

SZYMON POREBSKI, AGNIESZKA GRZELAK

Katedra Biofizyki Molekularnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
E-mail: szymon.adam.benedykt.porebski@tutanota.com

KLUCZ DO BADANIA PROCESÓW KOMÓRKOWYCH – BIAŁKA REPORTEROWE

WSTĘP

Białka reporterowe są podstawowym narzędziem w biologii molekularnej i komórkowej. Rozwój inżynierii genetycznej w latach 80. i 90. ubiegłego wieku zaowocował opracowaniem podstawowych systemów reporterowych takich jak (BUCHOWICZ 2012): *uidA* (cDNA – JEFFERSON i współaut. 1986), *lacZ* (cDNA – MATSUMOTO i współaut. 1988), *luc* (cDNA – OW i współaut. 1986), *gfp* (cDNA – PRASHER i współaut. 1992). Podkreśleniem znaczącej roli białek reporterowych w rozwoju nauk biologicznych było uhonorowanie w 2008 r. Nagrodą Nobla z chemii Osamu Shimomury za odkrycie białka zielonej fluorescencji i jego charakterystykę.

Białko reporterowe definiujemy jako białko kodowane przez gen reporterowy poprzedzony właściwym promotorem. Natomiast gen reporterowy to gen umożliwiający identyfikację transformantów oraz wykrywanie obecności fuzyjnego produktu jego ekspresji w strukturach subkomórkowych (HARWOOD i WIPAT 2011).

Promotory genów reporterowych możemy podzielić na indukowane (ekspresja tylko w określonych etapach doświadczenia) i konstytutywne (stała ekspresja umożliwiająca lokalizację transformowanych komórek). Wzajemne ułożenie genu reporterowego i badanej sekwencji nukleotydowej pozwala na wyznaczenie dwóch strategii doświadczalnych, z których każda prowadzi do odmiennego funkcjonowania transkryptu. Pierwsza z nich polega na wprowadzeniu genu reporterowego poniżej promotora odpowiedzialnego za transkrypcję docelowego genu. Daje

to informacje o aktywności sekwencji kontrolnych i promotora. Druga strategia polega na zastosowaniu białka fuzyjnego. Powstanie białka hybrydowego wynika z implementacji obu genów w identycznej ramce odczytu. Czynnikiem decydującym o sukcesie tej strategii jest długość sekwencji łącznikowej i koniec, do którego dołączone jest białko reporterowe (koniec N bądź C). Lokalizacja względem siebie promotora, genu reporterowego i docelowego wpływa na informację jaką daje nam ich ekspresja, a także jej efektywność. Niezależnie od ułożenia promotora powinien on ulegać łatwiej ekspresji w komórkach. Często białko reporterowe do prawidłowego działania w komórce wymaga procesów potranskrypcyjnych lub potranslacyjnych (wyjątkiem jest tu GFP).

Alternatywnie, białka reporterowe mogą być stosowane w formie oczyszczonej, bez potrzeby transformacji genetycznej, np. dodawana w formie osobnego odczynnika lucyferaza izolowana z *Photinus pyralis* (SELAN i współaut. 1992), niemniej każde białko reporterowe powinno charakteryzować się następującymi cechami (ROSOCHACKI i MATEJCZYK 2013):

- brak w nietransformowanym modelu badawczym;
- łatwość i czułość detekcji;
- brak zakłóceń metabolicznych;
- stosunkowa niestabilność reportera (chroniąca przed skutkami nadmiaru reportera);
- brak skutków letalnych w badanym modelu.

Ważnym aspektem stosowania białek reporterowych jest możliwość ich pomiaru za

pomocą powszechnie znanych technik analizy instrumentalnej (tj. absorbcjometria, fluorymetria, luminometria).

FLUORESCENCYJNE BIAŁKA REPORTEROWE

Rodzina białek wywodzących się od białka zielonej fluorescencji (ang. green fluorescence protein, GFP) stanowi arsenał narzędzi biologii molekularnej. Izolacja oryginalnego GFP z północnopacyficznej meduzy *Aequorea victoria* w 1962 r. jest zasługą zespołu Shimomury. Zbudowane jest ono z 238 aminokwasów o łącznej masie 26,9 kDa. Struktura białka ma wymiary 4,2 nm na 2,4 nm (ORMÖ i współaut. 1996) i jest walcowata. Niewielkie rozmiary białka umożliwiają jego gromadzenie się w bardzo małych strukturach komórkowych, np. wypustkach osiowych transfekowanych komórek neuronalnych (PAN i współaut. 2011). Na III-rzędową konformację GFP składa się β -baryłka, zbudowana z 11 β -wstążek. Wewnątrz β -baryłki znajduje się triplet aminokwasów seryny, tyrozyny i glicyny w pozycjach od 65 do 67, które w trakcie formowania struktury trzeciorzędowej ulegają autokatalitycznej cykli-

zacji tworząc chromofor (KUMAR i PAL 2016). Maksimum absorpcji dla białka typu dzikiego wynosi 395 nm, a emisji 508 nm. Białka fluorescencyjne ulegające ekspresji i fałdowaniu w komórkach są nietoksyczne dla komórek, nie prowadzą do apoptozy oraz nie modyfikują szlaków enzymatycznych (ZIMMER 2002).

Podstawowa charakterystyka białek fluorescencyjnych opiera się na określeniu ich wydajności kwantowej (ang. quantum yield, QY) i współczynnika absorpcji (ang. extinction coefficient, EC). Wydajność kwantowa określa stosunek fotonów emitowanych do zaabsorbowanych. Współczynnik absorpcji ustala ilościowe pochłanianie przez białko promieniowania elektromagnetycznego. Oba te parametry definiują ilościowo potocznie rozumianą „jasność” białka reporterowego. Jasność białek jest zróżnicowana w zależności od przynależności do grupy kolorystycznej. Wysoka jasność charakteryzuje grupy białek zielonych, żółtych i pomarańczowych, natomiast pozostałe grupy białek fluorescencyjnych uznawane są za te o niskiej jasności (Tabela 1) (SHANER i współaut. 2005).

Białka reporterowe podlegają reakcjom przyczyniającym się do fotobłaknięcia zależ-

Tabela 1. Porównanie powszechnie stosowanych białek fluorescencyjnych.

Znakiem * oznaczono białka monomeryczne sporadycznie występujące jako słabe dimery. Przez pseudomonomer rozumie się białka stosowane w formie fuzyjnej złożonej z dwóch monomerów w jednej ramce odczytu. Takie białko funkcjonuje jak monomer, lecz posiada podwojone parametry, takie jak masa cząsteczkowa czy zajmowana przestrzeń (w kontekście tworzonej zawady przestrzennej). Względną jasność porównaną względem EGFP (wg CAMPBELL i DAVIDSON 2010).

Nazwa komercyjna białka fluorescencyjnego	Ekstynkcja (nm)	Emisja (nm)	Współczynnik absorpcji ($\cdot 10^{-3} \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$)	Wydajność kwantowa	Struktura czwartorzędowa	Względna jasność (% GFP)
Białka z zakresu emisji 450-470 nm						
EBFP2	383	448	32,0	0,56	Monomer*	53
Azurite	384	450	26,2	0,55	Monomer*	43
mTagBFP	399	456	52,0	0,63	Monomer	98
Białka z zakresu emisji 470-490 nm						
mCerulean	433	475	43,0	0,62	Monomer*	79
CyPet	435	477	35,0	0,51	Monomer*	53
TagCFP	458	480	37,0	0,57	Monomer	63
Białka z zakresu emisji 490-510 nm						
mTFP1	462	492	64,0	0,85	Monomer	162
EGFP	488	507	56,0	0,60	Monomer*	100
mWasabi	493	509	70,0	0,80	Monomer	167
Białka z zakresu emisji 510-530 nm						
Superfolder avGFP	485	510	83,3	0,65	Monomer*	160
Topaz	514	527	94,5	0,60	Monomer*	169
Citrine	516	529	77,0	0,76	Monomer	174

Białka z zakresu emisji 530-550 nm						
YPet	517	530	104,0	0,77	Monomer*	238
ZsYellow	529	539	20,2	0,42	Tetramer	25
mPapaya1	530	541	43,0	0,83	Monomer	106
Białka z zakresu emisji 550-570 nm						
mOrange	548	562	71,0	0,69	Monomer	146
mOrange2	549	565	58,0	0,60	Monomer	104
Kusabira Orange2	551	565	63,8	0,62	Monomer	118
Białka z zakresu emisji 570-590 nm						
dTomato	554	581	69,0	0,69	Dimer	142
dTomato-Tandem	554	581	138,0	0,69	Pseudomonomer	283
DsRed	558	583	75,0	0,79	Tetramer	176
Białka z zakresu emisji 590-610 nm						
mApple	568	592	75,0	0,49	Monomer	109
mStrawberry	574	596	90,0	0,29	Monomer	78
mRuby	558	605	112,0	0,35	Monomer	117
Białka z zakresu emisji 610-630 nm						
mCherry	587	610	72,0	0,22	Monomer	47
JRed	584	610	44,0	0,20	Dimer	26
mRaspberry	598	625	86,0	0,15	Monomer	38
Białka z zakresu emisji 630-650 nm						
mKate	588	635	45,0	0,33	Monomer	44
HcRed-Tandem	590	637	160,0	0,04	Pseudomonomer	19
mPlum	590	649	41,0	0,10	Monomer	12

nego od ich fotostabilności. Wśród nich wyróżnia się reakcje białek fluorescencyjnych z reaktywnymi formami tlenu (RFT) oraz izomeryzację fotoindukowalną (HENDERSON i współaut. 2007). Mechanizm fotobłaknięcia polega na ataku na podwójne wiązania chromoforu białka, czego konsekwencją jest fotostabilność porównywalna z klasycznymi barwnikami fluorescencyjnymi (SAPSFORD i współaut. 2006). Badania prowadzone w celu zwiększenia odporności białek reporterowych pozwoliły otrzymać warianty odporne na takie czynniki jak: podwyższone temperatury (do 65°C), alkaliczne pH, detergenty, sole chaotropowe, związki organiczne i liczne proteazy (EHRMANN i współaut. 2001).

