-D. Komórki stransfekowane plazmidem pTR-UF-12-FGF4-ires-GFP widziane odpowiednio w mikroskopie świetlnym i fluorescencyjnym.

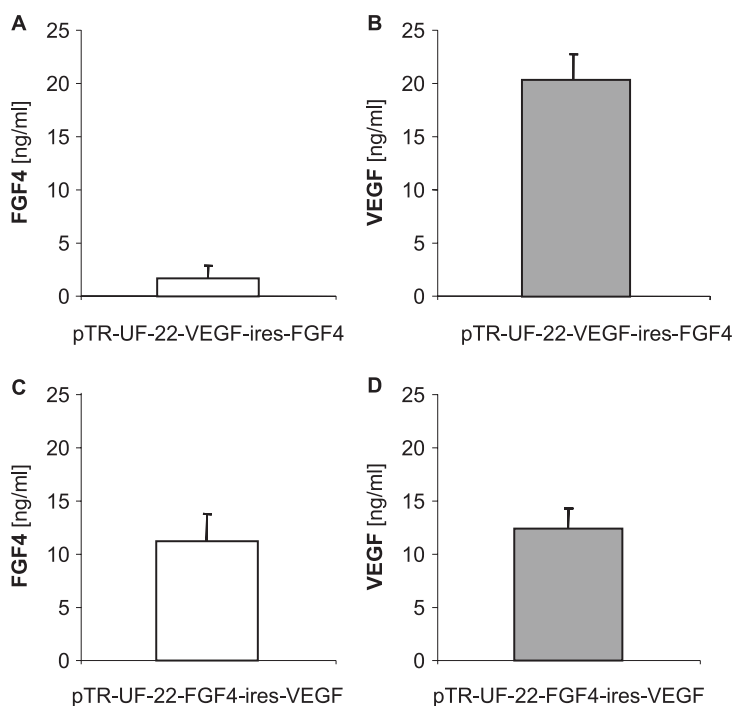


Rys. 6. Wyniki pomiaru stężenia czynników FGF-4 (A) i VEGF (B) za pomocą testu ELISA w mediach hodowlanych zebranych 48 i 72 godziny po transfekcji komórek HEK-293 plazmidami: pTR-UF-22-ires-GFP, pTR-UF-12-FGF4-ires-GFP, pTR-UF-12-VEGF-ires-GFP, pTR-UF-22-FGF4-ires-VEGF i pTR-UF-22-VEGF-ires-FGF4. Kontrola – komórki nietransfekowane. Przedstawione wyniki to średnia \pm SD z dwóch eksperymentów wykonanych w duplikatach.

zebrane po 48 i 72 godzinach od momentu transfekcji *in vitro*. Produkcja białek FGF-4 i VEGF ze wszystkich czterech plazmidów bicystronowych, podobnie jak wydajność transfekcji komórek HEK293, była bardzo wysoka co potwierdza funkcjonalność plazmidów *in vitro* (rys. 6). Zwiększona ekspresja czynników FGF-4 i VEGF nie została zaobserwowana w pożywkach hodowlanych zebranych z komórek nietransfekowanych (kontrolnych) i transfekowanych pustym plazmidem (pTR-UF-22-ires-GFP).

3.3. Porównanie ekspresji zależnej od IRES z ekspresją zależną od czapeczki

Wszystkie skonstruowane plazmidy bicistronowe zawierają sekwencje IRES, które dzięki możliwości inicjacji translacji niezależnej od czapeczki na końcu 5' mRNA, pozwalają na wydajną produkcję dwóch heterologicznych białek z jednego plazmidu. W przypadku plazmidów pTR-UF-12-FGF4-ires-GFP i pTR-UF-12-VEGF-ires-GFP zaobserwowano jednoczesną syntezę białek FGF-4 lub VEGF oraz białka reporterowego GFP (rys. 5), natomiast plazmidy pTR-UF-22-FGF4-ires-VEGF i pTR-UF-22-VEGF-ires-FGF4 wykazały wysoką ekspresję obydwu czynników angiogennych z jednego promotora (rys. 6). Dokładniejsza analiza pomiarów stężenia białek FGF-4 i VEGF w mediach zebranych z komórek transfekowanych plazmidami pTR-UF-22-FGF4-ires-VEGF i pTR-UF-22-VEGF-ires-FGF4 pokazuje dodatkowo, że zależna od sekwencji IRES ekspresja drugiego genu jest dużo niższa od ekspresji pierwszego genu (rys. 6 i 7). Wynika to prawdopodobnie stąd, że translacja mRNA zależna od sekwencji IRES jest mniej wydajna niż translacja pierwszego genu zależna od czapeczki 5' mRNA. Interesujący jest także fakt, że wydajność ekspresji genu zależy nie tylko od



