

Czynniki determinujące ekspresję zrekombinowanych genów *in vitro* u *Escherichia coli*.

Część I — Konstrukcja i stabilność wektorów

Włodzimierz Grajek

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Akademia Rolnicza
Poznań

Wydajna ekspresja zrekombinowanych genów zależy od wielu czynników. Do najważniejszych z nich należy zaliczyć dokładną replikację i segregację wektorów ekspresyjnych w kolejnych generacjach komórek oraz efektywną produkcję zrekombinowanego białka. W przemysłowych procesach biotechnologicznych istotną rolę odgrywa dodatkowo możliwość regulacji procesu ekspresji genów przez czynniki zewnętrzne oraz uzyskanie produktu o oczekiwanej aktywności biologicznej i możliwie jak najwyższej czystości chemicznej. Większość wymienionych postulatów powinna być uwzględniana już na etapie konstrukcji wektora ekspresyjnego.

1. *Escherichia coli* jako organizm gospodarz

Znaczna część studiów nad rekombinacją DNA jest prowadzona przy użyciu bakterii *Escherichia coli*. Jedną z zasadniczych przyczyn wyboru tego drobnoustroju jest dobra znajomość jego genomu i fizjologii. Bakterie *E. coli* są organizmem, dla którego opracowano szereg efektywnych systemów ekspresyjnych. W praktyce wykorzystuje się trzy typy wektorów: plazmidowe, fagowe i kosmidy, przy czym zdecydowaną większość stanowią plazmidy. Duża ich część jest dostępna handlowo. Istotne znaczenie ma także pozyskanie dużej liczby mutantów, wykazujących defekty metaboliczne.

Z punktu widzenia ekspresji obcych genów *E. coli* wykazuje zarówno zalety, jak i wady (tab. 1). Do wad należy zaliczyć wytwarzanie szeregu substancji stanowiących zanieczyszczenie produkowanego białka. Organizm ten wykazuje także poważne braki wynikające z niewłaściwego fałdowania białek i braku zdolności posttranslacyjnej modyfikacji białek, jak np. ich glikozylacji. Przy produkcji białek występują też problemy z ich rozpuszczalnością.

TABELA 1
ZALETY I WADY *E. COLI* JAKO ORGANIZMU GOSPODARZA DLA KLONOWANIA GENÓW

Zalety	Wady
mutanty bezpieczne dla ludzi	trudności z sekrecją białek
mutanty rosnące tylko w warunkach <i>in vitro</i> (<i>E. coli</i> K - 12, <i>E. coli</i> W) dobra znajomość genomu	niewłaściwe fałdowanie białek
szeroka gama wektorów ekspresyjnych	brak zdolności do modyfikacji posttranslacyjnej białek
zdolność do ekspresji wielu genów	tworzenie nierozpuszczalnych inkluzji białkowych
doświadczenie w hodowlach przemysłowych	

2. Efektywna replikacja i segregacja

Prawidłowy przebieg replikacji DNA stanowi podstawowy warunek klonowania genów. Między szybkością wzrostu komórek a szybkością replikacji DNA mogą zachodzić znaczne różnice. Synteza DNA jest stała i jej dostosowanie do wzrostu komórek polega na uruchomieniu odpowiedniej ilości widełek replikacyjnych. Stąd w komórkach *E. coli*, które ulegają szybkim podziałom, pojawia się kilka widełek replikacyjnych. Regulacja procesu replikacji genów w komórce polega zatem na kontroli inicjacji cyklu replikacyjnego.

Inicjacja replikacji jest powiązana z takimi zjawiskami jak: synteza białka komórkowego, RNA, błon biologicznych i ścian komórkowych. Dla prawidłowego przebiegu replikacji konieczne jest dobre odżywianie komórki, szczególnie powinno ono zawierać substancje azotowe i fosforowe. Wystąpienie deficytu aminokwasowego prowadzi do zahamowania syntezy białka, a następnie do zahamowania inicjacji nowych rund replikacyjnych. Potwierdza to obserwacja, że po wprowadzeniu nowej porcji pożywki następuje najpierw szybka synteza białek, natomiast synteza DNA rozpoczyna się z pewnym opóźnieniem. Świadczy to o konieczności akumulacji w komórce określonych ilości białek regulatorowych, niezbędnych dla inicjacji replikacji lub też rozcieńczenia białek represorowych przez inne białka, zgodnie z „teorią rozcieńczenia inhibitora”. Dobre odżywienie kultury należy uznać za warunek konieczny dla replikacji DNA.