Warianty białek fluorescencyjnych charakteryzują się zróżnicowaniem pod względem wydajności fałdowania i dojrzewania. Sam proces dojrzewania definiuje się jako zmiany prowadzące do powstania funkcjonalnego chromoforu, w którym ważną rolę odgrywa temperatura. Dzikie GFP z *Aequorea victoria* (avGFP), poprzez presję ewolucyjną, posiada optimum temperaturowe wynoszące 4-5°C, co ogranicza zastosowanie go np. w liniach komórkowych ssaków, aczkolwiek możliwe jest wykorzystanie białek fluorescencyjnych pochodzących z koralowców

lub morskich ukwiałów żyjących w ciepłych wodach oceanicznych, posiadających lepsze parametry fałdowania w wyższych temperaturach (SALIH i współaut. 2000). Próby „ulepszania” avGFP zaowocowały powstaniem takich wariantów jak np. superfolder avGFP cechującego się wydajnym fałdowaniem struktury III-rzędowej, odpornością na związki denaturujące i cykliczne zmiany temperatury (PEDELACQ i współaut. 2006). Zmiany w strukturze avGFP nie są obojętne dla absorbowanego i emitowanego spektrum światła. Przykładem tego są wydajnie fałdujące się mutanty Venus YFP o wysokiej jasności (NAGAI i współaut. 2002). Poza temperaturą, kluczową rolę w dojrzewaniu chromoforu odgrywa dostęp do tlenu cząsteczkowego. Pochodne avGFP potrzebują minimum jednej cząsteczki tlenu dla reakcji utleniania (WACHTER 2007), natomiast pochodne fluorescencyjnych białek koralowców (w szczególności białka pomarańczowej i czerwonej fluorescencji) wymagają dostarczenia minimum dwóch cząsteczek tlenu (GROSS i współaut. 2000). Tlen jest więc czynnikiem limitującym zastosowanie GFP w warunkach beztlenowych.

Niewątpliwą zaletą białek fluorescencyjnych jest duża różnorodność tej grupy pod

względem długości fali emitowanego światła. Fizyczne rozszerzenie koniugacji orbitalu π w obrębie chromoforu jest procesem odpowiedzialnym za emisję światła przez białko. Zjawisko to odpowiada za przesunięcie maksimum absorpcji i emisji nawet o kilkaset nanometrów. Za przesunięcia o wartości od 20 do 40 nm, odpowiedzialne są niewielkie zmiany w obrębie bliskiego środowiska chromoforu, do których należą (REMINGTON 2006): konformacja wiązań wodorowych, pozycja naładowanych reszt aminokwasów oraz oddziaływania hydrofobowych aminokwasów z chromoforem. W najpowszechniejszej klasyfikacji białek fluorescencyjnych wyróżnia się dziesięć klas barwnych. Klasy te są oddalone od siebie o około 20 nm w zakresie od 450 nm do 650 nm:

Projektowanie nowych białek fluorescencyjnych opiera się o dwie różne strategie. Pierwsza łączy wiedzę z zakresu inżynierii genetycznej i chemii organicznej. Ma ona na celu analizę obecnych w bazach danych sekwencji form dzikich białek i wprowadzeniu celowych zmian w genie wyjściowego białka fluorescencyjnego. Owoce takiej strategii jest np. sekwencja białka BFP (ang. blue fluorescent protein) i CFP (ang. cyan fluorescent protein) opierającego się na avGFP (HEIM i współaut. 1994). Ta taktyka nie jest jednak pozbawiona wad. Wymaga wyłożonej pracy teoretycznej zespołu badawczego oraz w większości przypadków nowe białka są o wiele „ciemniejsze” od ich form dzikich. Wymusza to wprowadzanie kolejnych mutacji kompensujących niewystarczającą wydajność kwantową, jak to miało miejsce przy opracowywaniu białka DsRed (SHANER i współaut. 2004).

Druga z taktyk polega na naśladowaniu procesu ewolucji poprzez tzw. ewolucję bezpośrednią. Podstawą tego procesu jest losowe wprowadzanie mutacji w sekwencji nukleotydowej białka fluorescencyjnego *in silico* i syntezy tych, które za pomocą modelowania komputerowego zostały wstępnie uznane za mogące prezentować pożądane cechy. Następnie dokonuje się ekspresji tych sekwencji w transformowanych bakteriach i ocenia ich jasność i fotostabilność. Na tej podstawie zostaje dokonana selekcja sekwencji i proces losowego wprowadzania zmian zostaje powtórzony, aż do osiągnięcia pożądanego efektu. Ta strategia jest wysokoprzepustowa oraz nie wymaga dużych nakładów pracy, jednak wymaga często wielokrotnego powtórzenia procedury. Owoce takiej taktyki jest białko fluorescencyjne mPlum (maksimum emisji 649 nm) powstałe z wyjściowej sekwencji mRFP1 (maksimum emisji 607 nm) (WANG i współaut. 2004).

Dodatkowo wyróżnić można grupy białek reporterowych, których właściwości są modyfikowane przez ekspozycję na światło o długości fali różnej od tej dla wzbudzenia lub emisji. Są one szczególnie przydatne w badaniu dynamiki tych białek w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Wyróżnia się tu trzy klasy białek: fotoaktywowalne (ang. photoactivatable) fotokonwertowalne (ang. photoconvertible) i fotoprzełączalne (ang. photoswitchable). Od tych wszystkich klas wymagane są właściwości monomerycznej formy, wysokiego kontrastu między nie- oraz naświetloną cząsteczką i odpowiedzi na sygnał świetlny w czasie rzeczywistym (CAMPBELL i DAVIDSON 2010).

Mechanizm białek fotoaktywowalnych polega na konformacyjnych zmianach w ramach chromoforu. Stan wytłumionej emisji charakteryzuje się brakiem lub niewielką emisją fluorescencji i jest przerywany dzięki fali elektromagnetycznej o odpowiedniej długości. Fala ta jest zazwyczaj krótsza od tej będącej maksimum wzbudzenia reportera. Przykładem może być tutaj białko PA-GFP, pochodna avGFP, posiadająca chromofor o charakterze anionowym. Kluczową zmianą względem avGFP było wprowadzenie treoniny w pozycji 203. Naświetlenie PA-GFP falą świetlną o długości 405 nm stukrotnie zwiększa absorpcję światła przy 504 nm, dając w rezultacie wyraźny kontrast między białkami aktywowanymi a nieaktywowanymi (PATTERSON i LIPPINCOTT-SCHWARTZ 2002).

Wyjątkową cechą białek fotokonwertowalnych jest przesunięcie spektrum emisji w stronę dłuższych fal promieniowania elektromagnetycznego. Wynika to ze zmian w chromoforze białka zainicjowanych przez konkretną długość fali świetlnej. Pierwsze informacje na temat białek fotokonwertowalnych dotyczyły białka odkrytego u koralowca madreprowego *Trachyphyllia geoffroyi*. Było to tetrameryczne białko fluorescencyjne nazwane Kaede. Odkryty mechanizm procesu polega na fotokonwersji w wyniku działania promieniowania ultrafioletowego. W jego wyniku zielone spektrum emisji (maksimum absorpcji 508 nm oraz emisji 518 nm) przechodzi w obszar światła czerwonego (maksimum absorpcji wynoszące 572 nm oraz emisji 582 nm). Nieodwracalna fotokonwersja w środowisku tlenowym powoduje w rezultacie zwiększenie emisji sygnału czerwonego ponad dwa tysiące razy (ANDO i współaut. 2002).

Białka fotoprzełączalne charakteryzują się możliwością aktywacji i dezaktywacji przez specyficzną dla nich długość fali świetlnej. Przykładem takiego białka jest wariant białka Dronpa z koralowców grupy *Pectiniidae*. Monomeryczny wariant Dronpa (występu-

jący naturalnie jako tetramer) posiada dwa maksima absorpcji: silniejszy, przy 503 nm (chromofor deprotonowany) oraz niższy, przy 390 nm (chromofor uprotonowany). Jednak zastosowanie fali o długości 488 nm na formie deprotonowanej doprowadza do emisji fluorescencji o maksimum przy 518 nm i powstania formy uprotonowanej białka – nieemitującej fluorescencji. Spontaniczny, powolny powrót do formy deprotonowanej prowadzi do emisji światła przy 405 nm (ANDO i współaut. 2004). Sugeruje się, że mechanizm funkcjonowania białek fotoaktywowalnych polega na izomeryzacji *cis-trans* w tyrozynie chromoforu białka. Forma *cis* odpowiadać ma za stan aktywowany, a *trans* – za dezaktywowany (ANDRESEN i współaut. 2005).

