



## Wykorzystanie markerów biologicznych w wykrywaniu związków toksycznych występujących w środowisku

Stanisław J. Rosochacki<sup>1,2</sup>, Marzena Matejczyk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biologii Sanitarnej i Biotechnologii, Politechnika Białostocka, Białystok

<sup>2</sup>Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt, Polska Akademia Nauk, Jastrzębiec

### The application of biological markers in the detection of environmental toxic compounds

#### Summary

A biomarker, or molecular marker, or reporter gene is defined as a DNA sequence introduced into organisms. It confers a distinct genotype or phenotype to enable monitoring in a given environment.

Molecular markers such as: *LacZ* ( $\beta$ -galactosidase), *xylE* (catechol 2,3-dioxygenase), *lux* (bacterial luciferase), *luc* (insect luciferase), *phoA* (alkaline phosphatase), *gusA* and *gusB* ( $\beta$ -glucuronidase), *gfp* (green fluorescent protein), *bla* ( $\beta$ -lactamase) and antibiotic or heavy metals resistance genes are widely used in genetically engineered (GEMs) microorganisms research. These genes are involved in the detection and enumeration of GEMs after their introduction into the environment. Molecular markers, especially *lux* and *gfp*, are widely used in the creation of whole-cell based biosensors which are commonly used for the examination of toxicity of environmental pollutants.

#### Adres do korespondencji

Stanisław J. Rosochacki,  
Katedra Biologii Sanitarnej  
i Biotechnologii,  
Politechnika Białostocka,  
ul. Wiejska 45 E,  
15-351 Białystok.

#### Key words:

reporter genes, *gfp* (green fluorescent protein), promoters, GEMs, biosensors, toxicity of environmental pollutants.

## 1. Wstęp

Wzrastający poziom zanieczyszczenia środowiska naturalnego zmusza do opracowania efektywnych metod pozwalających na szybkie, precyzyjne i mało kosztowne określenie lokalizacji, toksyczności i możliwości biodegradacji poszczególnych zanieczyszczeń.

Bardzo przydatne do tego celu okazały się drobnoustroje mające zdolność metabolizmu wielu substancji toksycznych dostających się do środowiska, takich jak: związki aromatyczne, węglowodory ropy naftowej, metale i inne. Ogromne możliwości stwarza inżynieria genetyczna, która stosując manipulacje genetyczne kreuje i udoskonala potencjał biodegradacyjny wielu szczepów środowiskowych oraz tworzy poprzez fuzję bakteryjnych promotorów degradacji określonych związków toksycznych z genami reporterowymi bardzo użyteczne systemy zwane biosensorami (1-4).

Bakteryjne biosensory znakowane biologicznymi markerami (najczęściej genami *lux* lub *gfp*) są wykorzystywane do wykrywania i określania ilości zanieczyszczeń w badanych próbach, analizowaniu ekologicznych powiązań między biodostępnością i toksycznością poszczególnych substancji chemicznych oraz stwierdzaniu potencjalnej toksyczności związków występujących w niebezpiecznych odpadach, ściekach, wodzie i glebie (5-7).

## 2. Markery genetyczne

Molekularne markery, markery genetyczne lub biomarkery definiowane są jako sekwencje DNA, które po wprowadzeniu do komórki pro- lub eukariotycznej powodują pojawienie się charakterystycznych cech fenotypowych dzięki którym możliwe jest monitorowanie tych organizmów po wprowadzeniu ich do środowiska (8-12).

Cebnie znanych jest kilka genów reporterowych powszechnie stosowanych w badaniach mikroorganizmów. Zaliczamy do nich m.in. geny: ( $\beta$ -galaktozydazy (*lacZ*), lucyferazy bakteryjnej (*lux*), monoooksygenazy (*tfd*), dioksygenazy 2,3-katecholu (*xylE*), białka zielonej fluorescencji (*gfp*; *green fluorescent protein*) oraz geny oporności na antybiotyki i metale (8-10,13,14).

Każdy gen reporterowy charakteryzuje się pewnymi cechami: nie powinien on wykazywać ekspresji w organizmie kontrolnym, ani mieć szkodliwego wpływu na metabolizm komórki, powinien wykazywać umiarkowaną stabilność *in vivo*, tak aby możliwa była regulacja ekspresji. Dodatkowo, produkt ekspresji genu powinien być łatwy do wykrycia i nie powinien powodować śmierci badanego organizmu (15).

