

GENY REPORTEROWE W BADANIACH GENETYCZNYCH

Stanisław J. Rosochacki^{1,2}, Marzena Matejczyk¹

¹*Politechnika Białostocka, Białystok*

Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska,

Zakład Biologii Sanitarnej i Biotechnologii

²*Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec*

s.rosochacki@ighz.pl

Streszczenie

Geny reporterowe mają obecnie bardzo duże znaczenie w inżynierii genetycznej i biologii molekularnej, a mogą być wprowadzane do organizmu biorcy różnymi metodami (np. na drodze iniekcji). Technologia genów reporterowych jest obecnie szeroko wykorzystywana nie tylko do monitorowania procesów zachodzących w komórce, związanych z transdukcją sygnałów komórkowych i ekspresją określonych genów, lecz również geny te stały się podstawowym narzędziem używanym w wielu laboratoriach do monitorowania *in situ* horyzontalnego transferu genów między mikroorganizmami, ich aktywności w tkankach roślinnych i zwierzęcych, w konstruowaniu biosensorów. Najbardziej popularnymi markerami w badaniach są geny wymagające użycia dodatkowych substratów do wykrycia ich ekspresji: gen β -galaktozydazy (*lacZ*), gen lucyferazy bakteryjnej lub eukariotycznej – *lux*, gen *gusA* kodujący β -glukuronidazę, gen *phoA* kodujący fosfatazę, gen monoooksygenazy – *tfd*, gen dioxygenazy 2,3-ketacholu – *xylE*, gen β -laktamazy – *bla*, transacetylaza chloramfenikolowa – *cat* oraz geny odporności na antybiotyki i metale ciężkie. Inną grupę genów stanowią geny odpowiedzialne za syntezę białek autofluorescencyjnych, a ich najważniejszym przedstawicielem jest gen kodujący białko świecąca na zielono – GFP. Gen *gfp* odkryto w meduzie *Aequorea victoria*. Białko GFP świeci w ultrafiolecie, bez potrzeby jakichkolwiek substratów, tylko w obecności tlenu atmosferycznego. Geny reporterowe znajdują zastosowanie w tworzeniu fuzji fragmentów promotora z tym genem, określeniu regionów promotorów odpowiedzialnych za regulację genów, określeniu aktywności promotora na podstawie oznaczenia aktywności białka kodowanego przez gen reporterowy, ustalaniu wewnątrzkomórkowej lokalizacji białek, tworzeniu fuzji cDNA kodującego badane białko z genem reporterowym. Wykorzystanie tych genów w biotechnologii zwierząt doprowadziło do licznych zastosowań zwierząt genetycznie zmodyfikowanych zarówno w celach poznawczych jak i praktycznych. Są one cennym modelem doświadczalnym w badaniach nad regulacją ekspresji genów oraz nad regulacją genów *in vivo*.

Słowa kluczowe: geny reporterowe, transgeneza, gen *gfp*, ekspresja genów, biosensory

Key words: reporter genes, transgenesis, *gfp* gene, gene expression, biosensors

1. Wstęp

Geny reporterowe (gen wizualizujący, marker molekularny) – definiowane są jako sekwencje DNA, które po wprowadzeniu do komórki pro- lub eukariotycznej powodują pojawienie się charakterystycznych cech fenotypowych, dzięki którym możliwe jest monitorowanie zmian zaistniałych w tych organizmach po wprowadzeniu ich do środowiska.

Gen ten koduje białko, którego obecność lub aktywność biochemiczną można w łatwy sposób oznaczyć w komórce (*in vivo*) poprzez wykorzystanie technik autoradiograficznych, spektrofotometrycznych lub bio- i chemiluminescencyjnych. Geny reporterowe łączy się w fuzje z sekwencjami, które chcemy scharakteryzować (np. otwartymi ramkami odczytu, regionami regulatorowymi, promotorami, regionami promotorów odpowiedzialnych za regulację genów, określenie aktywności promotora na podstawie oznaczenia aktywności białka kodowanego przez gen reporterowy, ustalanie wewnątrzkomórkowej lokalizacji białek, tworzenie fuzji cDNA kodującego badane białko z genem reporterowym), przy zastosowaniu technik inżynierii genetycznej (Rosochacki, 1995).

Geny reporterowe wprowadza się do badanych komórek lub organizmów na drodze transformacji (bakterie, drożdże) lub transfekcji (komórki hodowane w hodowli komórkowej), a efekt ich ekspresji może być stały lub przejściowy, w zależności od tego, czy ulegają one integracji do genomu biorcy. Konkretny gen reporterowy można stosować w danym systemie badawczym pod warunkiem, że system ten jest pozbawiony w normalnych warunkach endogenego genu homologicznego. Niezbędne jest również zastosowanie takiego wektora ekspresyjnego, który umożliwi efektywne wyrażenie białka kodowanego przez gen reporterowy w badanym układzie. Dobrze dobrany gen reporterowy charakteryzuje się następującymi cechami:

- nie występuje naturalnie w organizmie kontrolnym, pojawia się on u niego dopiero po przeprowadzonej transformacji – zdolność ekspresji w organizmie kontrolnym,
- dostarcza produktu dającego łatwo dostrzegalną zmianę fenotypową, czyli powoduje syntezę jakiegoś produktu (np. enzymu, barwnika albo świecenie organizmu),
- nie powoduje żadnych zakłóceń metabolicznych komórki i fizjologicznych w organizmie biorcy,
- jego produkt jest stosunkowo nietrwały, ale powinien wykazywać umiarkowaną stabilność *in vivo*, tak aby możliwa była regulacja ekspresji, a kodowane przez ten gen białko zachowywało swoją aktywność po przyłączeniu do jego końca (N lub C) innego peptydu,
- produkt genu wykazuje łatwość i czułość detekcji,
- nie powoduje śmierci badanego organizmu.