BIĄŁKA REPORTEROWE WYKRYWANE ABSORBCJOMETRYCZNIE

Pierwotnie geny reporterowe *uidA* i *lacZ* były wykrywane poprzez uzyskanie barwnego produktu (kolorymetria). Współcześnie opracowano dla tego układu reporterowego także techniki pomiaru luminometrycznego czy fluorymetrycznego.

Produktem genu *uidA* jest β -glukuronidaza (GUS) (Ryc. 1). U *Escherichia coli* enzym ten inicjuje szlak metabolizmu kwasu heksourynowego (ASHWELL 1962). Ta kwaśna hydrolaza skatalogowana jako EC 3.2.1.31 jest w warunkach *in vivo* tetramerem o masie monomeru 68 kDa (WILSON i współaut. 1991) i odpowiada za rozkład licznych β -glukuronidów (PAIGEN 1979). Szczególną rolę w rozwoju tego reportera odegrał zespół pod kierownictwem Novela, analizujący sam gen (NOVEL i NOVEL 1976), natomiast metodologię jego użycia zrealizował zespół Jeffersona, tworząc konstrukcję z promotorem wirusa mozaikowatości kalafiora (CaMV) (JEFFERSON i współaut. 1987).

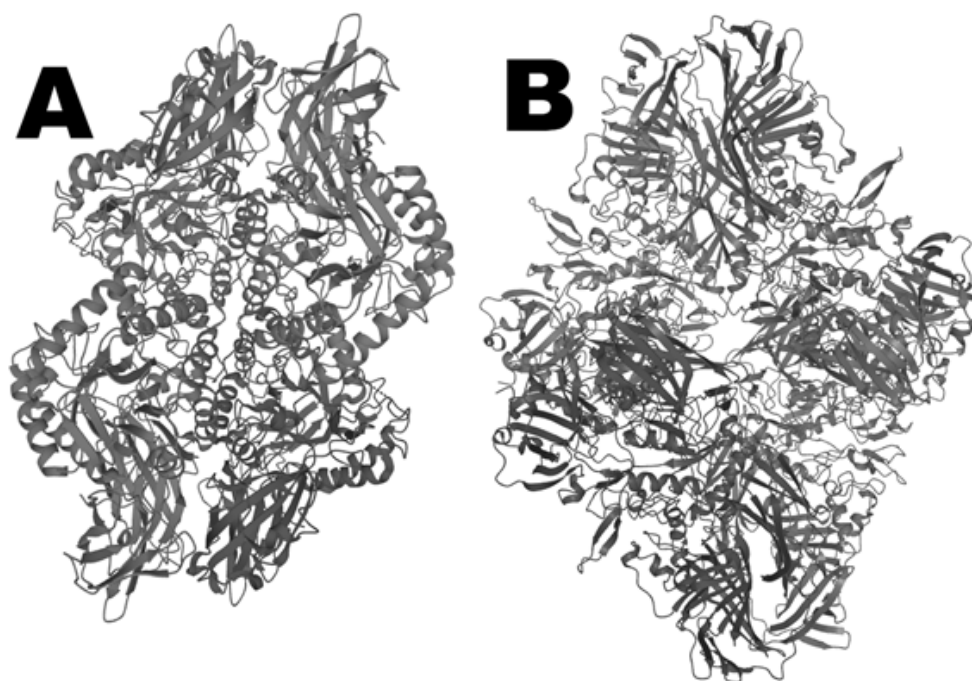
Wyczerpująco opisano możliwości jego zastosowania przy badaniu ekspresji w poszczególnych tkankach, zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych (JEFFERSON i współaut. 1986). W badaniach nad roślinami, gen *uidA* przewyższył swoją popularnością reportery CAT (ang. chloramphenicol acetyl-transferase) i NPTII (ang. neomycin phospho-transferase II). Wynika to z utrudnionej analizy ilościowej i kinetyki reakcji spowodowanej obecnością wewnątrzkomórkowych enzymów (transferaz, fosfataz, esteraz) (GORMAN i współaut. 1982). Za niebieski produkt, klasycznie kojarzony z tym genem, jest odpowiadający substrat X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolylo- β -D-glukuronid), szczególnie efektywnie widoczny w barwieniu histoche-

micznym. β -glukuronidaza jest wykorzystywana także w pracach nad promieniowcami (MYRONOVSKIY i współaut. 2011) oraz z dużym powodzeniem w modelu drożdżowym (MARATHE i MCEWEN 1995).

W przypadku detekcji spektrofotometrycznej, jako substrat wykorzystywany jest *p*-nitrofenylo- β -D-glukuronid (λ_{\max} = 405 nm) oraz fenoftaleino- β -D-glukuronid (λ_{\max} = 546 nm) (SZASZ 1967). Alternatywą dla klasycznej spektrofotometrii jest pomiar technikami fluorymetrycznymi, które cechują się nawet do 10^2 razy większą czułością wykrywania (GARTLAND i współaut. 2000). Maksimum emisji światła następuje w pH neutralnym, będącym optimum dla reakcji enzymatycznej (JEFFERSON 1985). Jako substrat reakcji można stosować MUG (ang. 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide) rozkładany przez enzym do MU (ang. methyl umbelliferone) i kwasu glukuronowego. Stężenie MU jest mierzone po wzbudzeniu falą o długości 365 nm i maksimum emisji 455 nm. Alternatywnym substratem fluorescencyjnym jest związek funkcjonujący pod nazwą handlową di- β -D-glukuronid fluoresceiny (FDGlcU), którego produkt reakcji posiada maksimum wzbudzenia przy 495 nm oraz emisji 518 nm (POTOT i współaut. 2010).

Drugim przykładem białka reporterowego z *Escherichia coli* jest β -galaktozydaza (EC 3.2.1.23) (Ryc. 1) kodowana przez gen *lacZ* z operonu laktozowego. W bakterii tej katalizuje reakcje: rozkładu laktozy do monomerycznych cukrów, generację allolaktozy przez transgalaktozylację laktozy i dezaktywację operonu *lacZ* poprzez rozkład allolaktozy (HUBER i współaut. 1976). Sam enzym (inaczej nazywany laktazą) odegrał historyczną rolę w rozwoju biologii molekularnej w ramach badań nad teorią operonu stworzoną przez JACOBA i MONODA (1961). β -galaktozydaza jest katalizatorem hydrolitycznego rozkładu β -arabidozydów i β -galaktozydów (WHITAKER 1972). Dla celów przemysłowych jest on pozyskiwany ze szczepów *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces fragilis* lub *Bacillus stearothermophilis* i zależnie od organizmu, z którego pochodzą, są one zróżnicowane pod względem optymalnego pH i warunków termicznych (RICHMOND i współaut. 1981).

Na strukturę β -galaktozydazy składają się cztery łańcuchy polipeptydowe o łącznej masie 464 kDa, z czego pojedynczy łańcuch złożony jest z 1023 aminokwasów. Optymalne pH działania enzymu z *Escherichia coli* wynosi 7,4 (JACOBSON i współaut. 1994). Z pięciu domen białkowych każdego z monomerów, rolę katalityczną spełnia domena trzecia o pozycji aminokwasowej od 334 do 627, zdefiniowana jako baryłka $\alpha_8\beta_8$.



Ryc. 1. Struktura przestrzenna β -glukuronidazy (A) i β -galaktozydazy (B).

Oba enzymy należą do rodziny glikozydaz. Źródło: <https://www.rcsb.org/3d-view/3K46>, <https://www.rcsb.org/3d-view/4V40?preset=electronDensityMaps> CC-BY.

lub domena TIM. Za ewolucyjnego przodka β -galaktozydazy uważane jest białko, które składałoby się tylko z pojedynczej domeny TIM, mogącej rozkładać złożone oligosacharydy (JUERS i współaut. 1999). Najczęściej stosowanym substratem dla tego enzymu jest X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolylo- β -D-galaktopiranozyd), wykorzystywany do oznaczeń ilościowych i jakościowych. X-gal jest bezbarwnym, dobrze rozpuszczalnym w wodzie substratem reakcji, zbudowanym z reszty galaktozy i podstawnika indolowego. Hydroliza X-gal uwalnia podstawnik indolowy, który dimeryzuje z drugim podstawnikiem tworząc cząsteczkę o niebieskim zabar-

wieniu (JUERS i współaut. 2012). Klasyczny układ reporterowy wykorzystuje dodatkowo IPTG (izopropyl- β -D-1-tiogalaktopiranozyd), nierozkładalny przez β -galaktozydazę analog strukturalny allolaktozy, który zapewnia stałą aktywność operonu *lacZ* (MARBACH i BETTENBROCK 2012). Rozwój badań nad tym systemem reporterowym zaowocował opracowaniem nowych substratów, także tych mierzonych fluorymetrycznie i luminometrycznie (Tabela 2).

Poza bakteriami możliwe jest wykorzystanie β -galaktozydazy w komórkach ssaczych. Prowadzone badania pokazały, że możliwa jest ekspresja 15 razy większa od tej wzglę-

Tabela 2. Porównanie popularnych substratów β -galaktozydazy (GARY i KINDELL 2005, VEGA i współaut. 2005), <https://www.thermofisher.com/pl/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/enzyme-substrates/detecting-glycosidases.html>.

