

Zelllinien-Entwicklung

ExoIN-Technologie – ein schneller Weg zu stabilen Assay-Zelllinien

BETTINA BAUMANN, DIETMAR LENZ
TRENZYME GMBH, KONSTANZ

Clonal cell lines stably expressing a target protein are a common tool in research, but the generation of such cell lines is laborious and time-consuming. In contrast, the novel ExoIN technology guarantees easy-to-handle and fast cell line generation. By expressing selection marker and target as a polyprotein that is efficiently cleaved at the ribosome, unmodified free protein is homogeneously expressed in all cells of the stable cell population.

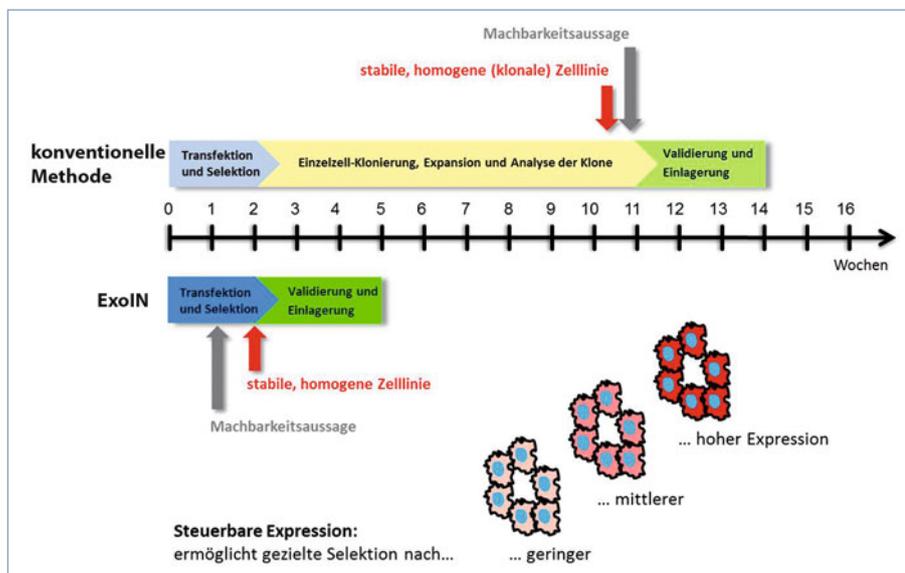
10.1007/s12268-014-0500-8
© Springer-Verlag 2014

Zur Charakterisierung zellulärer Eigenschaften und Funktionen eines Proteins wird häufig die rekombinante Expression des Proteins in Säugerzelllinien genutzt. Vorausset-

zung für diese Expression ist die Transfektion mit einem Vektor, der eine Expressionskassette mit dem Target sowie eine Antibiotikaresistenz enthält, auf die selektioniert

wird. Normalerweise wird deren Expression durch unterschiedliche Promotoren gesteuert. Dies hat den Nachteil, dass nicht alle der selektierten Zellen das Zielprotein exprimieren, z. B. wenn nur das Resistenzgen stabil integriert wurde oder wenn der Promotor des Targetgens während der Selektion abgeschaltet wird.

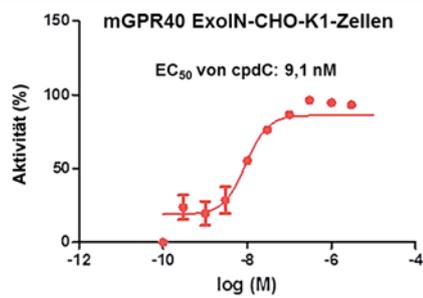
Die Expressionskassette wird an einer zufälligen Position im Genom integriert und kann durch die Umgebung stark beeinflusst werden, was die Ursache für eine heterogene Expression innerhalb einer stabilen Zellpopulation ist. Zur Herstellung einer homogenen Zellpopulation ist daher die Erzeugung und Analyse von Einzelzellklonen nötig, welche allerdings sehr aufwendig und zeitintensiv ist [1]. Ob die Herstellung der gewünschten Zelllinie möglich ist, zeigt sich auch erst am Ende des Prozesses, wenn schon viel Arbeit und Zeit investiert wurde.