2. Geny reporterowe wymagające do wykrycia ich ekspresji dodatkowych substratów

Najczęściej stosowane geny reporterowe to:

- **acetylotransferaza chloramfenikolu** (ang. chloramphenicol acetyltransferase – CAT) – prokariotyczny enzym katalizujący przenoszenie grup acetylowych z acetylokoenzymu A na chloramfenikol. Enzym inaktywuje antybiotyk przez jego acetylację z wytworzeniem acetylopo pochodnych. Zaletą jego stosowania w komórkach eukariotycznych jest fakt, że komórki te praktycznie pozbawione są enzymów, które mogą z nim współzawodniczyć. W komórkach bakteryjnych stwierdzono występowanie dwóch genów *cat*. Jako enzym reporterowy stosuje się produkty genu *catI*, który występuje w transpozonie *Tn9* oraz w plazmidach R6 i pBR325 *E.coli*. Gen acetylotransferazy chloramfenikolowej (CAT) był pierwszym genem bakteryjnym, którego ekspresję wykazano w komórkach roślinnych. Gen *cat* jest obecnie jednym z głównych genów reporterowych dla układów roślinnych, jak również jest on szeroko stosowany w badaniach sekwencji regulatorowych w komórkach drożdży i u zwierząt.

Oznaczanie aktywności enzymu acetylotransferazy chloramfenikolowej jest ilościowe, a stosowane metody są bardzo czułe. W metodyce oznaczania aktywności acetylotransferazy chloramfenikolowej uwzględnić należy możliwość endogennej acetylacji antybiotyku, gdyż u wielu gatunków roślin występują niespecyficzne acylazy katalizujące acetylację chloramfenikolu z wytworzeniem 1- i 2-acetylopo pochodnych. Mechanizm działania chloramfenikolu (detreomycyny) polega na hamowaniu syntezy białek bakteryjnych poprzez:

- wiązanie się z podjednostką 50S rybosomu i blokowanie w nim miejsca A (aminokwasowego),
- blokowanie peptydotransferazy – enzymu odpowiedzialnego za tworzenie wiązań peptydowych w syntetyzowanym białku,
- uniemożliwianie uwalniania się zsintetyzowanego oligopeptydu z kompleksu z rybosomem.

Ponieważ chloramfenikol hamuje tworzenie wiązania peptydowego z udziałem peptydylotransferazy, dlatego jest on stosowany w chemioterapii (u ludzi) jako czynnik bakteriostatyczny, również jest użyteczny w badaniach jako wybiórczy inhibitor syntezy białek bez wpływania na inne metaboliczne aktywności komórki. Ponadto białko to jest bardzo stabilne – jego okres półtrwania w komórkach ssaków wynosi około 50 godzin.

- **β -galaktozydaza (β -gal)** – gen β -galaktozydazy, kodowany przez operon *lacZ*, pochodzi z bakterii *Escherichia coli*, a składający się z pięciu genów, jest powszechnie stosowany jako gen markerowy (reporterowy).

Enzym ten jest hydrolazą katalizującą hydrolizę β -galaktozydów do monosacharydów. Jest najczęściej stosowanym markerem różnicującym w genetyce molekularnej. W wektorze używanym do transformacji znajduje się

N-końcowy fragment genu *lacZ*, natomiast w organizmie biorcy fragment C-końcowy. W wyniku współdziałania obu elementów powstaje w pełni aktywny enzym. W eksperymencie transformacji fragment DNA (wstawka) jest umieszczany w obrębie sekwencji N-końcowej genu *lacZ*, co automatycznie powoduje jego uszkodzenie. Aby wykryć w komórkach obecność enzymu, umieszcza się je na pożywce zawierającej X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolylo- β -D-galaktozyd), i w przypadku obecności β -galaktozydazy będzie można zaobserwować pojawienie się niebieskiego produktu (4-chloro-3-bromo-indygo), powstałego w wyniku cięcia X-gal. Oznaczać to będzie, iż biorca przyjął plazmid, ale pusty (bez wstawki). Ilość tego barwnego produktu reakcji można w łatwy sposób mierzyć kolorymetrycznie. Zabarwienie można również obserwować w komórkach, tkankach i narządach organizmów transformowanych wektorami z β -galaktozydazą. Jeśli natomiast niebieski produkt nie powstanie, to można wnioskować, iż eksperyment zakończył się sukcesem (bakteria pobrała plazmid ze wstawką). Omawiany test nosi nazwę α -komplementacji. Oznaczanie aktywności enzymu w innym materiale (np. u zwierząt) może być wykorzystane np. do określania mozaicyzmu transgenicznego (Rosochacki i in. 2002). Przeprowadzenie testu na obecność β -galaktozylazy jest zabójcze dla tkanki.

- **β -glukuronidaza (GUS)** – enzym kodowany przez gen bakteryjny *gus* (locus *uidA* z *E. coli*), często wykorzystywany w badaniu ekspresji genów roślin, ze względu na wysoką czułość oraz ze względu na dużą stabilność enzymu w komórkach roślin i na bardzo niskie tło, a co za tym idzie – obniżenie częstości fałszywych wyników. Co ciekawe, gen ten może być stosowany jako reporter mimo faktu występowania homologicznego genu w organizmach roślin – wynika to z faktu, że optymalne pH dla enzymu bakteryjnego jest znacznie wyższe niż w przypadku enzymu endogennego. Jest on obecnie najczęściej stosowanym genem reporterowym w badaniach transformacji komórek roślinnych, szczególnie w transformacjach zbóż.

Użyteczność GUS jako enzymu reporterowego wynika z jego małej (zwykle nieoznaczalnej) endogennej aktywności:

- u roślin (z rodzin *Solanaceae*, *Graminaceae* i *Brassicaceae*),
- u drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*),
- u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*).