W praktyce zasadnicze znaczenie ma możliwość kontroli miejsca (*origin*) inicjacji, najlepiej przez czynnik środowiskowy. Dzięki temu możliwe jest utrzymywanie liczby kopii plazmidów na zredukowanym poziomie, aż do fazy produkcyjnej procesu. Czynnikiem kontrolnym może być skok temperatury lub dodatek substancji chemicznej.

Wśród najbardziej efektywnych regulatorów inicjacji replikacji należy wymienić wrażliwy na temperaturę ColE1 *origin*, który może być wmontowany w różne plazmidy funkcjonujące w *E. coli*. Poprzez szybkie podniesienie tem-

peratury hodowli możliwe jest zwiększenie liczby kopii plazmidu z 25 do ok. 1000. Podobne regulatory wrażliwe na temperaturę są stosowane w plazmidach R1.

Wiele ze stosowanych obecnie plazmidów wykazuje dobrą stabilność segregacyjną. Przykładem mogą być plazmidy R, kodujące oporność antybiotykową. Melling i in. (20) stwierdzili pełną stabilność takich plazmidów w ciągłej hodowli *E. coli* prowadzonej przez 144 godziny przy szybkości rozcieńczenia $D=0,05-1,0 \text{ h}^{-1}$ kontrolowanej przez stężenia źródła węgla, fosforu bądź magnezu (zasada chemostatu), bez selekcji antybiotykowej. Podobne obserwacje znaleźć można w publikacji Woutersa i van Andela (33). Potwierdzają oni utrzymanie wysokiej oporności antybiotykowej w ciągłych hodowlach ($D = 0,05-0,5 \text{ h}^{-1}$) prowadzonych pod kontrolą źródła węgla, azotu i fosforu, bez selekcji antybiotykowej. Kultury prowadzone były w warunkach tlenowych i beztlenowych. Patnaik (26) podaje model matematyczny opisujący prawdopodobieństwo utraty plazmidu w ciągłej hodowli *E. coli*.

Dużą przydatność dla stabilizacji plazmidów wykazuje system aktywnej segregacji. Jest on oparty na wykorzystaniu plazmidów o małej liczbie kopii, takich jak plazmid F, profag P1 i R1. Wektory te wyposażone są w specjalny locus dla aktywnego rozdziału plazmidu między kolejnymi pokoleniami.

Jednym z najbardziej znanych plazmidów tego typu jest plazmid F. Posiada on sekwencję inicjacji replikacji oraz trzy odkryte niedawno mechanizmy regulacyjne segregacji: *sop* (ang. *stands for stability of plasmid*), *ccd* (ang. *stands for coupled cell division*) i *flm* (ang. *stands for F leading region maintenance function*).

Hiraga (12) wskazuje, że region *sop* działa jako główny czynnik odpowiedzialny za równy rozdział DNA plazmidowego do komórki potomnej. W ramach regionu *sop* można wyróżnić trzy podregiony kodujące białka biorące udział w regulacji segregacji plazmidu. Podstawową rolę odgrywa białko *sopC*, zaś pozostałe podregiony, tj. *sopA* i *sopB*, pełnią funkcje regulatorowe dla działania *sopC*. W innej publikacji naukowcy z tej grupy wskazują na dodatkowy mechanizm *ccd*, w którym biorą udział dwa geny *ccdA* i *ccdB* (15). Białko kodowane przez *ccdB* hamuje normalny wzrost komórek, podczas gdy drugi gen znosi ten efekt. W komórkach bezplazmidowych brak białka *ccdA* blokuje wzrost i w konsekwencji powoduje śmierć komórek. Trzeci mechanizm, polega na eliminowaniu segregantów poprzez produkcję letalnych metabolitów po stracie plazmidu.

Wymienione sekwencje stabilizujące mogą być z powodzeniem wykorzystywane do stabilizacji wielu plazmidów. Przykładem tego typu rozwiązań może być wmontowanie genów *parA* i *parB* z plazmidu R1 oraz genów *ccd* i *sop* z plazmidu F do szeroko stosowanego wielokopijnego plazmidu pBR322 (3).