Substrat	Typ pomiaru	Długość fali
X-gal	Kolorymetryczny	420 nm
ONPG	Kolorymetryczny	420 nm
CPRG	Kolorymetryczny	595 nm
Tropix® Galacto™-Star	Luminometryczny	-
di- β -D-galaktopiranozyd fluoresceiny (FDG)	Fluorymetryczny	490/514 nm
β -D-galaktopiranozyd rezorufiny	Fluorymetryczny	571/585 nm

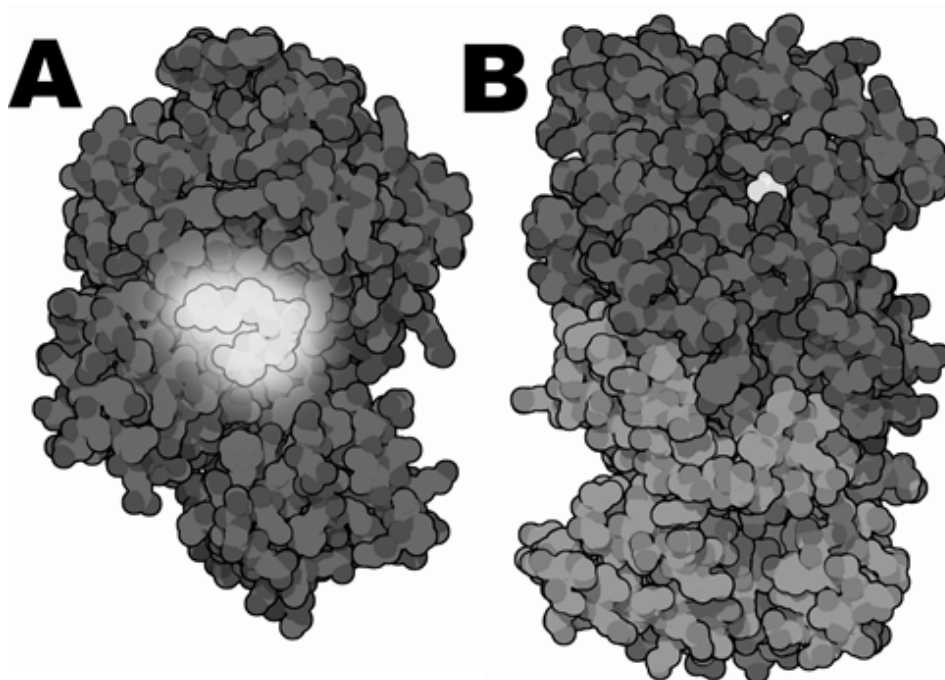
dem analogicznego konstrukt, wprowadzonego do *Escherichia coli*, gdzie do transfekcji komórek ssaczych wykorzystano konstrukt lentiwirusowy. Konstrukt dla *E. coli* zawierał endogenną sekwencję β -galaktozydazy, natomiast konstrukt dla komórek ssaczych (nazwany przez autorów *LacZco*) zawierał modyfikację w postaci dodanej kanonicznej sekwencji Kozak oraz odcięcia pierwszego kodonu kodującego aminokwas enzymu. Dzięki temu drugi kodon (kodujący metioninę) stał się kodonem inicjatorowym (ANSON i LIMBERIS 2003). Hybrydy β -galaktozydazy i białka docelowego również wydajnie spełniają swoje funkcje w liniach pochodzenia ssaczego, czego przykładem jest hybryda tego enzymu z sekwencją lokalizacji jądrowej dużego antygeny T SV40, lokującej hybrydę w środku jądra komórkowego (KALDERON i współaut. 1984). System reporterowy β -galaktozydaz nie jest jednak pozbawiony wad. Inne substraty poza X-gal są często od niego o wiele droższe (MÖCKLI i AUERBACH 2004), mają czas inkubacji dłuższy od tego dla X-gal oraz są mało czułe przy zastosowaniu kolorymetrii (ANSON i LIMBERIS 2003).

BIOLUMINESCENCYJNE BIAŁKA REPORTEROWE

Wyróżnia się dwie klasy systemów reporterowych opartych o działanie lucyferazy (katalizatora reakcji bioluminescencji) (Ryc. 2). Pierwsze z nich są pochodzenia

bakteryjnego, np. *Vibrio spp.* i *Photobacterium luminescens* (BALDWIN i współaut. 1984, MANUKHOV i współaut. 2000), natomiast drugie pochodzą z różnych gatunków chrząszczy, np. *Photinus pyralis* oraz rodziny *Elateridae* (DE WET i współaut. 1987). Uniwersalność i powtarzalność pomiaru luminescencji pozwoliła na powstanie licznych, dostępnych komercyjnie zestawów do detekcji. Opierają się one albo na wprowadzaniu odpowiedniego, przygotowanego przez producenta, konstruktu genetycznego (ALLARD 2008) lub dodawaniu lucyferazy jako osobnego odczynnika enzymatycznego (FAN i WOOD 2007).

Lucyferaza izolowana z *Photinus pyralis* kodowana jest przez gen *luc*, a jej produkt klasyfikowany jest do rodziny ligaz koenzymu A. Enzym ten występuje w postaci monomeru, a jego substratami jest lucyferyna (pochodna benzotiazolu), tlen i ATP. Efektem reakcji jest emisja fal elektromagnetycznych z zakresu od 560 do 614 nm, a intensywność oraz długość fali przy maksymalnej emisji zależna jest od temperatury środowiska reakcji. Wraz ze wzrostem temperatury następuje przesunięcie w stronę fal dłuższych. Dla 25°C maksimum emisji znajduje się przy 560 nm. Natomiast dla 37°C ma ono wartość 604 nm, przy czym termolabilność w warunkach *in vitro* sprawia, że okres półtrwania formy natywnej w tej temperaturze wynosi zaledwie 3 minuty. Komercyjnie dostępna jest sekwencja lucyferazy pozbawiona fragmentu kierującego go do perok-



Ryc. 2. Lucyferaza pochodząca z *Photinus pyralis* (A) i bakteryjna (B).

Źródło: <https://pdb101.rcsb.org/motm/78> CC-BY.

sysomów. Wszystkie elementy funkcjonującej lucyferazy kodowane są przez pojedynczy gen, co znacząco ułatwia manipulację tym systemem reporterowym (DOYLE i współaut. 2010).

Lucyferazy pochodzenia bakteryjnego, np. *Photobacterium luminescens*, nie są kodowane przez jeden gen, ale przez cały operon *lux* zawierający geny *luxCDABE*. Lucyferaza bakteryjna jest heterodimerem kodowanym przez geny *luxA* i *luxB*, dające odpowiednio produkty o długości 360 (41,1 kDa) i 327 aminokwasów (37,6 kDa). Substratami reakcji tego enzymu jest FMNH₂, tlen i dekanal (długołańcuchowy aldehyd), który syntetyzowany jest przez pozostałe geny operonu, tj. *luxC*, *luxD* oraz *luxE*. Efektem reakcji jest emisja światła o maksimum przy długości 490 nm. Na pozostałe komponenty operonu *lux* składają się białka regulatorowe i wiążące heterodimer lucyferazy (MEIGHEN 1993). Ten system reporterowy znajduje zastosowanie w badaniach z wykorzystaniem bakterii Gram-ujemnych, np. *Salmonella* spp. Wykorzystywany jest do kontroli stanu sanitarnego żywności czy do doświadczeń z ssaczymi liniami komórkowymi (KARSI i współaut. 2008). Obecność genów odpowiedzialnych za generację substratu reakcji pozwala na efekt samoistnej bioluminescencji. Aby zwiększyć emitowany sygnał należy zapewnić dostateczną ilość pozostałych substratów (realizowaną przez tlenowe warunki hodowli). W przypadku organizmów eukariotycznych, np. *Saccharomyces cerevisiae*, okazywało się to niewystarczające i operon wymagał do wydajnego działania ekspresji genu oksydoreduktazy flawinowej (GUPTA i współaut. 2003). Operon *luxCDABE* ulega wydajniejszej ekspresji u bakterii Gram-ujemnych niż u Gram-dodatnich, czego przyczyną są różnice w strukturze miejsc inicjacji transkrypcji. Z powodzeniem dokonywano zmian w operonie celem wydajnej ekspresji u Gram-dodatnich: *Staphylococcus* i *Listeria* (FRANCIS i współaut. 2000).

REPORTERY A BIOSENSORY

Wykorzystanie białek reporterowych w celu oznaczeń ilościowych i jakościowych idealnie wpisuje te białka w rolę biosensory. Samo pojęcie biosensora definiujemy według Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (ang. IUPAC) jako: „urządzenie analityczne posiadające powiązane elementy biologiczne oraz właściwy im przetwornik, które dostarcza częściowo lub w pełni ilościowych danych o scharakteryzowanej specyficzności”. Należy wspomnieć, że pierwszym uznanym biosensorem był detektor glukozy, składający się z platynowej

elektrody tlenowej i oksydazy glukozy (EC 1.1.3.4) (CLARK i LYONS 1962). Dodatkowo, rozwój inżynierii genetycznej umożliwił tworzenie konstruktów wzajemnie oddziałujących na siebie sekwencji genetycznych, przez co możliwe jest skonstruowanie biosensora z systemem bramek logicznych, emitującego sygnał tylko po jego pozytywnej selekcji logicznej (LAI i współaut. 2014).