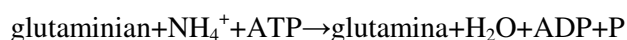
Powszechnie stosowanym substratem w oznaczaniu aktywności biochemicznej GUS jest X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolylo- β -D-glukuronid), a sama reakcja przebiega analogicznie, jak w przypadku β -galaktozydazy. Hydrolizowane przez nią substraty β -glukuronidu mogą być wykrywane fluorometrycznie, luminescencyjnie lub histologicznie. Analiza histochemiczna pozwala zlokalizować miejsce aktywności tego genu w tkance.

Aktywność enzymu β -glukuronidazy można wykrywać w roślinach, gdzie wykazuje:

- znaczną stabilność termiczną,
- odporność na działanie proteaz,
- wymaga jednak ochrony grup tiolowych,
- jest inaktywowany jonami metali ciężkich.

Ten system reporterowy zapewnia wysoką czułość ze względu na dużą stabilność enzymu w komórkach roślin; przeprowadzenie testu na obecność β -glukuronidazy jest zabójcze dla tkanki.

- **gen *bar*** – jest genem niosącym odporność na fosfinitricynę (PPT), substancję czynną herbicydu Basta (Hoechst AG). Gen *bar* uzyskany z bakterii *Streptomyces hygrosopicus* jest genem markerowym, umożliwiającym selekcję komórek, tkanek i całych roślin i dlatego jest bardzo często stosowany w badaniach nad transformacją roślin. Fosfinitricyna występuje w formie trójpeptydu (składa się z dwóch reszt L-alaniny i analogu kwasu glutaminowego), który po odłączeniu reszt alaniny w komórce staje się inhibitorem enzymu syntetazy glutaminy (GS), to powoduje z kolei nagromadzenie się w niej amoniaku. Hamowana jest wtedy fotosynteza i komórki giną. Enzym ten katalizuje reakcję:



Gen odporności *bar* koduje enzym acetylotransferazę, która acetyluje grupy NH_2 z fosfinitricyny – PPT, co powoduje jej inaktywację oraz zapobiega blokowaniu GS w komórkach. Acetylotransferaza odgrywa zasadniczą rolę w asymilacji amoniaku i regulacji metabolizmu azotu w roślinach. Jest enzymem wiążącym amoniak uwolniony w wyniku redukcji azotanów, degradacji aminokwasów i fotooddychania.

- **lucyferazy** – enzymy kodowane przez geny występujące między innymi u morskich bakterii *Vibrio fischeri* i *Vibrio harveyi* (*lux*), robaczka świętojańskiego *Photinus pyralis* (ang. firefly) lub jamochłona morskiego *Renilla reniformis* (ang. sea pansy) – oznaczane odpowiednio jako *Pp Luc* lub *Rr Luc*.

Lucyferazy katalizują bioluminescencyjną reakcję przemiany substratu – lucyferyny, która w obecności ATP, jonów Mg^{2+} oraz tlenu cząsteczkowego ulega utlenieniu i przechodzi w stan wzbudzenia, a następnie – powracając do stanu wyjściowego – powoduje emisję światła. Emitowane fotony są zliczane przy pomocy luminometru. Całkowita emisja światła jest wprost proporcjonalna do aktywności lucyferazy w badanej próbce i pozwala na oszacowanie aktywności transkrypcyjnej genu reporterowego. Lucyferazy charakteryzują się szybkim tempem rozpadu w komórkach ssaczy ($t_{1/2} = \sim 3 \text{ h}$).

Gen *lux* pochodzi z luminescencyjnych morskich bakterii *Vibrio fischeri* i *Vibrio harveyi* i wymaga zaangażowania pięciu genów zintegrowanych w operon *lux CDABE*. Lucyferaza bakteryjna powoduje powstawanie bakteryjnej luminescencji, katalizując przekształcenie zredukowanego mononukleotydu flawinowego – FMNH, O_2 i długołańcuchowego (min. 8 atomów węgla) aldehydu

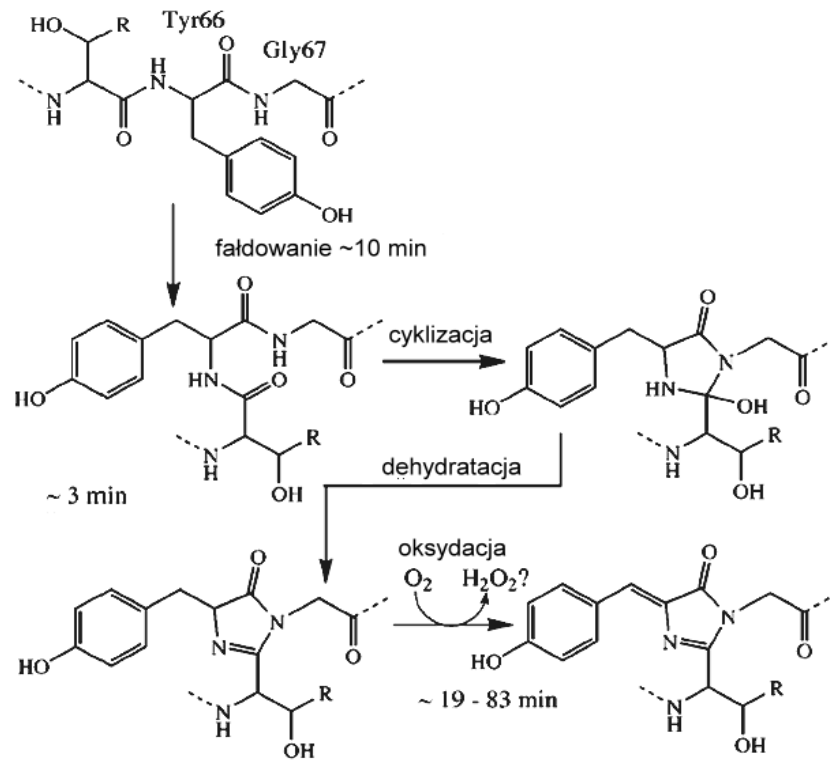
– RCHO, jako kofaktorów reakcji – w produkty, którymi są mononukleotyd flawinowy – FMN jako bakteryjna lucyferaza, RCOOH, H₂O i światło o długości fali 478-505nm. Do jej wykrycia potrzebny jest specjalny przyrząd, zwany luminometrem, często połączony z systemem video. Gen *lux* jest bardzo popularnym markerem wykorzystywanym w konstrukcji biosensorów.