TABELA 2
WPLYW LOCUS SEGREGACJI NA STABILNOŚĆ PLAZMIDÓW (17)

Plazmid	Klonowany gen	locus stabilności	Stabilność [%]
pBR322 - trpBA	trpA, trpB	żaden	10
pBR322 - trpBA	trpA, trpB	sop (mini - F)	100
pYT471	aspA	żaden	10
pNK1101	aspA	par (pSC101)	100

Porter i in. (27) uzyskali znaczne wzmocnienie stabilizacji plazmidu po przeniesieniu z chromosomu na plazmid sekwencji *ssb*, kodującej białko regulatorowe dla inicjacji replikacji. Jednocześnie utrzymano wysoką produkcję β - laktamazy, będącej produktem ekspresji genu.

Jednym z ważnych czynników decydujących o stabilności segregacyjnej plazmidów w hodowlach ciągłych jest szybkość rozcieńczania (tab. 3). Na ogół wzrost szybkości rozcieńczania sprzyja zachowaniu w populacji komórek posiadających plazmid z rekombinowanym genem (24,29).

TABELA 3
STĘŻENIE KOMÓREK ZAWIERAJĄCYCH PLAZMIDY (X^+)
W ZALEŻNOŚCI OD SZYBKOŚCI ROZCIEŃCZANIA (KOMÓRKI/ml) (24)

Szybkość rozcieńczania	Czas hodowli (h)		
	50	100	150
D=0,1	3×10^2	4×10^1	0
D=0,3	1×10^3	3×10^2	$1,02 \times 10^2$
D=0,7	2×10^3	$1,02 \times 10^3$	8×10^2

3. Liczba wprowadzonych genów

Do najważniejszych czynników wpływających na poziom produkowanych białek należy liczba kopii zrekombinowanych genów wprowadzonych do komórki. Liczba kopii genów kodujących rekombinowane białko w komórce można zwiększyć poprzez (1) stosowanie plazmidów występujących w dużej liczbie kopii oraz poprzez (2) stosowanie genów zwielokrotnionych.

3.1. Liczba kopii plazmidów

Jednym z najważniejszych czynników wpływających na poziom produkowanych białek jest liczba kopii zrekombinowanych genów wprowadzonych do komórki. Stąd też ważnym elementem strategii jest wybór takich plazmidów,

które wykazują zdolność do występowania w zwiększonej liczbie kopii. Pod pojęciem tym rozumie się liczbę plazmidów przypadających na komórkę *E. coli*.

Badania nad produkcją obcych białek przez zrekombinowane szczepy *E. coli* wykazały współzależność między liczbą kopii plazmidów a ilością produkowanych białek. Stwierdzono, że im większa jest liczba kopii klonowanych genów, tym większa jest produkcja białka kodowanego przez te geny. Należy jednak odnotować, że ze wzrostem liczby kopii zrekombinowanych genów zmniejsza się szybkość wzrostu komórek. Zależność ta nie jest prostoliniowa. Ilość białka produkowanego w przeliczeniu na jedną kopię genu zmniejsza się w miarę wzrostu stężenia kopii genu w komórce. Seo i Bailey (30) stwierdzili, że *E. coli* HB101, zawierająca 37,5 razy więcej plazmidowego DNA kodującego białko β -laktamazy, niż szczep porównawczy, produkowały tylko 7 razy więcej tego enzymu. Przyczyna tego zjawiska nie jest w pełni wyjaśniona. Przypuszcza się, że część plazmidów wskutek niestabilności nie bierze udziału w ekspresji genu. Warto zauważyć, że plazmidy o dużej liczbie kopii są zdolne do większej produkcji białka, a tym samym do silnego spadku maksymalnej właściwej szybkości wzrostu μ_{max} . Wystarczy zatem minimalne zachwianie w segregacji plazmidów, aby szybko zostały one wyeliminowane z populacji komórek. Inną przyczyną może być wystąpienie reakcji ograniczającej szybkość całego szlaku ekspresyjnego, która jest niezależna od liczby kopii plazmidów.

Aiba i in. (1) wskazują, że do uzyskania maksymalnej produkcji białek nie jest konieczna maksymalna liczba kopii plazmidu, ale jego optymalne stężenie. Obserwacja ta dotyczy różnych rodzajów plazmidów.

Liczba kopii wywiera silny wpływ na stabilność plazmidów. Na ogół system ekspresyjny występujący w wielu kopiach jest mniej stabilny niż system o małej liczbie kopii. Duży wpływ na liczbę kopii, w której może występować plazmid, mają warunki hodowli, a zatem czynniki zewnętrzne. Wśród nich można wymienić: szybkość wzrostu komórki, metodę hodowli, temperaturę hodowli i skład pożywki.