Die ExoIN-Technologie

A. Varshavsky konnte zeigen, dass ein Fusionsprotein aus Ubiquitin und einem Zielprotein effizient und ortsspezifisch von Ubiquitin-spezifischen Proteasen (USPs) gespalten wird, wodurch freies Ubiquitin und freies Zielprotein entstehen [2]. Dieser Ansatz bildete die Grundlage zur Entwicklung eines eukaryotischen Expressionssystems [3] – eine Technologie, die für das ExoIN-System zur Erzeugung stabiler Zelllinien weiter optimiert und modularisiert wurde. Das ExoIN-System besteht aus einem Selektionsmarker (meist eine Antibiotikaresistenz), der über den ExoIN-Tag mit dem Zielprotein verbunden ist. Der Vorteil dieses Ansatzes liegt darin, dass der Selektionsmarker und das Zielprotein unter der Kontrolle desselben Promotors stehen und als Polyprotein exprimiert werden. Durch USPs wird dieses posttranslational zu den jeweiligen freien Proteinen prozessiert. Jede wachsende Zelle erzeugt dadurch das Zielprotein und das selektionsvermittelnde Protein im Verhältnis 1:1. Durch die Abhängigkeit von Wachstum und Expression ist eine erste Machbarkeitsaussage bereits kurz nach der Transfektion möglich (Abb. 1).

Abb. 1: Das ExoIN-System im Vergleich zu konventionellen Methoden zur Zelllinien-Erzeugung. Konventionelle Methode: Nach Transfektion und Selektion folgt die Einzelzell-Klonierung, Expansion und Analyse der Klone, um eine homogene Expression des Zielproteins zu garantieren. Die Machbarkeitsanalyse erfolgt dabei erst am Ende dieser Analyse. ExoIN: Zellen werden mit einem ExoIN-Plasmid transfiziert, das das Zielprotein, Selektionsmarker und ExoIN-Tag codiert. Alle Zellen, die unter Selektionsdruck wachsen, exprimieren auch das Zielprotein, was eine frühe Machbarkeitsaussage ermöglicht. Direkt nach der Selektion ist die Validierung und Einlagerung der erzeugten stabilen Zelllinie möglich. Über die Selektionsstärke kann zusätzlich das Expressionsniveau gesteuert werden (© Trenzyme GmbH).

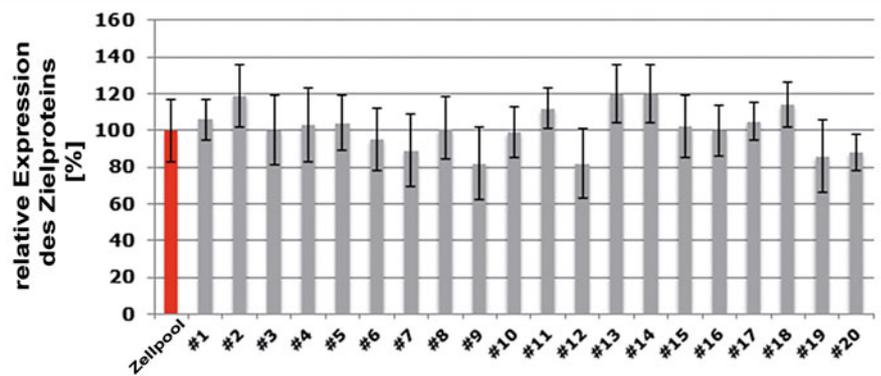


▲ **Abb. 2:** ExoIN-CHO-K1-Zellen, die stabil mGPR40 exprimieren, wurden mit Fluo-4 NW (Invitrogen) beladen und mit cpdC behandelt, einem niedermolekularen GPR40-Agonisten aus der Merck-Substanzbibliothek. Der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel stieg als Reaktion auf cpdC Dosis-abhängig an (weitere Details siehe Text; © Trenzyme GmbH).

Herstellung einer stabilen GPCR-Zelllinie mittels ExoIN-Technologie

Die Funktionalität eines mittels ExoIN-Technologie rekombinant exprimierten Proteins wurde am Beispiel eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCR) untersucht. GPCRs spielen für die Weiterleitung von extrazellulären Signalen ins Zellinnere eine zentrale Rolle und sind daher häufige Ziele funktioneller Assays. So wird der murine GPCR 40 (mGPR40) durch die Bindung freier Fettsäuren aktiviert und löst einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels aus [4]. Dieser führt zur Sekretion von Insulin, weshalb GPR40 auch als potenzielles therapeutisches Ziel bei Typ-2-Diabetes gilt [4].