Gen lucyferazy robaczka świętojańskiego (*Photinus pyralis*) – *Pp Luc* katalizuje przekształcenie ATP, lucyferyny i O₂ w produkty: AMP, PP_i, CO₂, H₂O, oksylucyferynę i światło o długości fali 562nm. Wydajność lucyferazy świetlików jest znacznie wyższa niż bakteryjna, ponadto występuje w formie monomeru, co jest dodatkowym atutem skłaniającym genetyka do wyboru właśnie genu *Pp Luc*.

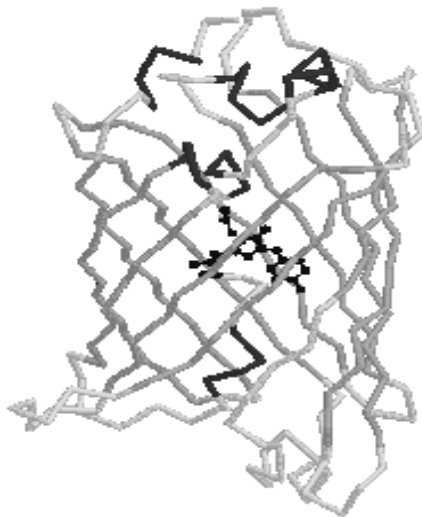
Obecnie dostępne są zrekombinowane plazmidy, w których wykorzystano cDNA genu lucyferazy. Plazmidy takie stosuje się do bezpośredniej transformacji protoplastów marchwi metodą elektroporacji, jak też do transformacji tytoniu z użyciem szczepu *A. tumefaciens*. Aktywność enzymu związana jest z białkiem kodowanym przez pojedynczy gen. Enzym wykazuje dużą specyficzność w stosunku do lucyferyny. Brak układu enzym-substrat w roślinach oraz znaczna czułość reakcji decydują o tym, że lucyferaza jest dogodnym enzymem reporterowym. Aktywność lucyferazy, mierzona emisją światła – luminescencji, stwierdzono w stransformowanych protoplastach, tkankach stransformowanych roślin oraz w całych roślinach. Istotną zaletą jest także możliwość dokładnego pomiaru ilości wyemitowanych fotonów za pomocą luminometru.

3. Gen *gfp* – białka zielonej fluorescencji GFP

Gen *gfp* – białka zielonej fluorescencji (ang. green fluorescent protein; GFP) – został odkryty na początku lat sześćdziesiątych (1962) w organizmie meduzy *Aequorea victoria*, żyjącej w północno-zachodniej części Pacyfiku. Kodujący to białko gen sklonowano w 1994 roku w komórkach *E. coli*. Wykazano, że ulega on ekspresji i produkuje białko zielonej fluorescencji – GFP o masie ok. 27 kDa, i posiada strukturę β-baryłki. Białko będące produktem ekspresji genu *gfp* (GFP) w żywej komórce pod wpływem wzbudzenia światłem UV emituje zieloną fluorescencję, widoczną nawet nieuzbrojonym okiem. Za odkrycie białka zielonej fluorescencji M. Chalfie, O. Shimomura i R. Tsien otrzymali nagrodę Nobla w roku 2008. *In vivo* fluorescencja zachodzi na drodze dostarczenia energii przez fotoproteinę aktywowaną jonami wapnia, ale w warunkach laboratoryjnych w celu indukcji świecenia stosuje się światło UV. W przypadku genu *gfp* jako biomarkera nie ma potrzeby używania dodatkowych kofaktorów aby wykryć jego ekspresję. Jedynym czynnikiem wpływającym na aktywność kodowanego przez niego białka jest obecność tlenu cząsteczkowego. GFP jest białkiem zbudowanym z 238 aminokwasów, otaczających centralną część białka zwaną chromoforem lub fluoroforem i odpowiedzialną za emisję fluorescencji. Chromofor jest formowany w procesie cyklizacji i oksydacji trzech aminokwasów seryny, dehydrotyrozyny oraz glicyny w pozycji 65-67 (rys. 1).



Rysunek 1. Schemat formowania się chromoforu



Rysunek 2. Przestrzenna struktura białka GFP (struktury – od najciemniejszej tonacji: α -helisy, chromofor, β -kartki)

Mechanizm tworzenia chromoforu nie jest jeszcze dobrze poznany. Podstawienie centralnej tyrozyny w pozycji 66 powoduje zmianę spektrum wzbudzenia i emisji w kierunku krótszych długości fal i powstanie rodziny białek GFP zwanych z ang. „blue shifted”. Mutacje w obrębie innych aminokwasów prowadzą do powstania „cyan” – „red” – i „yellow – shifted” wariantów białka o zmienionych spektrach wzbudzenia i emisji. I tak, w wyniku mutacji regionu chromoforowego białka utworzono wiele izoform GFP, charakteryzujących się zmienionym spektrum wzbudzenia i emisji w stosunku do dzikiej formy białka GFP (Campbell i in., 2002). Znanych jest około

50 zmutowanych form genu *gfp*. Uzyskane drogą podstawienia aminokwasów mutanty różnią się między sobą: termostabilnością, czasem dojrzewania białka GFP, natężeniem sygnału który wytwarzają, długością fali przy której następuje ich maksymalne wzbudzenie (Larrinzar i in., 2005).

Obecnie mamy między innymi także białka emitujące światło o długości odpowiadającej żółci i czerwieni. Ich źródłem są geny, które zostały wielokrotnie zmienione na drodze mutagenezy specyficznej co do miejsca. Jeżeli przy GFP jest dopisane „mut” to jest to białko nowej generacji.