Wyniki uzyskane na podstawie przeprowadzonych prac nad określeniem związku między liczbą kopii a szybkością wzrostu wskazują, że im szybszy jest wzrost, tym mniejsza jest liczba kopii plazmidów (10,30). Jednocześnie zwiększenie szybkości wzrostu sprzyja syntezie białek i prowadzi do wzrostu ich koncentracji w komórce (18).

Regulacja szybkości wzrostu mikroorganizmów wiąże się bezpośrednio z wyborem metody ich hodowli. Do metod umożliwiających uzyskanie dużej szybkości wzrostu należą: okresowo-dolewowa (ang. *fed-batch*) i ciągła (ang. *continuous culture*). Obie metody zapewniają utrzymanie warunków hodowli zbliżonych do optymalnych, dotyczy to szczególnie hodowli ciągłej. Badania prowadzone przez Jonesa i in. (16) wykazały, że w ciągłej hodowli *E. coli* zawierającej plazmid pDS1109 nie stwierdzono występowania komórek bez plazmidów, mimo długiego okresu hodowli. Dopiero pojawienie się ograniczenia żywieniowego wywołało kilkukrotne zmniejszenie się liczby kopii plazmidu.

Innym ważnym czynnikiem wpływającym na liczbę kopii jest skład pożywki hodowlanej (30), a szczególnie rodzaj składnika ograniczającego (tab. 4).

TABELA 4
 WPŁYW POŻYWKI OGRANICZAJĄCEJ SZYBKOŚĆ WZROSTU KOMÓREK
 Z PLAZMIDAMI (X⁺) I BEZ PLAZMIDÓW (X⁻) U *E. COLI* (29)

Pożywka	Szybkość wzrostu (h ⁻¹)		
	X ⁺	X ⁻	X ⁺ /X ⁻
M9	1,05	1,13	1,08
ograniczenie stężenia glukozy	0,93	1,05	1,13
fosforany	0,94	1,05	1,12
amoniak	0,64	0,74	1,16
magnez	0,75	0,91	1,21

Duży wpływ na liczbę kopii ma także temperatura hodowli i pH pożywki. W badaniach prowadzonych z *E. coli* K-12 HB101 zawierającą plazmid pKTH1220 wykazano, że przy niskiej temperaturze hodowli największa liczba kopii występuje przy pH ok. 6,8, natomiast przy wyższych temperaturach konieczne jest prowadzenie hodowli przy pH bądź wyższym, bądź niższym od wartości optymalnej dla ich wzrostu.

Jednym z najbardziej znanych plazmidów o dużej liczbie kopii jest pBR322 i jego pochodne. Plazmid ten występuje co najmniej w 20. kopiach. Posiada on dwa geny Amp^r lub Tc^r umożliwiające kontrolę wprowadzenia obcego DNA. Dla zapewnienia kontroli nad ekspresją genów stosuje się zwykle plazmidy z wbudowanym replikonem (ang. *runaway-type*), pozwalającym na wywołanie wzrostu liczby plazmidów w dowolnym momencie poprzez zmianę warunków hodowli, tj. za pomocą czynników środowiskowych, głównie przez zmianę temperatury.

Inną, znaną rodziną plazmidów występujących w wielu kopiach są plazmidy pUC. Ich poważną zaletą, w porównaniu z plazmidami pBR322, jest lokalizacja miejsc dla pojedynczych cięć na odcinku kodującym β-galaktozydazę, które mogą być dokonane przy użyciu aż 13 różnych enzymów restrykcyjnych. Selekcja komórek posiadających obce geny wprowadzone na tym odcinku odbywa się poprzez wysiew na pożywkę zawierającą 5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indoksył - β - D - galaktozyd (X - Gal). Plazmid ten występuje w komórkach w 40-70 kopiach.

W przypadku stosowania plazmidów występujących w dużej liczbie kopii dochodzi często do zatrucia komórki przez zrekombinowane białka. Aby tego uniknąć zaleca się stosowanie plazmidów o małej liczbie kopii, jak pACYC177, pACYC184 i pochodnych plazmidu RSF1010.

3.2. Geny zwielokrotnione

Dla wywołania wysokiej ekspresji genów mogą też być stosowane inne metody. Jedną z nich jest wbudowywanie w silny wektor plazmidowy podwójnego lub wielokrotnego zrekombinowanego genu. W literaturze opisano kilka takich systemów ekspresyjnych, m.in. dla acetylotransferazy chloramfenikolowej (31), glutationu (32) oraz enzymów szlaku biosyntezy proliny (8).