Przykładem biosensory opartych o białka fluorescencyjne są te pozwalające na oznaczenie rozpuszczalności i agregacji białek wewnątrz komórki. Tradycyjna forma takiego biosensora opiera się na stworzeniu hybrydy białka badanego i GFP. Białko to jako domena hybrydy cechuje się słabą wydajnością fałdowania, jeżeli pozostałe domeny białka hybrydowego nie uzyskają poprawnej struktury III-rzędowej lub ulegną agregacji z innymi cząsteczkami białka (WALDO i współaut. 1999). W tej strategii wykorzystuje się często wolno dojrzewającego mutantu GFP. Gwarantuje to fałdowanie GFP dopiero po prawidłowym sfałdowaniu pozostałych domen białka fuzyjnego i proporcjonalność sygnału do ilości hybryd o prawidłowej strukturze. Modyfikacją tej strategii detekcji jest podzielenie całej hybrydy na dwie osobne części. Pierwsza część składa się z badanego białka oraz jednej z 11 β-wstażek GFP wchodzących w skład β-baryłki. Druga część składa się z reszty sekwencji aminokwasowej GFP, zdolnej do sfałdowania się w formę trzonu β-baryłki, pomimo braku jednej β-wstażki (CABANTOUS i współaut. 2005). Taki trzon GFP jest wytwarzany w innym organizmie i przygotowany jako osobny odczynnik. Brak prawidłowego sfałdowania się białka badanego skutkuje niemożnością interakcji z pozostałym trzonem GFP z ostatnim fragmentem β-baryłki i brakiem sygnału. Ta strategia badawcza pozwoliła na analizę w komórkach ssacza agregacji białka tau w czasie rzeczywistym. Dostarczyło to cennych danych dotyczących tego procesu w przypadku choroby Alzheimera (CHUN i współaut. 2007).

Innym przykładem funkcjonowania białek reporterowych w roli biosensora jest badanie pH poszczególnych przedziałów komórki. Zmiany w spektrum i maksimum emisji GFP wynikają z szybkości oraz wydajności fałdowania, uprotonowania i deprotonacji chromoforu, zależnych od różnych wartości pH (CRONE i współaut. 2013). Natomiast specyficzność detekcji GFP wynika z dodania odpowiedniej sekwencji lokalizacyjnej. Wyróżnić należy także pomiar ratiometryczny i nieratiometryczny z użyciem białek fluorescencyjnych. System nieratiometryczny polega na wykorzystaniu właściwości chromoforu, np. anionowy charakter w EGFP (ang. enchan-

ced green fluorescent protein). Samo EGFP jest wariantem avGFP, o 35-krotnie większej jasności niż wyjściowy reporter, co jest wynikiem zamiany fenyloalaniny na leucynę w pozycji 64 i seryny na treoninę w pozycji 65 (CORMACK i współaut. 1996). W optymalnych warunkach deprotonowany, anionowy chromofor EGFP jest zdolny do emisji sygnału. Jeżeli zmiany pH przekroczą krytyczną dla układu wartość, ulegnie on protonacji i stanie się niezdolny do emisji sygnału (KNEEN i współaut. 1998). Pomiar ratiometryczny opiera się o zastosowanie białek fluorescencyjnych cechujących się podwójnym maksimum wzbudzenia i emisji. Proporcja między jednym maksimum wzbudzenia a drugim w danym pH środowiska jest względnie stała. Umożliwia to uzyskanie krzywej kalibracyjnej do oszacowania pH (MIESENBOCK i współaut. 1998). Mechanizm zmian wewnątrz białka, wraz ze zmianami pH, wynika z podstawień aminokwasów w bliskim mikrośrodowisku chromoforu. Jednym z pierwszych przykładów takiego biosensora było białko RaGFP. W jego strukturze serynę w pozycji 202 zastąpiono histydyną, co umożliwiło wyznaczenie nim pH w zakresie od 5,5 do 7,5. Innym przykładem może być deGFP, emitujące zieloną i niebieską fluorescencję. Wzrost pH promuje emisję zielonej fluorescencji kosztem niebieskiej (HANSON i współaut. 2002). Alternatywnie łączy się tandemowo białka do pomiaru ratio- i nieratiometrycznego, w szczególności te dające w efekcie zjawisko FRET, co ma na celu zwiększenie dokładności pomiaru (AWAJI i współaut. 2001).

Zastosowanie lucyferazy jako biosensorów możliwe jest na dwa różne sposoby. Pierwszy z nich polega na modyfikacji genu reportera tak, aby wprowadzić sekwencję rozpoznawaną specyficznie przez oznaczaną cząsteczkę. Przykładem jest wykorzystanie lucyferazy zawierającej miejsce cięcia specyficznego dla kaspazy 3 (markera zachodzącej apoptozy) (GHAVAMI i współaut. 2009). Dodanie do stransfekowanych komórek czynnika apoptycznego wywoływało aktywację kaskady kaspaz i cięcie lucyferazy w specyficznym miejscu, co wpływało na emitowany sygnał. Taka strategia umożliwiła odkrycie właściwości apoptycznych trzech białek *Mycobacterium tuberculosis* (SHI i współaut. 2014). Drugi ze sposobów monitoruje pośrednio zmiany w metabolizmie komórek przez wzrost lub zanik luminescencji wywołany zmianami w ilości substratów reakcji (np. ATP, FMNH₂). Tę taktykę zastosowano w konstrukcji biosensora toksyn mitochondrialnych. Opierał się on na genie *luc* pod kontrolą konstytutywnego promotora ludzkiego cytomegalowirusa. Selektywne działanie toksyn na łańcuch oddechowy obniżało

wewnątrzkomórkowe stężenie ATP i pośrednio siłę sygnału. Stworzony biosensor był w stanie wykryć ilość toksyn na poziomie 0,2 μM (RAHIMIRAD i współaut. 2019).

TECHNIKA FRET

Transfer energii rezonansu Förstera (FRET) został opisany przez FÖRSTERA już w 1948 r. i dla współczesnych biologów molekularnych pełni rolę nanolinijki (ang. nanoruler), gdyż pozwala na precyzyjne wyznaczenie odległości pomiędzy cząsteczkami lub wielkośći badanach struktur. Dynamiczny rozwój tej techniki i uniwersalne zastosowanie możliwe jest dzięki zastosowaniu w niej białek reporterowych. Metoda polega na bezpromienistym przekazywaniu energii ze wzbudzonego donora na akceptor, który emituje kwant światła wracając do stanu podstawowego. Technika FRET jest możliwa do zastosowania jako miarka dla skali „nano” ze względu na bezpośrednią zależność między odległością cząsteczek a intensywnością sygnału. Dobrze charakteryzuje to parametr tej zależności zwany odległością krytyczną (R_0). Jest to odległość dla konkretnej pary fluorochromów w danym rozpuszczalniku i określonym stężeniu, dla której wydajność sygnału FRET wynosić będzie 50% oszacowanej wydajności teoretycznej (SCHAUFLELE i współaut. 2005). Wartość ta jest o tyle ważna, że pozwala stwierdzić, gdzie jest możliwa najwyższa rozdzielczość i dokładność pomiaru (STRYER 1978). Drugim czynnikiem wpływającym na wydajność techniki jest poziom nakładania się na siebie widm spektralnych donora i akceptora. Im większa będzie ta różnica, tym niższa będzie teoretyczna maksymalna wydajność FRET. Istotną rolę odgrywają także interakcje typu dipol-dipol. Są one charakteryzowane przez parametr κ^2 , który określa względny kąt tworzony przez momenty dipolowe fluorochromów. Za najdogodniejszą konformację uznaje się ułożenie równoległe fluorochromów ($\kappa^2 = 4$), a za najmniej wydajne – prostopadłe ułożenie momentów dipolowych ($\kappa^2 = 0$). Swoboda zmian konformacyjnych fluorochromów powoduje jednak dynamiczne zmiany w obrębie tego parametru, przez co przyjmuje się $\kappa^2 = 2/3$ jako średnią wartość wszystkich występujących układów przestrzennych fluorochromów (SAHO 2011).