Gen białka GFP wykryto również w *Renilla*. Istnieje zasadnicza różnica w powstawaniu sygnału świetlnego u *Aequorea victoria* i *Renilla*.

W centralnej części parasola meduzy *Aequorea victoria* w specyficznych komórkach zwanych fotocytami syntetyzowana jest wiążąca jony wapnia Ca^{2+} fotoproteina zwana aequoryną. Składa się ona z apo-aequoryny o masie 22 kDa oraz z lucyferyny zwanej koelenterazyną o masie 423 Da. Związanie jonów Ca^{2+} z aequoryną prowadzi do oksydacji koelenterazyny do koelenteramidu z udziałem lucyferazy i emisji *in vitro* niebieskiego światła. Kompleks Ca_3 -aequoryna-koelenteramid zwany jest białkiem świecącym na niebiesko w skrócie BFP (ang. Blue Fluorescent Protein). Jednakże emitowane przez białko światło jest światłem o kolorze zielonym, ponieważ dochodzi do transferu energii ze znajdującego się w stanie wzbudzenia białka BFP na białko GFP, które ulega pobudzeniu i emituje fluorescencję.

W *Renilla* nie ma skupionych wokół „dzwona” meduzy fotocytów, lecz jest ona meduzą kolonijną i składa się z setek polipów, z których każdy emituje fluorescencję. Funkcja tego zjawiska nie jest dokładnie zbadana, wiadomo że meduzy świecą po mechanicznej stymulacji np. nagłym poruszeniu wody. Ponadto u *Renilla* sygnał fluorescencyjny jest kontrolowany przez białko wiążące lucyferynę – LBP (ang. Luciferin-Binding Protein). Tylko wcześniejsze związanie LBP z jonami wapnia zezwala na oksydację z udziałem lucyferazy koelenterazyny i transfer energii ze wzbudzonego kompleksu: lucyferaza, jony wapnia i koelenteramid na GFP i w następstwie fluorescencja tego białka w kolorze zielonym *in vivo*.

W obu przypadkach czynnikiem niezbędnym do aktywacji fluorescencji są jony wapnia, bez których szlaki bioluminescencji są zablokowane. *In vivo* zarówno białko GFP u *Aequorea* jak i białko GFP u *Renilla* mają identyczne spektrum emisji zielonego światła – $\lambda_{max} = 509$ nm, natomiast *in vitro* oba spektra emisji niebieskiego światła są różne dla *Aequorea* – $\lambda_{max} = 469$ nm a dla *Renilla* – $\lambda_{max} = 480$ nm. Fluorescencyjne systemy w *Aequorea* i *Renilla* są wspaniałym przykładem różnorodności biochemicznych szlaków produkcji światła, które ostatecznie prowadzą do powstania identycznego zjawiska – zielonego świecenia.

4. Cechy genu *gfp* i białka GFP

Najważniejsze cechy genu *gfp* i białka GFP są następujące:

- gen *gfp* jest markerem, który nie wymaga stosowania dodatkowych, często kosztownych substratów aby wykryć jego ekspresję,
- fluorescencja będąca wynikiem kształtowania chromoforu powstaje niezależnie od stanu energetycznego komórki bakteryjnej (jej zasobności w molekuły ATP – adenosynotryfosforanu – jako głównego nośnika energii w komórce), co przyczyniło się do jego aplikacji jako markera w ekstremalnych warunkach np. głodu. Jedynym ograniczeniem jest dostępność tlenu, gdyż w warunkach deficytu tlenowego nie obserwuje się fluorescencji,
- białko GFP jest kodowane przez jeden gen, co znacznie ułatwia wszelkie manipulacje związane z tworzeniem wektorów wraz z całym systemem regulacji, którym podlega *gfp*,
- niewielkie rozmiary białka pozwalają na jego dyfuzję nawet w bardzo małych komórkach lub obszarach komórek, gdzie dyfuzja białka o znacznie większej masie byłaby ze względu na ekstremalnie ograniczone przestrzenie wnętrza komórek niemożliwa,
- białko GFP o wielkości 26.9 kDa znacznie ułatwia jego wykorzystanie w małych komórkach (np. bakterie czy komórki nerwowe tj. neurony i w ich długich wypustkach osiowych – aksonach lub w ich wypustkach protoplazmatycznych – dendrytach,
- brak toksyczności białka GFP względem żywych komórek (nawet gdy stanowi ono 70% całkowitej puli białek w komórce), pozwala na ich przyżyciowe monitorowanie,
- powszechna dostępność w bazach danych „ulepszonych” wariantów białka GFP charakteryzujących się emisją silnego sygnału i niezwykle stabilnością w żywych komórkach,
- białko GFP jest odporne na fotowysbielanie (ang. photobleaching) pod wpływem promieni UV, pozwala to na dłuższe monitorowanie komórek (bakteryjnych czy eukariotycznych) bez utraty intensywności wysyłanego sygnału,
- możliwość stosowania genu *gfp* w zróżnicowanych ewolucyjnie organizmach (w komórkach bakterii, czy w komórkach ssaków),
- białko GFP w neutralnych buforach wykazuje fluorescencyjną aktywność nawet w temperaturze 65⁰C oraz w zakresie pH od 5 do 12,
- możliwość zastosowania nawet nieskomplikowanych urządzeń do wykrycia fluorescencji (np. lampa UV, mikroskop fluorescencyjny) w celu wykrycia produktu ekspresji genu *gfp* – białka GFP.