Przykładem tego typu wektorów może być plazmid pUS(CAT) n ($n=1,2,3\dots$), kodujący ekspresję acetylotransferazy chloramfenikolowej (CAT) i znajdujący się pod kontrolą promotora *tac* (31). Plazmid ten występuje w jednej kopii, co nie osłabia wzrostu komórek w takim stopniu jak to ma miejsce przy plazmidach o dużej liczbie kopii. Bakterie *E. coli* posiadające plazmid dla ekspresji genu CAT produkowały enzym tylko w 4% całości białek komórkowych, podczas gdy komórki wyposażone w plazmid z poczwórną liczbą genów CAT produkowały aż 16% tego białka. Widoczne jest w tym przypadku proporcjonalne zwiększenie syntezy białka.

Warto podkreślić, że stosowanie tandemów genowych chroni także produkowane białko przed proteolizą. Wynika to m.in. z korzystnej relacji stężenia białka do stężenia proteaz.

4. Czynniki regulujące transkrypcję

Największe możliwości kontroli ekspresji genów występują na poziomie transkrypcji i polegają one na regulacji inicjacji transkrypcji. Geny plazmidowe mogą podlegać ekspresji w sposób konstytucyjny lub kontrolowany przez środowisko. Podstawowym czynnikiem decydującym o ekspresji jest rodzaj stosowanego promotora.

Przykładem promotorów regulujących transkrypcję w sposób konstytucyjny u *Escherichia coli* jest promotor β -laktamazy (2), zaś przykładem promotorów nadających się do zewnętrznej kontroli transkrypcji są promotory *lac*, *tac* i *trp* (6,7,11,22). Podobną rolę do tych ostatnich mogą spełniać promotory P_R i P_L , pochodzące z bakteriofaga λ (21).

4.1. Systemy konstytucyjne

Biorąc pod uwagę możliwości regulacji transkrypcji przebiegającej pod kontrolą promotora konstytucyjnego należy stwierdzić, że z punktu widzenia biotechnologii jest to układ słabo sterowalny. Co gorsze, przy silnej ekspresji klonowanych genów, układ ten może prowadzić do przekroczenia krytycznego poziomu ekspresji, wyczerpującego możliwości metaboliczne komórki i prowadzącego do jej śmierci. Należy pamiętać, że biosynteza białka jest dla komórki najbardziej energochłonnym procesem biochemicznym. Wskutek wolniejszego wzrostu komórek zawierających plazmidy dochodzi do zastępowania komórek rekombinowanych przez komórki pozbawione plazmidów. Mimo tych trudności system konstytucyjny znalazł w kilku przypadkach praktyczne zastosowanie (5). Jego zaletą jest prostota działania. Synteza białka kodowanego przez zrekombinowane geny nie wymaga w tym przypadku ani stosowania specjalnych pożywek (bodźców chemicznych), ani skoków temperatury w czasie hodowli (bodźców fizycznych).

Wśród najbardziej znanych promotorów konstytucyjnych u *E. coli* należy wymienić: 1PP, *bla* i silne promotory fagowe T5P25.

4.2. Systemy regulowane

Duże korzyści daje stosowanie regulowanego systemu ekspresji. Efektywne wykorzystanie tego systemu wymaga prowadzenia hodowli w warunkach uniezmogliwiających ekspresję zrekombinowanych genów, natomiast sprzyjających szybkiemu wzrostowi biomasy i faworyzujących procesy replikacji DNA, w tym DNA plazmidowego. Metabolizm komórkowy jest wówczas podporządkowany procesom podziałów komórkowych. W takiej sytuacji cały system replikacji DNA komórkowego zachowuje wysoką stabilność. Wpływa to bardzo korzystnie na prawidłową segregację DNA między potomnymi komórkami, a tym samym na stabilizację zrekombinowanej cechy. W tych warunkach następuje wyrównanie szybkości wzrostu między komórkami bez plazmidów i komórkami zawierającymi plazmidy z zrekombinowanymi genami (4). Dzięki temu, nawet w przypadku pojawienia się komórek bez plazmidów, nie dochodzi do całkowitego wyeliminowania komórek zawierających zrekombinowane geny.

W praktyce strategia hodowli polega na utrzymaniu szybkiego wzrostu kultury, przy jednoczesnej blokadzie ekspresji genów plazmidowych aż do momentu, gdy hodowla będzie realizowana w skali przemysłowej, tj. co najmniej po ok. 20 – 25 generacjach.