Rys. 7. Produkcja czynników FGF-4 i VEGF zależna od czapeczki lub sekwencji IRES zmierzona za pomocą testów ELISA w mediach zebranych 48 godzin po transfekcji komórek HEK-293 plazmidami pTR-UF-22-VEGF-ires-FGF4 (A,B) i plazmidami pTR-UF-22-FGF4-ires-VEGF (C,D). Przedstawione wyniki to średnia \pm SD z dwóch eksperymentów wykonanych w duplikatach.

sekwencji IRES, ale także od charakteru samego genu. Na podstawie naszych danych wskazujemy, że produkcja FGF-4 zależna od sekwencji IRES (rys. 6A i 7A) jest około sześciokrotnie mniejsza, niż wówczas gdy sekwencja kodująca znajduje się bezpośrednio za promotorem (rys. 7C), i tym samym jej translacja zależy od czapeczki 5'. W przypadku VEGF różnica ta jest niewielka i synteza białka zależna od sekwencji IRES jest obniżona zaledwie półtora raza (rys. 6B, 7B, 7D). Wynik taki zanotowano nie tylko dla komórek HEK293, ale również w przypadku innych linii komórkowych stransfekowanych plazmidami bicystronowymi, a mianowicie mysich fibroblastów NIH 3T3 oraz w ludzkich komórek śródbłonna mikrowaskularnego HMEC-1 (wyniki nie publikowane). Na tej podstawie można stwierdzić, że spośród dwóch plazmidów bicystronowych pozwalających na jednoczesną produkcję obu czynników, tylko plazmid pTR-UF-22-FGF4-ires-VEGF pozwala na zbliżoną ekspresję obu proangiogennych czynników (rys. 6A, 7C, 7D).

4. Dyskusja

Celem pracy była konstrukcja plazmidowych wektorów bicystronowych zawierających sekwencje IRES, które umożliwiają wydajną ekspresję dwóch heterologicznych genów w warunkach *in vitro*. W pracy przedstawiono konstrukcję czterech plazmidów, z których dwa kodują po jednym z czynników proangiogennych FGF-4 lub VEGF oraz białko reporterowe GFP. Są to plazmidy: pTR-UF-12-FGF4-ires-GFP i pTR-UF-12-VEGF-ires-GFP. Pozostałe dwa wektory pTR-UF-22-FGF4-ires-VEGF i pTR-UF-22-VEGF-ires-FGF4 zawierają sekwencje cDNA dla obu czynników angiogennych, ale wklonowanych w różnej kolejności w kasecie ekspresyjnej. Tak sprawdzone konstrukty użyto do transfekcji komórek HEK293 i potwierdzono, że umożliwiają one wydajną koekspresję transgenów.

Warto zauważyć, że choć obecność sekwencji IRES umożliwia wydajną i jednoczesną ekspresję dwóch genów, to poziom produkcji kodowanych białek jest różny. W przypadku plazmidów bicystronowych kodujących zarówno FGF-4 jak i VEGF synteza czynników, których sekwencje kodujące wklonowano za IRES jest dużo niższa niż ekspresja tych samych białek, których cDNA umieszczono jako pierwsze w kasecie ekspresyjnej. Uzyskane dane są zgodne z tym co przedstawiły inne grupy badawcze. Mizuguchi i wsp. (22) wykazali, że ekspresja drugiego genu zależna od sekwencji IRES może być niższa niż ekspresja pierwszego genu z plazmidów bicystronowych. Te doniesienia zostały potwierdzone przez Kapturczaka i wsp. (23), którzy wykazali podobną różnicę w produkcji badanych białek zachodzącą po transdukcji komórek wysp trzustki bicystronowymi wektorami AAV (ang. *adeno-associated viruses*). Na podstawie tych danych wskazuje się, że translacja mRNA zależna od sekwencji IRES jest mniej wydajna niż translacja pierwszego genu zależna od czapeczki 5' mRNA. Interesujący jest także fakt, że wydajność ekspresji genu zależy nie tylko od sekwencji IRES, ale także od rodzaju komórek w których zachodzi ekspresja i od sa-

mego genu (22). Z naszych danych wynika, że produkcja FGF-4 zależna od sekwencji IRES może być około sześć razy mniejsza od ekspresji tego samego genu wklonowanego bezpośrednio za promotorem. Spośród dwóch plazmidów bicistronowych pozwalających na jednoczesną produkcję obu czynników, tylko plazmid pTR-UF-22-FGF4-ires-VEGF pozwala na podobny poziom ekspresji obu czynników proangiogennych i mogłyby być użyte w terapii genowej stymulującej powstawanie dojrzałych naczyń krwionośnych.