5. Wykorzystanie białka genu *gfp* w badaniu bakterii patogennych

Białko GFP ma bardzo szerokie zastosowanie w badaniu bakterii patogennych:

- do badania poziomu siły (aktywności) promotorów *in vivo*, jak i do poszukiwania nowych, bardziej wydajnych promotorów, stosując do tego celu nie tylko linie komórkowe ale i modele zwierzęce,
- do monitorowania drogi bakterii patogennych na modelu zwierzęcym i w komórkach eukariotycznych – należy sklonować gen *gfp* (lub gen *lux*) pod kontrolą silnego promotora i wprowadzić do komórek badanego przez nas gatunku czy szczepu na drodze transformacji, a następnie przy zastosowaniu odpowiednich urządzeń monitorować losy patogenu,
- do badania przedziałów komórkowych komórek eukariotycznych gdzie znajduje się patogen. Czyli z użyciem odpowiednich wektorów można lokalizować bakterie po zakażeniu zwierzęcia czy po infekcji komórek eukariotycznych,
- do badania analizy i lokalizacji białek patogenu – białek efektorowych (fuzje translacyjne, czyli podłączenie GFP do badanego białka) w komórkach eukariotycznych (np. w *Salmonella* – białka te zlokalizowano blisko cytoszkieletu komórek eukariotycznych),
- do analizy czasu ekspresji genów wirulencji,
- do badania sekwencyjnej ekspresji genów wirulencji.

6. Wykorzystanie genów reporterowych

- Ustalanie regionów promotorów odpowiedzialnych za regulację genów – tworzenie fuzji fragmentów potencjalnego promotora z genem reporterowym, przeprowadzenie transfekcji komórek, a następnie oszacowanie aktywności promotora na podstawie oznaczania aktywności białka kodowanego przez gen reporterowy.
- W analogiczny sposób można przeprowadzić analizę czasowej i/lub przestrzennej aktywności badanych promotorów w komórkach i tkankach. Przykładem może być wykorzystanie genu *cat* jako reportera w badaniu sekwencji promotora ludzkiego genu *hSUV3* kodującego mitochondrialną helikazę DNA i RNA. W celu określenia, który fragment DNA powyżej pierwszego ATG *hSUV3* ma aktywność promotora oraz w celu ustalenia, które obszary promotora są odpowiedzialne za regulację ekspresji genu, tworzy się fuzje odcinków DNA o różnej długości z końca 5' *hSUV3* (np. sekwencje delecyjne) z genem reporterowym *cat* w plazmidzie (plazmid koduje acetylotransferazę chloramfenikolu – CAT, pochodzącą z *E. coli* pod kontrolą silnego promotora wirusowego – CMV). Promotor CMV zastępowano różnej długości fragmentami sekwencji powyżej pierwszego ATG otwartej ramki odczytu genu *hSuv3* (Minczuk, 2003).

- Analiza aktywności (siły) promotorów – stosunkowo proste jest zastosowanie genów reporterowych do badania siły konkretnych promotorów. Przy pomocy enzymów restrykcyjnych czy PCR tworzy się fuzję transkrypcyjną – łączenie genu reporterowego z fragmentem DNA potencjalnie zawierającym promotor, który chcemy badać. Gen reporterowy nie posiada promotora, ma sekwencje startu translacji i wiązania się z rybosomami. Mierzac poziom produktu genu reporterowego, np. β -galaktozydazy, możemy określić siłę promotora czy jego zależność od konkretnych czynników środowiska.
- Badanie wpływu jonów metali – gen reporterowy łączy się z promotorem, którego aktywność regulowana jest stężeniem metalu. Ekspresja genu zależy od stężenia jonów tego metalu, a eksperymenty tego typu z różnymi metalami są wykonywane dosyć często. W organizmie ludzkim stężenie np. żelaza jest zwykle dużo niższe niż konieczne do podtrzymania życia czy namnażania się bakterii patogennych. Niskie stężenie żelaza jest bardzo często czynnikiem indukującym ekspresję wielu genów wirulencji. Po przeprowadzeniu mutagenyzy promotora i transfekcji komórek poszukuje się klonów, w których zaszła transpozycja, gdzie gen reporterowy połączył się z promotorem, którego aktywność regulowana jest właśnie stężeniem żelaza. Przesiew kolonii na podłożu o wysokim i niskim stężeniu żelaza pozwala wyszukać kolonie, w której promotor jest nieaktywny na podłożu o wysokim stężeniu żelaza, a aktywny na podłożu o niskim stężeniu żelaza. W ten sposób znajdujemy promotor, którego aktywność jest warunkowana stężeniem jonów żelaza.
- Wykorzystanie genu *lacZ* jako reportera w drożdżowym systemie dwuhybrydowym – w tym systemie wykrywa się interakcję między makrocząsteczkami – białkami, poprzez ekspresję dwóch potencjalnie oddziaływujących cząsteczek w tej samej komórce drożdżowej i aktywację przez powstały kompleks białkowy ekspresji genu reporterowego (do jednego z białek dołączona jest domena wiążąca się do DNA, drugie białko jest syntetyzowane w fuzji z domeną aktywującą transkrypcję). Obecność białka reporterowego β -gal wykrywa się poprzez niebieskie zabarwienie komórek drożdży w obecności X-gal.
- Ustalanie wewnątrzkomórkowej lokalizacji białek. Stosując metody inżynierii genetycznej gen białka *gfp* można dołączyć właściwie do każdego innego genu białka strukturalnego lub utworzyć fuzję cDNA kodującego badane białko z genem białka zielonej fluorescencji lub jego wariantem. Taki konstrukt wprowadza się następnie do komórki i obserwuje lokalizację białka w komórce, jego aktywność wywołaną czynnikami środowiskowymi (np. zmianą pH, stężeniami niektórych jonów), drogi metaboliczne białka kodowanego przez gen reporterowy np. poprzez analizę mikroskopową lub zmiany konformacyjne w strukturach komórkowych. Należy podkreślić, że fuzja GFP z innym białkiem nie zmienia jego właściwości luminescencji. Uzyskano ulepszone białka, które miałyby jak najkorzystniejsze cechy wykorzystywane w pracach badawczych, np. brak zmienności w zależności od temperatury, krótki czas pobudzenia. Otrzymano siedem klas rodzin białek fluorescencyjnych stanowiących

nieocenione narzędzie w molekularnej biologii komórkowej – umożliwia ono badanie układów żywych, ale również białek ulegających w nich ekspresji (Matejczyk i Rosochacki, 2007).