Po osiągnięciu wysokiego stężenia biomasy, zwykle w ostatnim stadium hodowli przemysłowej, wprowadza się bodziec prowokujący ekspresję genów. Może nim być dodatek induktora, inhibitora, gwałtowna zmiana temperatury i inne stymulatory. Natura wprowadzanego bodźca musi być dostosowana do typu używanego promotora.

Dużo większy problem stanowi kontrola promotorów w plazmidach występujących w wielu kopiach. Obok kontroli na poziomie operonu pojawia się problem właściwej segregacji plazmidów. Zagadnienie to zostanie omówione na przykładzie kontroli plazmidu pCT70. Badania nad ekspresją tego plazmidu w *E. coli* HB101 napotkały na duże trudności we właściwej kontroli procesu. Plazmid pCT70 występuje normalnie w 40-60 kopiach i zawiera geny kodujące produkcję Met-prochymozyny pod kontrolą chromosomalnego promotora *trp* (4). W obecności tryptofanu ekspresja tego genu jest blokowana. W przeprowadzonych badaniach wykazano jednak, że kontrola promotora nie funkcjonuje, i Met-prochymozyna jest produkowana nawet w obecności 100 mg tryptofanu w litrze pożywki. Co więcej, ekspresja zrekombinowanego genu prowadziła do szybkiego wyeliminowania plazmidu z hodowanej kultury. Pełną kontrolę nad tym systemem ekspresyjnym uzyskano dopiero po wprowadzeniu nowego plazmidu, którego liczba kopii była kontrolowana przez promotor fagowy λP_R , przy zachowaniu kontroli ekspresji genu przez promotor *trp*. Promotor fagowy, poprzez ograniczenie liczby kopii plazmidu pCT70, przyczyniał się do polepszenia jego segregacji. Proces ten był dodatkowo wzmacniany przez zmniejszenie szybkości wzrostu właściwego komórek dzięki prowadzeniu hodowli w temp. 30°C. W tych warunkach promotor *trp* w pełni blokował syntezę białka enzymatycznego. Po osiągnięciu właściwej gęstości populacji temperaturę podnoszono do 42°C i pozwalano na amplifikację pla-

zmidu i ekspresję genu, co prowadziło do intensywnej produkcji Met-prochymozyny. Jest to dobry przykład korzystnego wpływu ograniczenia liczby kopii plazmidów na ich stabilność segregacyjną.

4.3. Silne promotory

Prawie wszystkie promotory u organizmów prokariotycznych posiadają dwa regiony charakteryzujące się odcinkami o dużej zgodności (13). Regiony te rozsunięte są względem siebie o ok. 17 par zasad i nazywane są regionem -35 o sekwencji 5'TTGACA' i regionem -10 o sekwencji 5'TATAAT3'. Skutki mutacji wywołanych w tych regionach wskazują, że regiony te mają zasadnicze znaczenie dla aktywności promotora. Cecha ta została wykorzystana do konstrukcji *in vitro* promotorów o nieznacznych modyfikacjach przeprowadzonych w obrębie tych dwóch specyficznych regionów. Jednym z najczęściej stosowanych promotorów jest promotor *tac*.

TABELA 5

PRZYKŁADY MODYFIKACJI SEKWENCJI W OBRĘBIE REGIONU -35 I REGIONU -10 U *E. COLI* (13)

Promotor	Region -35	Region -10
<i>trp</i>	-TTGACA-	-TTAACT-
<i>tacI</i>	-TTGACA-	-TATAAT-
<i>tacII</i>	-TTGACA-	-TTTAAT-
<i>lacUV5</i>	-TTTACA-	-TATATT-

Został on skonstruowany poprzez fuzję -35 regionu promotora *trp* i -10 regionu promotora *lacUV5*. Promotor *tac* jest pod kontrolą genu *lacI* (produkującego białko represyjne) i może być indukowany przez dodatek IPTG (izopropylu - β -D-1-tiogalaktopiranozydu). Promotor *tac* jest szeroko wykorzystywany w wektorach plazmidowych.

Modyfikacje w obrębie tych regionów pozwoliły na uzyskanie serii promotorów, nazywanych tzw. silnymi promotorami, które odznaczały się wielokrotnym zwiększeniem wydajności transkrypcji *in vivo*. Przykładowo, promotor *tacI*, wywodzący się z promotora tryptofanowego, po wprowadzeniu do mutantu *E. coli lacUV5*, niewrażliwego na represję kataboliczną, wykazał 11 razy większą wydajność transkrypcji niż oryginalny mutant. Podobnego pochodzenia promotor *tacII* odznaczał się 8-krotnie większą wydajnością od *lacUV5*. Tego typu silne promotory mają duże zastosowanie w biotechnologii. Niekiedy dodatkowy efekt uzyskać można przez zdublowanie promotorów dla danego genu.