Geny oporności na antybiotyki i metale ciężkie są najstarszymi i najczęściej stosowanymi biologicznymi markerami. Związane to jest m.in. z łatwością selekcji bakterii zawierających tego typu markery, zarówno tradycyjnymi metodami hodowlanymi na podłożach zawierających antybiotyki jak i za pomocą technik biologii molekularnej.



larnej. Istnieje niestety niebezpieczeństwo uwolnienia genów oporności do środowiska, szczególnie gdy geny te są kodowane na plazmidach (16).

Okazuje się jednak, że znacznym ograniczeniem w stosowaniu genów reporterowych kodujących enzymy (między innymi *lacZ*, *lux*, *xylE* i *tfd*), zwanych również markerami enzymatycznymi jest potrzeba zastosowania dodatkowych substratów i kosztownego sprzętu do wykrycia ich ekspresji (17,18). Ponadto często w celu wykrycia ekspresji większości markerów konieczne jest zniszczenie żywego materiału biologicznego.

Bardzo atrakcyjnymi markerami powszechnie wykorzystywanymi w testach toksyczności określonych związków są, jak się wydaje, geny *gfp* i *lux*, ponieważ produktem ich ekspresji jest łatwo wykrywana za pomocą światła UV autofluorescencja. Jedynie jednak GFP jest łatwo wykrywane za pomocą tylko światła UV, natomiast lucyferaza wymaga egzogenego substratu. Komórki znakowane tymi markerami można monitorować przyżyciowo.

Gen *lux* pochodzi z luminescencyjnych morskich bakterii *Vibrio fischeri* i *Vibrio harveyi*. Bakteryjna luminescencja jest wynikiem aktywności specyficznego enzymu lucyferazy wymagającego dodatkowych substratów (tlen, czynniki redukujące, aldehyd) jako kofaktorów reakcji, prowadzącej do wytworzenia luminescencji i do jej wykrycia potrzebny jest specjalny przyrząd, zwany luminometrem, często połączony z systemem wideo. Gen *lux* jest bardzo popularnym markerem wykorzystywanym w konstrukcji biosensorów.

Natomiast gen *gfp* został odkryty na początku lat sześćdziesiątych w organizmie meduzy *Aequorea victoria*, żyjącej w północno-zachodniej części Pacyfiku. 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, gdyż w przypadku braku tlenu białko jest nieaktywne. Białko będące produktem ekspresji genu *gfp* (GFP) w żywej komórce – pod wpływem wzbudzenia światłem UV – emituje zieloną fluorescencję, widoczną nawet nieuzbrojonym okiem (19-26).

### 3. Biomarkery biologiczne w konstrukcji biosensorów

Biosensory możemy zdefiniować jako pewne układy zbudowane z elementu pomiarowego, występującego w postaci materiału biologicznego reagującego na obecność w środowisku specyficzną substancję, tzw. analit, dzięki czemu można ją w nim wykryć, a jej ilość zmierzyć. Biosensor jest zintegrowanym systemem trzech elementów: biologicznego systemu rozpoznawania, często nazywanego bioreceptorem, z elementu przetwarzającego oraz elektronicznego (27,28). Takie połączenie elementów biologicznych i elektronicznych umożliwia bardzo czule i precyzyjne wykrywanie minimalnych ilości określonych substancji mających właściwości mutagenne lub kancerogenne. Większość form bioreceptorów używanych w konstrukcji