- Wykorzystanie genów reporterowych w transgenezie przyczyniło się do znacznego postępu w badaniach nad ich wykorzystaniem, szczególnie u zwierząt, a badania te zostały zapoczątkowane w roku 1985 w pracowniach amerykańskich i niemieckich (Hammer i in., 1985; Brem, 1992). Prace związane z wykorzystaniem genów reporterowych w rozwiązywaniu niektórych problemów związanych z transgenezą zwierząt prowadzono od początku badań nad tym genem. Gen kodujący białko GFP można przenieść do dowolnego organizmu i połączyć go z innym genem, czyli stosować go jako gen reporterowy w inżynierii genetycznej. Pierwszym otrzymanym zwierzęciem z tym genem był nicienie *Cenorhabditis elegans*. Później pojawiły się świecące ryby, myszy, koty, króliki, psy, a nawet świnię (Zhang i in., 2004), a w Polsce badaniami tymi objęto między innymi ryby, króliki i bydło (Kozikowa i in., 1998; Rosochacki i in., 2001, 2002). Chociaż transgeniczne myszy stały się podstawowym narzędziem do badań nad regulacją ekspresji genów w całym jak i w nienaruszonym organizmie zwierzęcym, to transgeniczne zwierzęta gospodarskie stały się równie chętnie stosowanym obiektem w tych badaniach, a to ze względu na łatwość pozyskiwania oocytów czy zarodków. Geny reporterowe wykorzystano do określania mozaicyzmu transgenicznego czy zastosowania ich przy selekcji tylko transgenicznych zdrowych zarodków przed ich transplantacją do biorczyń (śledzenie rozwoju embrionów). Utrzymanie wielu biorczyń i dawczyń (szczególnie bydła) bardzo podrażało koszty transgenezy. Zarodki z dodatkowym genem reporterowym pozwalają na bardzo wczesne stwierdzenie obecności transgenu połączonego z genem strukturalnym, np. genem hormonu wzrostu, co pozwala na transplantację tylko pozytywnych w stosunku do genu reporterowego – transgenicznych – zarodków do biorczyń. Geny te umożliwiają również wprowadzenie złożonych konstruktów do zarodków.
- Gen reporterowy jest podłączony do genu strukturalnego kodującego produkcję cennego farmaceutyku i jest promotorem kierującym tę produkcję do odpowiedniego przedziału tkankowego, np. gruczołu mlekowego, pęcherza moczowego, krwi. Ponadto geny te są cennym modelem doświadczalnym w badaniach nad mechanizmami powstawania chorób takich jak arterioskleroza, choroba Alzheimera, dystrofia mięśni i inne.
- Przy pomocy białka fluoryzującego na zielono można znakować, identyfikować i śledzić białka w komórkach. Białko GFP pozwala śledzić rozwój komórek nerwowych (nawet w ich bardzo cienkich wypustkach) w mózgu oraz obserwować przerzuty komórek nowotworowych. Wykorzystuje się je także do obserwacji procesów tworzenia się komórek podczas regeneracji narządów oraz tworzenia się tkanek z pojedynczych komórek. Możliwe jest też monitorowanie szlaków sygnałowych, badania toksyczności niektórych składników komórkowych (białkowych), badania cyklu życiowego komórek, badania

z zakresu morfologii komórkowej – tworzenia mikrojąder, badania RNAi, migracji komórek, ich różnicowania i procesu apoptozy.

7. Etyczne aspekty stosowania genów reporterowych i biotechnologii

Historia biotechnologii sięga czasów starożytnego Egiptu czy państwa Sumerów. Ta klasyczna „biotechnologia” dopiero w ostatnich dziesięcioleciach została bardzo mocno udoskonalona dzięki rozwojowi takich dziedzin nauki jak inżynieria genetyczna, biologia molekularna, embriologia czy hodowla kultur tkankowych. Dzięki temu stało się możliwe przenoszenie genów między różnymi gatunkami, albo usuwanie niektórych sekwencji genowych z genomu danego osobnika. Te bardzo precyzyjne manipulacje z wprowadzaniem/usuwaniem fragmentu DNA nie muszą prowadzić do powstawania charakterystycznych cech genotypowych jednego organizmu w drugim. Wszystkie manipulacje genetyczne są bardzo precyzyjnie oszacowane przed ich szerszym zastosowaniem (np. w produkcji leków) tak, aby nie miały wpływu na dobrostan organizmu. Technologie powszechnie używane to transgeneza, manipulacje na embrionach (klonowanie, tworzenie chimer) czy podawanie innym organizmom substancji otrzymanych w rezultacie stosowania technik biotechnologicznych. Przy ocenie możliwości stosowania tych technik należy uwzględnić czynniki etyczne. W odniesieniu do ludzkiej etyki opieramy się na czterech zasadach: dobroczynności, nieszkodliwości, sprawiedliwości i autonomiczności (Beauchamps i Childress, 1983). W odniesieniu do zwierząt autonomiczność jest zastąpiona integralnością zwierzęcia (Willigenburg, 1993).

Potencjalne zagrożenia dotyczą naruszania różnorodności biologicznej (zasoby genetyczne, organizmy i ich części, populacje i jakiegokolwiek inne żywe elementy ekosystemu). Wśród tych zagrożeń mogą być: naturalna eksploatacja zasobów genowych, wprowadzanie do środowiska GMO i wynikające z tego relacje z innymi organizmami (np. chorobotwórczy wpływ GMO na organizmy i niemożność leczenia lub prowadzenia profilaktyki, niepożądane efekty na środowisko i rozprzestrzenianie się nowego materiału genetycznego na inne organizmy), czy stosowanie niebezpiecznych lub niecałkowicie sprawdzonych technologii. Rzetelna ocena zagrożeń jest podstawowym prawem każdego podmiotu do wglądu do informacji potrzebnych do ustalenia zakresu odpowiedzialności.