Für die Experimente wurde mittels ExoIN-Technologie eine stabile CHO(*Chinese hamster ovary*)-K1-Zelllinie erzeugt, die mGPR40 homogen exprimiert. Um die Funktion des Rezeptors nachzuweisen, wurden die Zellen mit einem Kalzium-Mobilisierungsassay analysiert. Dazu wurden die Zellen in einer Konzentration von 20.000 Zellen pro Well in 96-Well-Platten ausplattiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 100 Mikroliter pro Well Fluo-4 NW (Invitrogen) beladen, das bei Kalziumeinstrom in die Zelle fluoresziert. Anschließend wurden die Zellen mit niedermolekularen GPR40-Agonisten in Konzentrationen von 0,1 Nanomol bis zehn Mikromol pro Liter in HEPES-Puffer behandelt und



▲ **Abb. 3:** Expressionslevel des Zielproteins im ExoIN-Zellpool im Vergleich zu klonalen Zelllinien. Durch Einzelzellklonierung wurden aus dem ExoIN-Zellpool (rot, 100 Prozent) klonale Zelllinien generiert und die Expression des Zielproteins per qPCR bestimmt (© Trenzyme GmbH).

die Fluoreszenz in einem Plattenlesegerät für vier Minuten gemessen. Die Analyse ergab, dass die Zellen von Agonisten aktiviert wurden und einen Dosis-abhängigen Anstieg des intrazellulären Kalziumlevels zeigten (**Abb. 2**). Die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) des synthetischen Agonisten cpdC lag mit 9,1 Nanomol pro Liter im publizierten Bereich [4].

In Experimenten mit vielen anderen ExoIN-Zelllinien stellte sich heraus, dass der Zellpool und aus ihm isolierte Einzelzellklone die gleiche Aktivität zeigen (**Abb. 3**).

Diskussion

Das ExoIN-System verfügt damit über vier entscheidende Vorteile gegenüber konventionellen Expressionssystemen: (1) Alle selektierten Zellen exprimieren das gewünschte Protein auf ähnlichem Niveau, und man erhält somit eine homogene Zellpopulation. (2) Durch die Homogenität der Zelllinie wird die Erzeugung von Einzelzellklonen oft überflüssig. (3) Schon wenige Tage nach der Transfektion ist eine Machbarkeitsaussage möglich. (4) Das Expressionslevel des Zielproteins kann über die Selektionsstärke gesteuert und eingestellt werden.

Durch die ExoIN-Technologie wird so die Erzeugung einer stabilen, homogenen Zelllinie innerhalb von nur 30 Tagen möglich. Somit konnte gezeigt werden, dass sich ExoIN-Zelllinien problemlos für den Einsatz in pharmakologischen Assays eignen,

wie beispielsweise zur Untersuchung von GPCRs.

Die ExoIN-Technologie ist damit ein wertvolles Werkzeug zur schnellen und einfachen Erzeugung von stabilen Zelllinien, die ein voll funktionsfähiges Protein homogen exprimieren. ■

Literatur

- [1] McFarland DC (2000) Preparation of pure cell cultures by cloning. *Methods Cell Sci* 22:63–66
- [2] Varshavsky A (2005) Ubiquitin fusion technique and related methods. *Methods Enzymol* 399:777–799
- [3] Matentzoglou K, Scheffner M (2009) Ubiquitin-fusion protein system: a powerful tool for ectopic protein expression in mammalian cells. *BioTechniques* 46:21–28
- [4] Tan CP, Feng Y, Zhou Y-P et al. (2008) Selective small-molecule agonists of G protein-coupled receptor 40 promote glucose-dependent insulin secretion and reduce blood glucose in mice. *Diabetes* 57:2211–2219



Bettina Baumann und Dietmar Lenz

Korrespondenzadresse:

Dr. Dietmar Lenz
Trenzyme GmbH
Byk-Gulden-Straße 2
D-78467 Konstanz
Tel.: 07531-1229027
Fax: 07531-1229011
dietmar.lenz@trenzyme.com