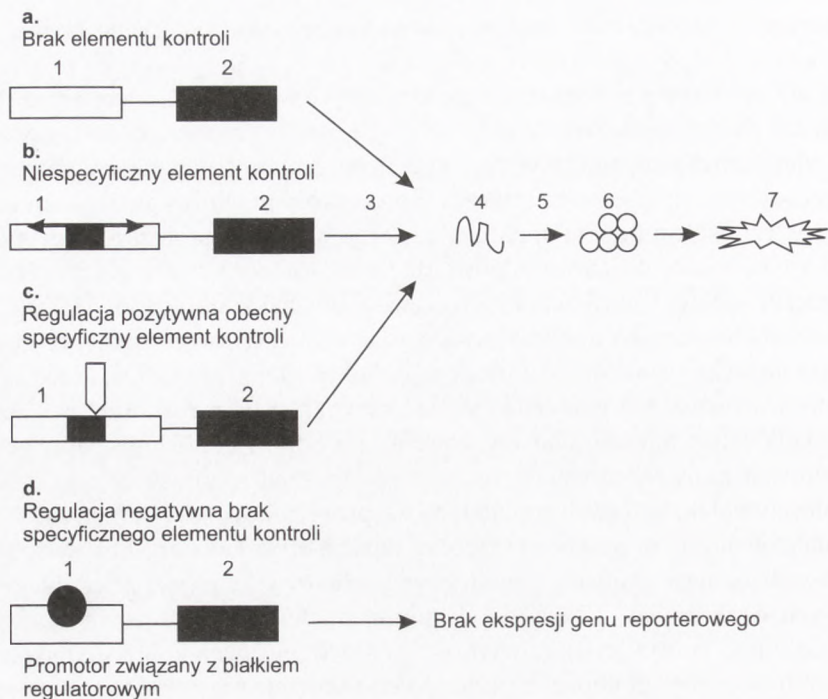


biosensorów to przeciwciała, enzymy, kwasy nukleinowe, białka nie będące enzymami oraz całe układy komórek, tkanek i organizmów (15). Urządzenia te, charakteryzujące się ogromnym zróżnicowaniem kształtów i wielkości służą również do monitorowania zmian warunków środowiskowych, ustalania poziomu pH, zawartości tlenu i wielu innych parametrów zarówno fizycznych jak i chemicznych.

Biosensor, niezależnie od charakteru bioreceptora powinien posiadać pewne cechy: specyficzność względem analitu, wysoką wrażliwość na analizowany związek i, co się z tym wiąże, ilościową odpowiedź (reakcję), która rejestrowana jest przez elektroniczny element biosensora i wyrażana w postaci konkretnych wielkości. Jednym z przykładów często wykorzystywanego w analizach biosensora jest konstrukcja oparta na wykrywaniu autofluorescencji emitowanej przez GEMs, które są zaangażowane w procesy bioremediacji. W tym przypadku bioreceptorem są genetycznie zmodyfikowane mikroorganizmy, zawierające odpowiednie konstrukty genowe, wyposażone w geny reporterowe, np. *lux* lub *gfp*. Emitowane światło pochodzi ze szczególnych białek, będących produktami ekspresji genów reporterowych. W obecności analizowanych za pomocą tego typu biosensorów substancji toksycznych zawartych w badanych próbach z wód powierzchniowych, gleby, ścieków, osadów ściekowych i rzecznych, a także wody pitnej dochodzi do zmian molekularnych w obrębie bioreceptora, czyli genetycznie zmodyfikowanych komórek bakterii, zawierających w swoim genomie określony gen reporterowy połączony z operonem degradacyjnym odpowiedzialnym za katabolizm chemikalii, takich jak toluen, naftalen lub metale ciężkie (29-31). W wyniku tego dochodzi do syntezy bakteryjnych enzymów uczestniczących w degradacji interesujących nas związków toksycznych. Równocześnie wskutek ekspresji genu reporterowego w komórce pojawia się konkretny produkt mający w przypadku użycia genów *lux* lub *gfp* charakter emisji promieniowania świetlnego, którego natężenie jest proporcjonalne do tempa metabolizmu analizowanej substancji przez organizm bakteryjny. Emitowane światło, będące produktem ekspresji biologicznego markera w określonych warunkach, jest specyficznym indykatorem toksyczności wielu substancji, których działanie zaburza aktywność metaboliczną bakterii i powoduje spadek natężenia wykrywanego światła (15,25,32,33).

Mikroorganizmy są zwykle bardziej tolerancyjne na zmianę warunków środowiska niż same białka lub enzymy, również podczas procesu analizy określonego związku toksycznego. Związane to jest z możliwością uruchomienia specyficznych komórkowych szlaków regulacyjnych, jakimi dysponują drobnoustroje, a które umożliwiają im adaptację do niekorzystnych warunków środowiska, np. wahania pH, temperatury lub obecności substancji toksycznych, również niektórych metali. Mikroorganizmy poprzez aktywny transport usuwają toksyczne metale z terenu komórki przez ścianę komórkową. Zabezpiecza to komórkę przed nadmierną akumulacją metali w jej wnętrzu. Wśród mikroorganizmów znana jest również umiejętność inaktywacji niektórych metali lub zewnątrzkomórkowe wiązanie metali i zablokowanie przedostawania się ich do wnętrza oraz ostatnia z możliwości to chemiczna mo-