Bibliografia

- Beauchamps, T.L., Childress, J.S. (1983), *Principles of biomedical ethics*. Oxford University Press, New York.
- Brem, G. (1992), *Transgenic Animals*. W: H.J Rehm, G. Reed, A. Pychler, P. Stadler (red) *Biotechnology* (s. 746-832). Weinheim: VCH-Verlage.

- Campbell, R.E., Tour, O., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A., Tsien, R.Y. (2002), A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(12): 7877-7882.
- Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E., Wall, R.J., Bolt, D.J., Ebert, K.M., Palmiter, R.D., Brinster, R.L. (1985), Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*. 315: 413-416.
- Kozikova L., Rosochacki S.J., Zwierzchowski L., Terlecki V.P. (1998), Ekspresja reporternowo gena *lacZ* w embrionach krolikow. *Biuletyn Wsierosyjskowo Nauczno-Issledowatielskowo Instituta Genetiki i Razwiedienia Sielskochozjastwiennych Żiwotnych*. 145: 31-34.
- Larrainzar, E., O'Gara, F., Morrissey, J.P. (2005), Applications of autofluorescent proteins for in situ studies in microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* 59: 257-277.
- Matejczyk, M., Rosochacki, S.J. (2007), Gen *gfp* jako fluorescencyjne narzędzie w analizie ekspresji genów i konstrukcji biosensorów. *Biotechnologia*. 76: 53-62.
- Rosochacki, S.J. (1995), Molecular biology techniques involved in transgenic Animals production. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 13: 143-156.
- Minczuk, M. (2003), *Analiza ludzkiego jądrowego genu hSUV3, kodującego mitochondrialną helikazę DNA i RNA*. Rozprawa doktorska, Zakład Genetyki Uniwersytetu Warszawskiego.
- Rosochacki S.J., Duszewska A., Kozikova L., Olszewski R. (2001), Expression of GFP in microinjected bovine embryos. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 19: 193-202.
- Rosochacki S.J., Strzelecka M., Kozikova L., Matejczyk M., Obłap R., Połozynowicz J., Zwierzchowski L. (2002), Expression of microinjected reporter gene *lacZ* during first cleavages of rabbit embryos. *Folia Biologica (Kraków)*. 50: 61-67.
- Willigenburg, T. (1993), *Ethiek in praktijk. Centrum voor Bioethiek en gezondheidstrecht*. Van Gorcum&Comp B.V., Assen (English summary).
- Zhang, S., Ma, C., Chalfie, M. (2004), Combinatorial marking of cells and organelles with reconstituted fluorescent proteins. *Cell*. 119(1): 137-144.

Abstract

Reporter Genes in Genetic Research

Reporter genes are very important molecular markers in genetic engineering and molecular biology. They can be introduced to the cell by different methods (eg. injection). Reporter gene technology is a valuable tool for study of some processes in the cell, signal transduction, gene expression, horizontal gene transfer, gene activity in plant and animal tissues, biosensor construction. To this reporter gene family belong such markers as: β -galactosidase (*LacZ*), β -lactamase (*bla*), β -glucuronidase (*gusA*), luciferases (*lux* and *luc*), phosphatase (*phoA*), chloramphenicol transacylase (*cat*), monooxygenase (*tdf*) and genes resistant to

antibiotics and heavy metals. There are also genes coding autofluorescent proteins – *gfp* gene coding green fluorescent protein – GFP. *Gfp* gene originates from medusa *Aequora victoria*. Reporter genes can be used to investigate the main problems in molecular biology: analysis of the promoter regions connected with the gene regulation, activities of promoters, localization of intracellular proteins, constructing the fusion of reporter gene with cDNA coding some others proteins. The application of these genes in animal biotechnology allows us to use them for scientific and practical purposes and to use them in experimental animal models in the field of gene regulation and gene expression *in vivo*.

Nota o autorach

Stanisław Józef Rosochacki, prof. dr hab., kierownik Zakładu Biologii Sanitarnej i Biotechnologii Wydziału Budownictwa i Inżynierii Środowiska w Politechnice Białostockiej. Ukończył studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego (1970), a stopień doktora nauk rolniczych uzyskał w 1975 r. w Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu, zaś doktora honoris causa nauk rolniczych w zakresie zootechniki – fizjologii, żywienia i biochemii na Wydziale Zootechnicznym Akademii Rolniczej im. Hugona Kołłątaja w Krakowie (1993). Specjalność naukowa to genetyka molekularna zwierząt, biotechnologia zwierząt, transgeneza, przemiana białka, integracja genów reporterowych (*lacZ*, *gfp*) do zarodków królików i bydła i następnego ich klonowania aż do uzyskania transgenicznych zwierząt, co przyczyni się do obniżenia kosztów produkcji transgenicznych (nie mozaikowych) zwierząt.

Marzena Matejczyk, dr, adiunkt w Zakładzie Biologii Sanitarnej i Biotechnologii Wydziału Budownictwa i Inżynierii Środowiska w Politechnice Białostockiej. Ukończyła studia na Wydziale Biologii Uniwersytetu w Białymstoku, a także obroniła tam doktorat. W badaniach zajmuje się procesami mikrobiologicznymi zachodzącymi podczas skażenia mikrobiologicznego środowiska wodnego, glebowego oraz powietrza przy zastosowaniu genów reporterowych (*lacZ* lub *gfp*). Badania te pozwoliły na szybką i taną ocenę badanych prób gleby w zależności od stopnia zanieczyszczenia związkami aromatycznymi, co w przyszłości może zaowocować praktycznym wykorzystaniem tego rodzaju szczepów bakteryjnych w monitorowaniu zanieczyszczeń w środowisku.