Na potrzeby nauk biologicznych fluorochromy wykorzystywane w technice FRET przyporządkować można do jednej z dwóch grup. Do pierwszej grupy zalicza się związki naturalnie występujące wewnątrzkomórkowo, np. chlorofil czy NADH. Pary sprzężonych wiązań wewnątrz ich struktur pozwalają na emisję sygnału za pomocą promieniowania

ultrafioletowego. Pomimo że wykorzystywane spektrum jest szkodliwe dla modelu badawczego, to jest ono wysoce wydajne dla modelu *in vivo* (MIYAWAKI i współaut. 2003). Druga kategoria to fluorochromy wprowadzane do komórki celowo na potrzeby eksperymentu. Klasycznie, do tego celu wykorzystywane były syntetyczne barwniki fluorescencyjne, które choć charakteryzują się wysoką emisją sygnału, nie są wystarczająco specyficzne wobec konkretnego białka, ze względu na ograniczenie charakterystyki wiązania do grup funkcyjnych w sposób samoistny lub enzymatyczny (DAWSON i KENT 2000). Białka fluorescencyjne wraz z technikami inżynierii genetycznej stanowią rozwiązanie problemu małej specyficzności znaczników. Dodatkowo, szeroka paleta dostępnych wersji białek fluorescencyjnych pozwala na elastyczny dobór układu donora i akceptora. Do najpopularniejszych należą duet GFP/RFP ($R_0 = 4,7$ nm) i CFP/YFP ($R_0 = 4,9$ nm) (SRISA-ART i współaut. 2007). Pod względem wykorzystania fluorochromów, białka fluorescencyjne są zdecydowanie mniej inwazyjną metodą, a ich ekspresja i działanie nie wpływa znacząco na model badawczy. Możliwość licznych modyfikacji materiału wyjściowego (wybór końca do połączenia w hybrydę, długość sekwencji łącznikowej) ułatwia regulowanie wydajności FRET. Pomimo wysokiej specyficzności, wadą białek reporterowych w technice FRET jest ich potencjalna homodimeryzacja i powstawanie artefaktów (GAUTIER i współaut. 2001).

Lucyferazy są wykorzystywane również jako element techniki FRET. Jest ona definiowana wtedy skrótem BRET (transfer energii rezonansu bioluminescencji). Przykładem zastosowania BRET jest analiza aktywności specyficznych proteaz z użyciem odpowiednio skonstruowanej hybrydy. Białko hybrydowe składało się z lucyferazy z *Renilla reniformis* i GFP, połączonych sekwencją łącznikową rozpoznawaną przez oznaczany wewnątrzkomórkowo enzym. Pozwala to na określenie aktywności enzymu odwrotnie proporcjonalnej do intensywności BRET (DACRES i współaut. 2019). Inne przykłady pokazały możliwość przesunięcia sygnału BRET z obszaru zieleni w stronę czerwieni, zastępując wcześniej wspomnianą parę wariantami tych reporterów, np. RLuc8.6 i TurboFP635 (WEIHS i współaut. 2020).

Zastosowanie białek reporterowych jako donorów/akceptorów w technice FRET przyczyniło się do jej dynamicznego rozwoju. Przede wszystkim znacząco zwiększyły precyzję oznaczania lokalizacji, orientacji przestrzennej, interakcji poszczególnych cząstek, czy niewielkich zmian konformacyjnych w obrębie badanego białka. Idealnym przy-

kładem jest analiza wiązania sekretyny z jej receptorem, z naciskiem na ocenę aktywności domen sygnałowych i wiążących receptory (HARIKUMAR i współaut. 2007). Interakcje między pojedynczymi białkami dzięki technice FRET mogą być rozszerzone na analizę oddziaływań między całymi komórkami patogenu a gospodarzem. Przykładami mogą być: zdefiniowanie komponentów w szlaku sygnałowym rozpoczynającym się przez rozpoznanie sekwencji PAMP przez receptor TLR9 (LATZ i współaut. 2007) lub analiza mechanizmu infekcji roślin przez *Ascomycota* (BHAT i współaut. 2005). W przypadku badań nad receptorami TLR9 badane były zmiany konformacyjne w ektodomenie białka i domenach odpowiedzialnych za aktywację cytoplazmatycznego przebiegu sygnału. Potwierdzono, że apozycyjne zmiany w obrębie domen sygnałowych u TLR9 w endosomach są warunkiem koniecznym dla włączenia w szlak sygnałowy konkretnych molekuł adaptorowych. Zmiany konformacyjne widoczne były jako zanik/zajście zjawiska FRET. Wykorzystanie FRET w mechanizmie infekcji roślin polegało na analizie roli kalmoduliny jako regulatora powierzchniowego białka MLO, uznawanego jako jedno z kluczowych dla infekcji grzybiczych roślin. Interakcje wyznakowanych białek i zjawisko FRET następowało tylko wtedy, gdy dochodziło do skutecznej penetracji komórki gospodarza przez apesorium *Ascomycota*. Technika FRET z pomocą białek reporterowych umożliwia także rozszerzenie badań interakcji na zachowywanie się błony komórkowej, jak np. rozdział faz dwuwarstwy, oznaczenie lokalizacji konkretnych tratw lipidowych (LOURA i współaut. 2009) lub ocenę ilościową oddziaływań pomiędzy komponentami lipidowymi a białkowymi błony komórkowej (LOURA i współaut. 2010).

ZAKOŃCZENIE

Białka reporterowe znacząco przyczyniły się do rozwoju nauk biologicznych. Szeroka paleta białek reporterowych, różnorodność wykorzystywanych technik pomiarowych, dostępność wymiennych substratów reakcji oraz powiększająca się liczba nowych wariantów sprawiają, że są kluczowym narzędziem badania procesów na poziomie molekularnym. Sama baza białek fluorescencyjnych FPbase zawiera 782 scharakteryzowane reportery (stan na 23 VII 2020 r.). Istotne w pełnym zastosowaniu potencjału białek reporterowych jest nie tylko analizowanie ich pod względem parametrów ogólnie istotnych dla białek, jak np. temperatura czy optymalne pH. Kluczowa jest też znajomość licznych mutantów białek reporterowych o

unikatowych właściwościach. Przykładem tego jest śledzenie przemieszczania się białek wewnątrz komórek za pomocą fotoaktywowalnych białek reporterowych (CHUDAKOV i współaut. 2007) czy oznaczanie wewnątrzkomórkowego nadtlenu wodoru za pomocą mutanta białka czerwonej fluorescencji (ERMAKOVA i współaut. 2014). Współcześnie białka reporterowe stanowią nie tylko produkt genów markerowych, ale także podstawowe narzędzie w poznawaniu procesów komórkowych.

Streszczenie

Celem pracy jest zaprezentowanie powszechnie wykorzystywanych białek reporterowych. Ważne w rozwoju nauk biologicznych jest nie tylko rozumienie tych białek jako produktów genów markerowych, ale również jako narzędzi przydatnych do wysoce specyficznych analiz. Zaprezentowano i zdefiniowano pojęcie genu i białka reporterowego, z podkreśleniem niezbędnych cech, które powinien prezentować reporter. Scharakteryzowano fluorescencyjne białka reporterowe, z naciskiem na białko zielonej fluorescencji. Wyróżnione zostały podklasy fotoaktywowalnych, fotoprzełączalnych i fotokonwertowalnych białek reporterowych. Opisano klasyczne reportery enzymatyczne: β -galaktozydazy i β -glukuronidazy, wraz z ich alternatywnymi substratami. Przedstawiono lucyferazy ze szczególnym rozróżnieniem ze względu na przynależność systematyczną gatunku, z którego dany enzym pochodzi. Przybliżono czytelnikom podstawowe zastosowania białek reporterowych jako specjalistycznych narzędzi biologii molekularnej: w technice FRET oraz w roli biosensorów. Praca ugruntowuje wiedzę na temat specyficznych zastosowań danych reporterów i stanowi podstawę do dalszych poszukiwań konkretnej metody lub poszczególnych modyfikacji technik reporterowych.