Podsumowując, w pracy przedstawiono plazmidy bicistronowe zawierające sekwencje IRES, jako efektywne narzędzie do transfekcji komórek *in vitro*, pozwalające na uzyskanie wysokiej koekspresji dwóch lub więcej genów. Podczas konstrukcji tego typu wektorów należy jednak wziąć pod uwagę, że poziom ekspresji dwóch lub więcej genów może być różny. Ma to szczególne znaczenie w przypadku, gdy chcemy uzyskać zbliżoną produkcję kodowanych białek. Wydajność translacji interesujących nas sekwencji kodujących w tego typu konstrukcjach wymaga szczególnej optymalizacji. Jest to ważne m.in. w przypadku bicistronowego wektora adenowirusowego do nadekspresji IL-12 (24), dimeru składającego się z podjednostek kodowanych przez dwa różne geny p35 i p40 (1). Aby dochodziło do wydajnej produkcji IL-12 konieczna jest jednakowa ekspresja obu podjednostek z wektora. Nadmiar podjednostki p40 może prowadzić do formowania się homodimeru, co w następstwie obniża produkcję IL-12. Dużo łatwiej jest, gdy zależy nam na zwiększonej produkcji tylko jednego z genów. W takiej sytuacji, jego sekwencja kodująca powinna być umieszczona jako pierwsza w kasecie ekspresyjnej, co umożliwi jego wysoką ekspresję. Przykładem może być wektor o następującej konstrukcji [promotor]-[genA]-[IRES]-[gen oporności na antybiotyki], dzięki któremu można uzyskać większą ekspresję interesującego nas transgenu i niższą ekspresję genu selekcyjnego.

Badania finansowano z projektów 1998 P01 2006 31 i PBZ-KBN 096 P05 2004 (Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego). Agnieszka Jaźwa jest stypendystką Funduszu im. Stanisława Estreichera. Alicja Józkowicz jest beneficjentem Wellcome Trust (International Senior Research Fellowship).

Literatura

1. Robertson M. J., Ritz J., (1996), *Oncologist*, 1, 88-97.
2. Wang G. L., Jiang B. H., Rue E. A., Semenza G. L., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 6, 5510-5514.
3. Mountford P. S., Smith A. G., (1995), *Trends. Genet.*, 11, 179-184.
4. Emerman M., Temin H. M., (1984), *Cell*, 39, 459-467.
5. Emerman M., Temin H. M., (1986), *Mol. Cell. Biol.*, 6, 792-800.
6. Cullen B. R., Lomedico P. T., Ju G., (1984), *Nature*, 307, 241-245.
7. Borman A. M., Bailly J. L., Girard M., Kean K. M., (1995), *Nucleic Acids Res.*, 23, 3656-3663.
8. Borman A. M., Mercier P. L., Girard M., Kean K. M., (1997), *Nucleic Acids Res.*, 25, 925-932.
9. Kozak M., (2001), *Mol. Cell. Biol.*, 21, 1899-1907.
10. Ghattas I. R., Sanes J. R., Majors J. E., (1991), *Mol. Cell. Biol.*, 11, 5848-5859.
11. Pestova T. V., Shatsky I. N., Fletcher S. P., Jackson R. J., Hellen C. U., (1998), *Genes Dev.*, 12, 67-83.

12. Losordo D. W., Dimmeler S., (2000), *Circulation*, 1, 2487-2491.
13. Fukusa S., Yoshii S., Kaga S., Matsumoto M., Kugiyama K., Maulik N., (2004), *Mol. Cell Biochem.*, 264, 143-149.
14. Risau W., (1997), *Nature*, 17, 671-674.
15. Carmeliet P., (2003), *Nat. Med.*, 9, 653-660.
16. Yla-Herttuala S., Alitalo K., (2003), *Nat. Med.*, 9, 694-701.
17. Arsic N., Zentilin L., Zacchigna S., Santoro D., Stanta G., Salvi A., Sinagra G., Giacca M., (2003), *Mol. Ther.*, 7, 450-459.
18. Cao R., Brakenhielm E., Pawliuk R., Wariaro D., Post M. J., Wahlberg E., Leboulch P., Cao Y., (2003), *Nat. Med.*, 9, 604-613.
19. Dulak J., Józkowicz A., Guevara I., Dembińska-Kieć A., (1999), *Pol. J. Pharmacol.*, 51, 233-241.
20. Javerzat S., Auguste P., Bikfalvi A., (2002), *Trends Mol. Med.*, 8, 483-489.
21. Ferrara N., Gerber H. P., LeCouter J., (2003), *Nat. Med.*, 9, 669-676.
22. Mizuguchi H., Xu Z., Ishii-Watabe A., Uchida E., Hayakawa T., (2000), *Mol. Ther.*, 1, 376-382.
23. Kapturczak M., Zolotukin S., Cross J., Pileggi A., Molano R. D., Jorgensen M., Byrne B., Flotte T. R., Ellis T., Inveradi L., Ricordi C., Nick H., Atkinson M., Agarwal A., (2002), *Mol. Ther.*, 5, 154-160.
24. Chen L., Chen D., Block E., O'Donnell M., Kufe D. W., Clinton S. K., (1997), *J. Immunol.*, 159, 351-359.