Innym przykładem silnego promotora jest syntetyzowany chemicznie promotor *pac* (31). Składa się on z -35 regionu silnego promotora fagowego T5P25 oraz -10 regionu i operatora promotora *lacUV5*. Siła jego jest 2,7 razy większa niż promotora *tac*.

Uzyskane wyniki wskazują, że o sile danego promotora decyduje sekwencja nukleotydów na odcinku wiązania polimerazy RNA oraz zdolność do wiązania czynników regulacyjnych, tj. represora, aktywatora lub efektor. Do silnych promotorów można zaliczyć również promotor λ , działający pod kontrolą λ – represora, wrażliwego na zmianę temperatury oraz promotory wyposażone w *trp* – operatory, indukowane przez IAA (kwas indoliloctowy).

Warto także zwrócić uwagę na to, że większa liczba promotorów nie sprzyja zwiększonej szybkości transkrypcji. Z kolei duża liczba kopii plazmidu wywiera korzystny wpływ na ogólną szybkość transkrypcji w komórce. Zaznaczyć przy tym należy, że w miarę wzrostu liczby kopii plazmidów w komórce spada wydajność promotora, rozumiana jako liczba kompleksów transkrypcyjnych tworzonych przez plazmid (tab. 6) (25).

4.4. Rola terminatorów

W regulacji syntezy niektórych produktów, np. aminokwasów, obok inicjacji transkrypcji występuje również kontrola ekspresji genów poprzez wcześniejszą terminację, tzw. atenuację. Pozwala ona na zwiększenie wydajności transkrypcji poprzez zminimalizowanie długości transkryptów, tj. ograniczenie ich transkrypcji tylko do odcinka kodującego określone białko. Zwykle operony wyposażone w silne promotory powinny posiadać silne terminatory. Jednym z nich dostępnych komercyjnie, jest terminator transkrypcyjny *trpA*.

5. Regulacja translacji

Ważnym czynnikiem wpływającym na wydajność ekspresji genów jest powinowactwo aktywnych rybosomów do obu rodzajów mRNA, tj. do mRNA chromosomowego i plazmidowego. Między obu rodzajami RNA występuje współzawodnictwo o dostęp do wolnych rybosomów oraz do puli aminokwasowej.

TABELA 6
ZALEŻNOŚĆ MIĘDZY LICZBĄ KOPII PLAZMIDÓW A SZYBKOŚCIĄ TRANSKRYPCJI I TRANSLACJI (25)

Liczba plazmidów	Wydajność promotora	Wydajność łączenia mRNA z rybosomami	Szybkość transkrypcji	Szybkość translacji
24	1	1	1	1
59	1,03	0,77	0,86	1,18
112	0,76	0,66	1,13	1,13
166	0,70	0,87	0,76	1,14
244	0,51	0,66	0,76	1,42
512	0,28	0,43	0,67	1,50

W przeprowadzonych badaniach modelowych na *E. coli* sugeruje się, że wzmocnienie siły sekwencji miejsca powinowactwa do rybosomów (RBS, *ribo-*

some binding site) jest lepszym sposobem zwiększenia syntezy produktów kodowanych przez klonowane geny, niż zwiększanie ich stężenia (9). Zaletą takiego rozwiązania jest ograniczenie hamowania szybkości wzrostu komórek, występującego przy zwiększaniu ilości DNA (wprowadzaniu plazmidu i zwielokrotnieniu genów). Celowe wydaje się zatem wprowadzanie do plazmidu za promotorem sekwencji RBS dla produkowanego białka.

Duży wpływ na wynik translacji ma stabilność mRNA. Zależy to przede wszystkim od podatności tych kwasów na atak rybonukleaz. Warto podkreślić, że czas trwania mRNA jest bardzo krótki.

Efektywność łączenia się RNA z rybosomami oraz szybkość elongacji polipeptydów zależą od liczby kopii plazmidów, co ilustrują dane przedstawione w tab. 6. Wydajność translacji jest uwarunkowana przede wszystkim szybkością przyłączania się mRNA do nieaktywnych rybosomów.