LITERATURA

- ALLARD S. T. M., 2008. *Systemy genów reporterowych opartych na zjawisku bioluminescencji*. Post. Bioch. 5, 350-353.
- ANDO R., HAMA H., YAMAMOTO-HINO M., MIZUNO H., MIYAWAKI A., 2002. *An optical marker based on the UV-induced green-to-red photo-conversion of a fluorescent protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 12651-12656.
- ANDO R., MIZUNO H., MIYAWAKI A., 2004. *Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting*. Science 306, 1370-1373.
- ANDRESEN M., WAHL M. C., STIEL A. C., GRATER F., SCHAFFER L. V., TROWITZSCH S., WEBER G., EGGELING C., GRUBMULLER H., HELL S.W., JAKOBS S., 2005. *Structure and mechanism of the reversible photoswitch of a fluorescent protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 13070-13074.
- ANSON D. S., LIMBERIS M., 2003. *An improved β -galactosidase reporter gene*. J. Biotechnol. 108, 17-30.
- ASHWELL G., 1962. *Enzymes of glucuronic and galacturonic acid metabolism in bacteria*. Meth. Enzymol. 5, 190-208.
- AWAJI T., HIRASAWA A., SHIRAKAWA H., TSUJIMOTO G., MIYAZAKI S., 2001. *Novel green fluorescent protein-based ratiometric indicators for monitoring pH in defined intracellular microdomains*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 289, 457-462.
- BALDWIN T. O., BERENDS T., BUNCH T. A., HOLZMAN T. F., RAUSCH S. K., SHAMANSKY L., TREAT M. L., ZIEGLER M. M., 1984. *Cloning of the luciferase structural genes from Vibrio harveyi and expression of bioluminescence in Escherichia coli*. Biochemistry 23, 3663-3667.
- BHAT R. A., MIKLIS M., SCHMELZER E., SCHULZLEFERT P., PANSTRUGA R., 2005. *Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 3135-3140.
- BUCHOWICZ J., 2012. *Biotechnologia molekularna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- CABANTOUS S., TERWILLIGER T. C., WALDO G. S., 2005. *Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein*. Nat. Biotechnol. 23, 102-107.
- CAMPBELL R. E., DAVIDSON M. W., 2010. *Fluorescent reporter proteins*. [W:] *Molecular Imaging with Reporter Genes*. GAMBHIR S. S., YAGHOUBI S. S. (red.). Cambridge University Press, Cambridge, 3-40.
- CHUDAKOV D. M., LUKYANOV S., LUKYANOV K. A., 2007. *Using photoactivatable fluorescent protein Dendra2 to track protein movement*. Bio-Techniques 42, doi: 10.2144/000112470.
- CHUN W., WALDO G. S., JOHNSON G. V., 2007. *Split GFP complementation assay: a novel approach to quantitatively measure aggregation of tau in situ: effects of GSK3beta activation and caspase 3 cleavage*. J. Neurochem. 103, 2529-2539.
- CLARK JR. L. C., LYONS CH., 1962. *Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery*. Ann. NY Acad. Sci. 102, 29-45.
- CORMACK B. P., VALDIVIA R. H., FALKOW S., 1996. *FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)*. Gene 173 (1 Spec. No), 33-38.
- CRONE D. E., HUANG Y. M., PITMAN D. J., SCHENKELBERG C., FRASER K., MACARI S., BYSTROFF C., 2013. *GFP-based biosensors - General Aspects*. RINKEN T. (red.). IntechOpen, Londyn, 1-34.
- DACRES H., WANG J., ANDERSON A., TROWELL S. C., 2019. *A rapid and sensitive biosensor for measuring plasmin activity in milk*. Sensors Actuators B, Chemical 301, doi.org/10.1016/j.snb.2019.127141.
- DAWSON P. E., KENT S. B., 2000. *Synthesis of native proteins by chemical ligation*. Ann. Rev. Biochem. 69, 923-960.
- DE WET J. R., WOOD K. V., DELUCA M., HELINSKI D. R., SUBRAMANI S., 1987. *Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells*. Mol. Cell. Biol. 7, 725-737.
- DOYLE T. C., QIAN W., CONTAG CH. H., 2010. *Revealing biomolecular mechanisms through in vivo bioluminescence imaging*. [W:] *Molecular Imaging with Reporter Genes*, GAMBHIR S. S., YAGHOUBI S. S. (red.). Cambridge University Press, Cambridge, 41-69.
- EHRMANN M. A., SCHEYHING C. H., VOGEL R. F., 2001. *In vitro stability and expression of green fluorescent protein under high pressure conditions*. Lett. Appl. Microbiol. 32, 230-234.
- ERMAKOVA Y. G., BILAN D. S., MATLASHOV M. E., MISHINA N. M., MARKVICHEVA K. N., SUBACH O. M., SUBACH F. V., BOGESKI I., HOTH M., ENIKOLOPOV G., BELOUSOV V. V., 2014. *Red fluorescent genetically encoded indicator for in-*

- tracellular hydrogen peroxide. Nat. Comm. 5, doi: 10.1038/ncomms6222.
- FAN F., WOOD K., 2007. *Bioluminescent assays for high-throughput screening*. Assay Drug Develop. Technol. 5, 127-136.
- FÖRSTER T., 1948. *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Ann. Physics 437, 55-75.
- FRANCIS K. P., JOH D., BELLINGER-KAWAHARA C., HAWKINSON M. J., PURCHIO T. F., CONTAG P. R., 2000. *Monitoring bioluminescent Staphylococcus aureus infections in living mice using a novel luxABCDE construct*. Infect. Immun. 68, 3594-3600.
- GARTLAND K. M. A., MCHUGH A. T., VITHA S., BENES K., IRVINE R. J., GARTLAND J. S., 2000. *Analysis of genetically modified plant gene expression using gus fluorimetry*. Mol. Biotechnol. 14, 235-239.
- GARY R. K., KINDELL S. M., 2005. *Quantitative assay of senescence-associated β -galactosidase activity in mammalian cell extracts*. Analyt. Biochem. 343, 329-334.
- GAUTIER I., TRAMIER M., DURIEUX C., COPPEY J., PANSU R. B., NICOLAS J. C., KEMNITZ K., COPPEY-MOISAN M., 2001. *Homo-FRET microscopy in living cells to measure monomer-dimer transition of GFP-tagged proteins*. Biophys. J. 80, 3000-3008.
- GHAVAMI S., HASHEMI M., ANDE S. R., YEGANEH B., XIAO W., ESHRAGHI M., BUS C. J., KADKHODA K., WIECHEC E., HALAYKO A. J., LOS M., 2009. *Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes*. J. Med. Genet. 46, 497-510.
- GORMAN C. M., MOFFAT L. F., HOWARD B. H., 1982. *Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells*. Mol. Cell. Biol. 2, 1044-1051.
- GROSS L. A., BAIRD G. S., HOFFMAN R. C., BALDRIDGE K. K., TSIEN R. Y., 2000. *The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 11990-11995.
- GUPTA R. K., PATTERSON S. S., RIPP S., SIMPSON M. L., SAYLER G. S., 2003. *Expression of the Photobacterium luminescens lux genes (luxA, B, C, D, and E) in Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res. 4, 305-313.
- HANSON G. T., MCANANEY T. B., PARK E. S., RENDLELL M. E., YARBROUGH D. K., CHU S., XI L., BOXER S. G., MONTROSE M. H., REMINGTON S. J., 2002. *Green fluorescent protein variants as ratiometric dual emission pH sensors. 1. Structural characterization and preliminary application*. Biochemistry 41, 15477-15488.
- HARIKUMAR K. G., LAM P. C., DONG M., SEXTON P. M., ABAGYAN R., MILLER L. J., 2007. *Fluorescence resonance energy transfer analysis of secretin docking to its receptor: mapping distances between residues distributed throughout the ligand pharmacophore and distinct receptor residues*. J. Biol. Chem. 282, 32834-32843.
- HARWOOD C. R., WIPAT A., 2011. *Zarządzanie genomem i jego analiza: Prokaryota [W:] Podstawy biotechnologii*. KRISTIANSEN B., RATLEDGE C. (red.) Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 51-81.
- HEIM R., PRASHER D. C., TSIEN R. Y., 1994. *Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 12501-12504.
- HENDERSON J. N., AI H. W., CAMPBELL R. E., REMINGTON S. J., 2007. *Structural basis for reversible photobleaching of a green fluorescent protein homologue*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 6672-6677.
- HUBER R. E., KURZ G., WALLENFELS K., 1976. *A quantitation of the factors which affect the lysozyme and transgalactosylase activities of β -galactosidase (E. coli) on lactose*. Biochemistry 15, 1994-2001.
- JACOB F., MONOD J., 1961. *Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins*. J. Mol. Biol. 3, 318-356.
- JACOBSON R. H., ZHANG X. J., DUBOSE R. F., MATTHEWS B. W., 1994. *Three-dimensional structure of beta-galactosidase from E. coli*. Nature 369, 761-766.
- JEFFERSON R. A., 1985. *DNA transformation of Caenorhabditis elegans: development and application of a new gene fusion system (cloning, chimeric, sequence)*. Rozprawa doktorska, University of Colorado at Boulder, Boulder.
- JEFFERSON R. A., BURGESS S. M., HIRSH D., 1986. *β -Glucuronidase from Escherichia coli as a gene-fusion marker*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8447-8451.
- JEFFERSON R. A., KAVANAGH T. A., BEVAN M. W., 1987. *GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants*. EMBO J. 6, 3901-3907.
- JUERS D. H., HUBER R. E., MATTHEWS B. W., 1999. *Structural comparisons of TIM barrel proteins suggest functional and evolutionary relationships between β -galactosidase and other glycohydrolases*. Protein Sci. 8, 122-136.
- JUERS D. H., MATTHEWS B. W., HUBER R. E., 2012. *LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance*. Protein Sci. 21, 1792-1807.
- KALDERON D., ROBERTS B. L., RICHARDSON W. D., SMITH A. E., 1984. *A short amino acid sequence able to specify nuclear localisation*. Cell 39, 499-509.
- KARSI A., HOWE K., KIRKPATRICK T. B., WILLS R., BAILEY R. H., LAWRENCE M. L., 2008. *Development of bioluminescent Salmonella strains for use in food safety*. BMC Microbiol. 8, doi: 10.1186/1471-2180-8-10.
- KNEEN M., FARINAS J., LI Y., VERKMAN A. S., 1998. *Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator*. Biophys. J. 74, 1591-1599.
- KUMAR A., PAL D., 2016. *Green fluorescent protein and their applications in advance research*. J. Res. Engin. Appl. Sci. 1, 42-46.
- LAI Y. H., SUN S. C., CHUANG M. C., 2014. *Biosensors with built-in biomolecular logic gates for practical applications*. Biosensors 4, 273-300.
- LATZ E., VERMA A., VISINTIN A., GONG M., SIROIS C. M., KLEIN D. C., MONKS B. G., MCKNIGHT C. J., LAMPHIER M. S., DUPREX W. P., ESPEVIK T., GOLENBOCK D. T., 2007. *Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9*. Nat. Immunol. 8, 772-779.
- LOURA L. M., DE ALMEIDA R. F., SILVA L. C., PRIETO M., 2009. *FRET analysis of domain formation and properties in complex membrane systems*. Biochim. Biophys. Acta 1788, 209-224.
- LOURA L. M., PRIETO M., FERNANDES F., 2010. *Quantification of protein-lipid selectivity using FRET*. Eur. Biophys. J. 39, 565-578.
- MANUKHOV I. V., RASTORGUEV S. M., EROSHNIKOV G. E., ZARUBINA A. P., ZAVIL'GEL'SKIĬ G. B., 2000. *Cloning and expression of the lux-operon of Photobacterium luminescens, strain Zm1:*