Rys. 1. Reakcja promotora kierującego ekspresją określonego genu reporterowego na obecność analitu w badanej próbce (32); 1 – promotor, 2 – gen reporterowy, 3 – transkrypcja, 4 – mRNA, 5 – translacja, 6 – produkt ekspresji genu reporterowego, 7 – sygnał świetlny o określonym natężeniu.

dyfikacja metali do form o obniżonej toksyczności. Ponadto utrzymanie hodowli bakteryjnej jest łatwiejsze i tańsze niż izolacja oraz koszty związane z wykorzystaniem enzymów lub innych białek. Dodatkowo bakterie charakteryzują się wysokim tempem wzrostu, co wiąże się również z możliwością szybkiej odnowy hodowli (25,32).

Wymienione cechy zadecydowały o tym, że zmodyfikowane genetycznie komórki drobnoustrojów, zawierające geny reporterowe są coraz chętniej używane jako bioreceptory biosensorów stosowanych w analizie związków organicznych i nieorganicznych.

Promotor koordynujący pracę określonego genu reporterowego i decydujący o ekspresji tego genu, może w różny sposób reagować na obecność testowanego związku chemicznego (analitu) (rys. 1a-d).

W pierwszym przypadku (rys. 1a) ekspresja genu reporterowego jest regulowana przez konstytutywny promotor znajdujący się pod bezpośrednim wpływem białka reporterowego, będącego produktem ekspresji genu reporterowego. Wówczas gdy komórka jest wystawiona na działanie substancji toksycznej to następuje redukcja sygnału (zahamowanie syntezy białka reporterowego) w skutek śmierci lub inhibicji

metabolizmu komórkowego. Ten typ reakcji nie jest specyficzny do wykrywania konkretnego typu lub klasy związków toksycznych, lecz jest przydatny w określaniu ogólnej toksyczności badanych prób względem żywej komórki. W drugim przypadku (rys. 1b) gen reporterowy jest pod kontrolą promotora niespecyficznie reagującego na potencjalnie szkodliwe warunki środowiska. Pojawienie się związku toksycznego uruchamia całą kaskadę reakcji prowadzących do ekspresji genu reporterowego i emisji pozytywnego, komórkowego sygnału. Ekspresja genów dwóch omówionych konstruktów bioreceptorów znajduje się pod kontrolą niespecyficznych związków chemicznych, natomiast w układzie trzecim (rys. 1c, 1d) promotor, który koordynuje ekspresją genu reporterowego reaguje tylko z bardzo specyficznymi związkami chemicznymi. Promotor może być regulowany przez białko regulatorowe w sposób pozytywny lub negatywny. W przypadku pozytywnej regulacji (rys. 1c) połączenie analitu z białkiem regulatorowym promuje odblokowanie promotora i indukcję transkrypcji genu reporterowego. Natomiast gdy nie ma w badanej próbce specyficznej substancji toksycznej, następuje całkowita inhibicja przez białko regulatorowe promotora i brak transkrypcji genu markerowego. Uwolnienie białek represorowych z obszaru promotora następuje tylko w momencie związania represora ze specyficznym analitem, co prowadzi do rozpoczęcia transkrypcji genu reporterowego (25,27,32).

Obecnie znanych jest wiele biosensorów zawierających w swojej budowie bioreceptory bakteryjne, dominują jednak bioreceptory z markerami *lux* oraz *gfp*. Znajdują one szczególnie szerokie zastosowanie do wykrywania wielu substancji toksycznych, zarówno organicznych jak i nieorganicznych, a wśród nich wielu metali (aluminium, niklu, kadmu, arsenu, rtęci, miedzi) w środowisku (7,25,27,32,34).

Dotychczas na bazie bakterii *V. fischeri* opracowano bakteryjne testy toksyczności (Microtox), mutagenności oraz rakotwórczości (Mutatox). W tego typu biosensorach bioreceptory, będące komórkami mikroorganizmów, wyposażono w odpowiednie geny reporterowe wraz z promotorami reagującymi na uszkodzenia DNA, będące efektem ekspozycji materiału genetycznego na genotoksyczny związek (7,25). Do tego typu testów zaliczamy również bardzo czuły i szybki test VITOTOX umożliwiający pomiar kinetyki systemu reperacji SOS bakterii w zależności od genotoksyczności związku chemicznego (17).