Literatura

1. Aiba S., Tsunekawa H., Imanaka T., (1982), *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 289 - 297.
2. Bernard H. U., Helinski D. R., (1980), *Genet. Eng.*, 2, 133 - 167.
3. Boe L., Gerdes K., Molin S., (1987), *J. Bacteriol.*, 169, 4646.
4. Caulcott C. A., Lilley G., Wright E. M., Robson M. K., Yarranton G., (1985), *J. Gen. Microbiol.*, 131, 3355 - 3365.
5. Chang A. C. Y., Hunberg J. H., Kaufman R. J., Erlich H. A., Schimke R. T., Cohen S. N., (1978), *Nature*, 275, 617 - 624.
6. Chernajovsky Y., Mory Y., Vaks B., Feinstein S. I., Segev D., Revel M., (1983), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 413, 88 - 96.
7. DeBoer H. A., Comstock L. J., Vasser M., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 21 - 25.
8. Deutch A. H., Rushlow K. E., Smith C. J., (1984), *Nucleic Acids Res.*, 12, 6337.
9. Domach M. M., Leung S., Cahn R. E., Cocks G. G., Shuler M. L., (1984), *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 203.
10. Engberg B., Nordstroem K., (1975), *J. Bacteriol.*, 123, 179 - 186.
11. Goeddel D. V., Yelverton E., Ulrich A., Heyneker H. L., Miozzari G., Holmes W., Seeburg P. H., Dull T., May L., Stebbing N., Gross M., Familletti P. C., Pestla S., (1980), *Nature*, 287, 411 - 416.
12. Hiraga S., (1986), *Adv. Biophys.*, 21, 91.
13. Hulanicka D., (1989), *Biologia molekularna*, red. Lassota Z., PWN, Warszawa, t. I, 276 - 277.
14. Imanaka T., Aiba S., (1981), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 369, 1 - 14.
15. Jaffe A., Ogira T., Hiraga S., (1985), *J. Bacteriol.*, 163, 841.
16. Jones I. M., Primrose S. B., Robinson A., Ellwood D. C., (1980), *Mol. Gen. Genet.*, 180, 579 - 584.
17. Kobayashi M., Kurusu Y., Yukawa H., (1991), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 27, 145 - 162.
18. Lee S. B., Bailey J. E., (1984), *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 66 - 73.
19. McAllerr W. J., Buniack E., Maighetter R. Z., Wampler E., Miller W. J., Hilleman M. R., (1984), *Nature*, 307, 178 - 180.
20. Melling J., Ellwood D. C., Robinson A., (1980), *FEMS Microbiol. Lett.*, 2, 87 - 89.
21. Murooka Y., Mitani I., (1985), *J. Biotechnol.*, 2, 303 - 316.
22. Nugent M. E., Primrose S. B., Tacon W. C., (1983), *Dev. Ind. Microbiol.*, 24, 271 - 285.
23. Ollis D. F., Chang H., (1982), *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 2583 - 2586.

24. Park S. H., Ryu D. D. Y., Lee S. B., (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, 37, 404 - 414.
25. Peretti S. W., Bailey J. E., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 316 - 328.
26. Patnaik P. R., (1993), *Biotechnol. Tech.*, 7, 357-360.
27. Porter R. D., Black S., Pannuri S., Carlson A., (1990), *Bio/Technol.*, 8, 47 - 51.
28. Reinikainen P., Korpela K., Nissinen V., Olkku J., Soederlund H., Markkanen P., (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 386 - 393.
29. Sayadi S., Nasri M., Barbotin J. N., Thomas D., (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 801 - 808.
30. Seo J. H., Bailey J. E., (1985), *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 1668 - 1674.
31. Shibui T., Kamizono M., Teranishi Y., (1988), *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2235.
32. Watanabe K., Yamano Y., Murata K., Kimura A., (1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 375.
33. Wouters J. T. M., van Andel J. G., van Leeuwenhoek A., (1979), *J. Microbiol.*, 45, 317 - 318.

Factors influencing expression of recombinant genes *in vitro* in *Escherichia coli*. Part I — Construction of expression system

Summary

E. coli is the most frequently used host-organism for production of heterologous protein from cloned genes. Proper construction of expression vector is a key factor successful expression. It should ensure a good segregational stability as well as guarantee induced and regulated gene expression.

The most important DNA sequences in the expression vectors are discussed. Gene dosage effect, amplification of recombinant genes, regulation of DNA replication and transcription are described in relation to plasmid stability.

Key words:

expression, *E. coli*, recombinant genes.

Adres dla korespondencji:

Włodzimierz Grajek, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,
Akademia Rolnicza, ul. Mazowiecka 48, 60-623 Poznań.