- nucleotide sequence of *luxAB* genes and basic properties of luciferase. *Genetika* 36, 322-330.
- MARATHE V. S., MCEWEN J. E., 1995. Vectors with the *gus* reporter gene for identifying and quantitating promoter regions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 154, 105-107.
- MARBACH A., BETTENBROCK K., 2012. *lac* operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase *LacA*. *J. Biotechnol.* 157, 82-88.
- MATSUMOTO S., TAKEBE I., MACHIDA Y., 1988. *Escherichia coli lacZ* gene as a biochemical and histochemical marker in plant cells. *Gene* 66, 19-29.
- MEIGHEN E. A., 1993. Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the *lux* genes. *FASEB J.* 7, 1016-1022.
- MIESENBOCK G., DE ANGELIS D. A., ROTHMAN J. E., 1998. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394, 192-195.
- MIYAWAKI A., SAWANO A., KOGURE T., 2003. Lighting up cells: labelling proteins with fluorophores. *Nat. Cell Biol. Suppl.*, S1-S7.
- MÖCKLI N., AUERBACH D., 2004. Quantitative β -galactosidase assay suitable for high-throughput applications in the yeast two-hybrid system. *BioTechniques* 36, 872-876.
- MYRONOVSKIY M., WELLE E., FEDORENKO V., LUZHETSKYY A., 2011. β -glucuronidase as a sensitive and versatile reporter in actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5370-5383.
- NAGAI T., IBATA K., PARK E. S., KUBOTA M., MIKOSHIBA K., MIYAWAKI A., 2002. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.* 20, 87-90.
- NOVEL M., NOVEL G., 1976. Regulation of β -glucuronidase synthesis in *Escherichia coli* K-12: pleiotropic constitutive mutations affecting *uxu* and *uidA* expression. *J. Bacteriol.* 127, 418-432.
- ORMÖ M., CUBITT A. B., KALLIO K., GROSS L. A., TSIEN R. Y., REMINGTON S. J., 1996. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273, 1392-1395.
- OW D. W., WOOD K. V., DELUCA M., DEWEY J. R., HELINSKI D. R., HOWELL S. H., 1986. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4870-4874.
- PAIGEN K., 1979. Acid hydrolases as models of genetic control. *Ann. Rev. Genet.* 13, 417-466.
- PAN H. C., WU Y. T., SHEN S. C., WANG C. C., TSAI M. S., CHENG F. C., LIN S. Z., CHEN C. W., LIU C. S., SU H. L., 2011. Characterization of axon formation in the embryonic stem cell-derived motoneuron. *Cell Transplant.* 20, 493-502.
- PATTERSON G. H., LIPPINCOTT-SCHWARTZ J., 2002. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science* 297, 1873-1877.
- PEDELACQ J. D., CABANTOUS S., TRAN T., TERWILIGER T. C., WALDO G. S., 2006. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 24, 79-88.
- POTOT S., SERRA C. R., HENRIQUES A. O., SCHYNS G., 2010. Display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores, using a coat-associated enzyme as the carrier. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5926-5933.
- PRASHER D. C., ECKENRODE V. K., WARD W. W., PRENDERGAST F. G., CORMIER M. J., 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229-233.
- RAHIMIRAD N., KAVOOSI S., SHIRZAD H., SADEGHIZADEH M., 2019. Design and Application of A Bioluminescent Biosensor for Detection Of Toxicity Using Huh7-CMV-Luc Cell Line. *Iranian J. Pharmaceut. Res.* 18, 686-695.
- REMINGTON S. J., 2006. Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 714-721.
- RICHMOND M. L., GRAY J. I., STINE C. M., 1981. *Beta-galactosidase: review of recent research related to technological application, nutritional concerns, and immobilization.* *J. Dairy Sci.* 64, 1759-1771.
- ROSOCHACKI S. J., MATEJCZYK M., 2013. Geny reporterowe w badaniach genetycznych. Konferencja ChFPN Nauka-Ętyka-Wiara, www.chfpn.pl/new13/new13_rosochacki.pdf.
- SAHOO H., 2011. Förster resonance energy transfer – A spectroscopic nanoruler: principle and applications. *J. Photochem. Photobiol. C, Photochem. Rev.* 12, 20-30.
- SALIH A., LARKUM A., COX G., KUHL M., HOEGH-GULDBERG O., 2000. Fluorescent pigments in corals are photoprotective. *Nature* 408, 850-853.
- SAPSFORD K. E., PONS T., MEDINTZ I. L., MATTOUSI H., 2006. Biosensing with luminescent semiconductor quantum dots. *Sensors* 6, 925-953.
- SCHAUFLE F., DEMARCO I., DAY R. N., 2005. 4 - FRET imaging in the wide-field microscope. [W:] *Molecular Imaging.* PERIASAMY A., DAY R. N. (red.) American Physiological Society, Bethesda, 72-94.
- SELAN L., BERLUTTI F., PASSARIELLO C., THALLER M. C., RENZINI G., 1992. Reliability of a bioluminescence ATP Assay for detection of bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1739-1742.
- SHANER N. C., CAMPBELL R. E., STEINBACH P. A., GIEPMANS B. N., PALMER A. E., TSIEN R. Y., 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22, 1567-1572.
- SHANER N. C., STEINBACH P. A., TSIEN R. Y., 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* 2, 905-909.
- SHI J., ZHANG H., FANG L., XI Y., ZHOU Y., LUO R., WANG D., XIAO S., CHEN H., 2014. A novel firefly luciferase biosensor enhances the detection of apoptosis induced by ESAT-6 family proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 452, 1046-1053.
- SRISA-ART M., DE MELLO A. J., EDEL J. B., 2007. High-throughput DNA droplet assays using picoliter reactor volumes. *Analyt. Chem.* 79, 6682-6689.
- STRYER L., 1978. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Ann. Rev. Biochem.* 47, 819-846.
- SZASZ G., 1967. Comparison Between *p*-Nitrophenyl Glucuronide and Phenolphthalein Glucuronide as Substrates in the Assay of β -Glucuronidase. *Am. Assoc. Clin. Chemists* 13, 752-759.
- VEGA C., ROLON M., MARTINEZ-FERNANDEZ A. R., ESCARIO J. A., GOMEZ-BARRIO A., 2005. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing *beta-galactosidase*. *Parasitol. Res.* 95, 296-298.
- WACHTER R. M., 2007. Chromogenic cross-link formation in green fluorescent protein. *Accounts Chem. Res.* 40, doi: 10.1021/ar040086r.

- WALDO G. S., STANDISH B. M., BERENDZEN J., TERWILLIGER T. C., 1999. *Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein*. *Nat. Biotechnol.* 17, 691-695.
- WANG L., JACKSON W. C., STEINBACH P. A., TSIEN R. Y., 2004. *Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 16745-16749.
- WEIHS F., PEH A., DACRES H., 2020. *A red-shifted Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) biosensing system for rapid measurement of plasmin activity in human plasma*. *Analytica Chimica Acta* 1102, 99-108.
- WHITAKER J. R., 1972. *The glycoside hydrolases*. [W:] *Principles of enzymology for the food sciences*. WHITAKER J. R. (red.). Marcell Dekker, Inc., Nowy Jork, 60-70.
- WILSON K. J., GILLER K., JEFFERSON R. A., 1991. *β -Glucuronidase (GUS) operon fusions as a tool for studying plant-microbe interactions*. In *advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*. [W:] *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions Vol. 1. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. HENNECKE H., VERMA D. P. S. (red.). Kluwer Academic Press, Dordrecht, 226-229.
- ZIMMER M., 2002. *Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behaviour*. *Chem. Rev.* 102, 759-781.

KOSMOS Vol. 70, 1, 35–48, 2021

SZYMON POREBSKI, AGNIESZKA GRZELAK

Department of Molecular Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 141/143 Pomorska Str., 90-236 Łódź, E-mail: szymon.adam.benedykt.porebski@tutanota.com

A KEY TO RESEARCHING CELLULAR PROCESSES – REPORTER PROTEINS

Summary

The aim of this paper is to present commonly used reporter proteins. Important in the development of biological sciences is not only to understand these proteins as products of marker genes, but also as tools useful for highly specific analyzes. The concept of a reporter gene and protein was presented and defined, with emphasis on the necessary features that a reporter should present. Fluorescent reporter proteins are characterized, with an emphasis on the green fluorescent protein. Subclasses of photoactivatable, photoswitchable and photoconvertible reporter proteins are distinguished. Classic enzymatic reporters have been described: β -galactosidases and β -glucuronidases, along with their alternative substrates. Luciferases are presented with particular distinction due to the systematic affiliation of the species from which the enzyme comes. Readers were introduced to the basic applications of reporter proteins as specialized tools of molecular biology: in the FRET technique and as biosensors. The work strengthens the knowledge about the specific applications of given reporters and is the basis for further analysis of the topic in terms of a specific method or individual modifications of reporter techniques.

Key words: beta-galactosidase, beta-glucuronidase, biosensors, FRET, GFP, luciferase, reporter protein