W pracy Kostrzyńskiej i in. (7) stosując transkrypcyjną fuzję między indukowanym przez uszkodzenia DNA *recA* promotorem a dzikim typem genu *gfp* oraz jego zmutowaną formą, wykazującą bardziej intensywną fluorescencję (*gfp-mut3*) skonstruowano fluorescencyjny biosensor. Tak spreparowane plazmidowe DNA z genem *gfp* i promotorem *recA* wprowadzono drogą elektroporacji do komórek *E. coli* C600, których użyto do testu genotoksyczności mitomycyny, formaldehydu, N-metyl-N-nitro-nitrozoguanidyny oraz kwasu nalidyksowego. Zaobserwowano, że *E. coli* z konstruktem genowym ze zmutowaną, o intensywniejszej fluorescencji wersją genu *gfp* wykazuje silniejszą reakcję na analizowane związki niż *E. coli* z dzikim typem genu *gfp*. W obu typach komórek *E. coli* efektem ekspresji genu *gfp* będącego pod promo-



torem *recA* była emisja zielonej fluorescencji o zwiększonej intensywności w przypadku *gfp-mut3*. Stwierdzono, że *recA-gfp-mut3* biosensor jest potencjalnie użyteczny w wykrywaniu badanych genotoksyn (7).

Do konstrukcji bakteryjnych biosensorów dotychczas użyto kilka genów reporterowych wraz z odpowiednimi promotorami. Niektóre z tego rodzaju konstruktów przedstawiono w tabeli.

Tabela

Niektóre z bakteryjnych biosensorów stosowanych w wykrywaniu określonych związków chemicznych w badanych próbach (7,8,25,27).

Analityt	Promotor	Gen reporterowy	Mikroorganizm
<b>Nieorganiczne związki chemiczne</b>			
aluminium	<i>fli C (E. coli)</i>	<i>lux AB (V. harveyi)</i>	<i>E. coli</i>
kadm	<i>cad A (S. aureus)</i>	<i>lux AB (V. harveyi)</i>	<i>E. coli, S. aureus</i>
żelazo	<i>pup A (P. putida)</i>	<i>lux CDABE (V. harveyi)</i>	<i>P. putida</i>
rtęć	<i>mer (Tn21)</i>	<i>lux AB (V. harveyi)</i>	<i>E. coli</i>
cynek	<i>smt A (Synechococcus PCC7942)</i>	<i>lux CDABE (V. fischeri)</i>	<i>Synechococcus PCC7942</i>
metale (Hg, Cu, Ni, Zn, Cr)	<i>promotory genów metalooporności</i>	<i>lux CDABE (V. fischeri)</i>	<i>E. coli</i>
<b>Organiczne związki chemiczne</b>			
naftalen	<i>nab G (P. fluorescens)</i>	<i>lux CDABE (V. harveyi)</i>	<i>P. fluorescens</i>
toluen		<i>xyIR-lux CDABE</i>	<i>P. putida</i>
mitomycyna, formaldehyd, N-metylnitrozoguanidyna, kwas naldykowski	<i>rec A</i>	<i>gfp i gfp (mut3) (Aquorea victoria)</i>	<i>E. coli</i>

#### 4. Podsumowanie

Ciągła kumulacja szkodliwych substancji w środowisku naturalnym zmusza do odkrywania jak najbardziej skutecznych, szybkich i tanich metod wykrywania i degradacji groźnych związków toksycznych, często będących mutagenami lub kancerogenami.

Bardzo racjonalnym rozwiązaniem, jak się wydaje, jest wykorzystanie naturalnego potencjału metabolicznego genetycznie zmodyfikowanych mikroorganizmów wyposażonych w określone geny reporterowe, które są bardzo przydatnym narzędziem badawczym w określaniu toksyczności zanieczyszczeń występujących w środowisku.

#### Literatura

1. Bloemberg G., O'Tolle G. A., Lugtenberg B. J. J., Kolter R., (1997), Appl. Environ. Microbiol., 63, 4543-4551.
2. Cassidy M. B., Leung K. T., Trevors J. T., (1999), J. Microb. Meth., 40, 135-145.

3. Cho J., Kim S., (1999), *J. Microb. Meth.*, 36, 227-235.
4. Tresse O., Errampalli D., Kostrzyńska M., Leung T. K., Lee H., Trevors J. T., Dirk J., (1998), *FEMS Microbiol. Let.*, 164, 187-193.
5. Aizawa M., Yanagida Y., Haruyama T., Kobatake E., (1998), *Sensors and Actuat.*, B 52, 204-211.
6. Keane A., Phoenix P., Ghosal S., Lau P. C. K., (2002), *Journal of Microb. Meth.*, 49, 103-119.
7. Kostrzyńska M., Leung K. T., Lee H., Trevors J. T., (2002), *J. Microb. Meth.*, 48, 43-51.
8. Errampalli D., Leung M. B., Cassidy M., Kostrzyńska M., Blears H., Lee J., Trevors J., (1999), *J. Microb. Meth.*, 35, 187-199.
9. Jansson K. J., Bjorklof K., Elvang A. M., Jorgensen K. S., (2000), *Environ. Pollut.*, 107, 217-223.
10. Kohler S., Shimshon B., Schmid R. D., (1999), *Fresen. J. Anal. Chem.*, 366, 769-779.
11. Kuchma S. L., O'Tolle G., (2000), *Cur. Opin. Biotechnol.*, 11, 429-433.
12. Moller S., Sternberg C., Andersen J. B., Christensen B., Ramos J. L., Givoskov M., Molin S., (1997), *Appl. Env. Micr.*, 64, 721-732.
13. Kozdrój J., (1996), *Post. Mikrob.*, 1, 45-67.
14. Kozdrój J., (1997), *Post. Mikrob.*, 4, 339-350.
15. Vo-Dinh T., Cullum B., (1999), *Fresen. J. Anal. Chem.*, 366, 540-551.
16. Prosser J. I., (1994), *Microbiology*, 140, 5-17.
17. Kozdrój J., (1998), *Post. Mikrob.*, 3, 349-367.
18. Suarez A., Guttler A., Stratz M., Staendner L. H., Timmis S., Guzman C. A., (1997), *Gene*, 196, 69-74.
19. Cubit B. A., Heim R., Adams R. S., Boyd A. E., Gross L. A., Tsien R. Y., (1995), *TIBS*, 20, 448-455.
20. Helms V., Staatsma J. A., McCammon H., (1999), *J. Physic. Chem. B.*, 103, 3263-3269.
21. Kendal J. M., Badminton M. N., (1998), *TIBTECH*, 16, 216-224.
22. Left L. G., Left A. A., (1996), *Appl. Env. Micr.*, 62, 3486-3488.
23. Prasher D. C., (1995), *Trends in Genet.*, 11, 320-323.
24. Rosochacki S. J., Matejczyk M., (2001), *Zesz. Nauk. PB, Inżynier. Środ.*, 14, 114-120.
25. Selifonova O., Burlage R., Barkay T., (1993), *Appl. Environ. Microb.*, 59, 3083-3090.
26. Tombolini R., Unge A., Davey M. E., de Bruijn F. J., Jansson J. K., (1996), *FEMS Microb. Ecol.*, 22, 17-28.
27. Steinberg S. M., Poziomek E. J., Engelmann W. H., Rogers L., (1995), *Chemosphere*, 30, 2155-2197.
28. Walters M., Robinson J., (1997), *TIBTECH*, 15, 280-282.
29. Burlage R. S., Yang Z. Y., Mehlhorn T., (1996), *Gene*, 173, 53-58.
30. de Beer D., Muyzer G., (1995), *Water Scien. Tech.*, 32, 269-270.
31. Eberl L., Schulze R., Ammendola A., Geisenberger O., Erhart R., Sternberg C., Molin R., Amann L., (1997), *FEMS Microb. Let.*, 149, 77-83.
32. Ramanathan S., Ensor M., Daunert S., (1997), *TIBTECH*, 15, 500-506.
33. Stretton S., Techkarnjanaruk S., (1998), *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2554-2559.
34. Errampalli D., Okamura H., Lee H., Trevors J. T., van Elsland J. D., (1998), *FEMS Microbiol. Ecol.*, 26, 181-191.