



# Ekotoxikologické biotesty

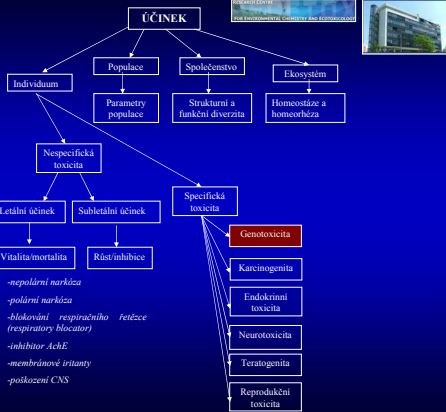
Část

## TESTY GENOTOXICITY A MUTAGENITY

Přednášející: **RNDr. Pavel Čupr, Ph.D.**

### GENOTOXICITA

- toxicita pro genom
- genotoxické faktory jsou schopny interagovat s DNA za vzniku reverzibilních i ireverzibilních změn
- poškození genomu může následně vést k mutagenezi, karcinogenezi, indukci fágů, buňččné smrti, chromozomálním aberacím a dalším neméně závažným důsledkům



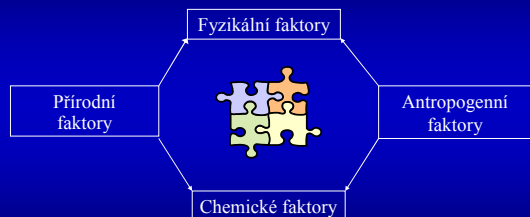
### MUTACE

- za mutaci je považována jakákoliv změna v genetické informaci buněk, která není výsledkem rekombinace či segregace při dělení buněk, a je přenášena do dalších generací buněk či jedinců.
- proces vzniku mutací je označován jako mutageneze.
- mutace lze kategorizovat dle různých aspektů (viz dále).

### MUTAGENEZE

- několikafázový proces.
- genotoxická látka s mutagenními účinky po vstupu do organismu a na základě své toxikokinetiky proniká v původní či změněné podobě do buňky (fáze 1).
- následně dochází k interakci s DNA v genomu, jejichž podstatou je kovalentní vazba na molekulu DNA, interkalace mezi řetězce dvojšroubovice, interakce s mitotickými strukturami (fáze 2).
- mutace, tedy změna v genotypu, která není letální, může v určitém časovém horizontu vést k transkripci a realizaci změněné informace, která se následně promítá v podobě mutantního fenotypu (fáze 3).
- procesu mutageneze nemusí být dokončen v případě, že daný genotoxický zásah je pro danou buňku letální či mutace byla včasně opravena.

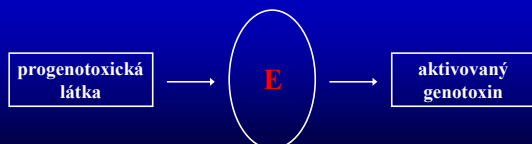
### GENOTOXICKÉ FAKTORY



## AKTIVACE PROGENOTOXINŮ I.

přímé mutageny – skupina látek, jež vykazuje své genotoxické účinky ve stávajícím stavu díky přítomnosti silně elektrofilní skupiny.

nepřímé mutageny – látky, jež za normálních podmínek nevykazují genotoxické účinky, ale v případě enzymatické přeměny získávají vhodnou molekulární strukturu, která umožňuje účinnou interakci s DNA.



## AKTIVACE PROGENOTOXINŮ

Nejčastěji využívaným provedením metabolické aktivace je příprava mikrosomální frakce (S9 frakce):

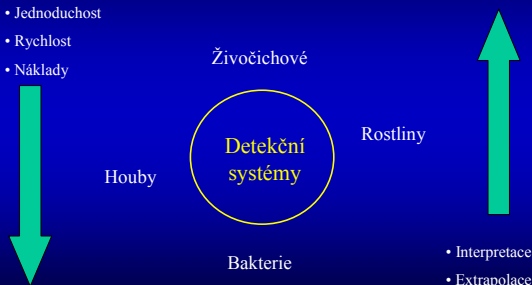
- jaterní mikrosomální frakce z potkanů či myši
- mikrosomální frakce z plic, ledvin či mozku potkanů a myši
- jaterní mikrosomální frakce lidských jater
- jaterní mikrosomální frakce z ryb
- rostlinná mikrosomální frakce

## PŘEHLED NEJPOUŽÍVANĚJŠÍCH TESTŮ GENOTOXICITY A MUTAGENITY

### VYHODNOCOVÁNÍ, INTERPRETACE A EXTRAPOLACE VÝSLEDKŮ TESTŮ

## DETEKČNÍ SYSTÉMY GENOTOXICKÝCH ÚČINKŮ

- Jednoduchost
- Rychlost
- Náklady



## PRINCIP BAKTERIÁLNÍCH TESTŮ GENOTOXICITY

Tři principiálně odlišné modely pro detekci genotoxických faktorů:

- model 1: DNA léze vede ke změně smyslu informace  
V důsledku indukce reverzní mutace dochází k obnově určité vlastnosti buněk testovacího kmene, která je následně sledována.

- model 2: DNA léze indukuje SOS odpověď zahrnující SOS mutagenézi

V důsledku indukce poškození DNA je spuštěn systém SOS odpovědi, která je determinována skupinou SOS genů, jejichž aktivace je následně sledována na základě přepisu vhodného reportérového genu (specifický fúzní gen *SOS gen::reportérový gen*).

- model 3: DNA léze vede ke smrti buněk  
Důsledkem poškození DNA u kmenů buněk, které nejsou schopné opravovat vzniklá poškození, je buněčná smrt.

## PŘEHLED BAKTERIÁLNÍCH TESTŮ GENOTOXICITY

- model 1:
  - Amesův test – vznik histidin-prototrofních CFU (Ames et al., 1975)
  - Ara-test – vznik L-arabinóza-rezistentních CFU (Englesberg et al., 1962)
  - Ampicilinový test – vznik ampicilin-rezistentních CFU (Lee et al., 1994)
  - Reverzní test na E. coli – vznik tryptofan-rezistentních CFU (Bridges, 1972)
  - Mutatox – obnovení bioluminiscence buněk (Johnson, 1992)
  - GFP test – obnovená schopnost produkce GFP (Cariello et al., 1998)
- model 2:
  - SOS chromotest – indukce přepisu *sulA::lac-Z* (Quillardet et al., 1982)
  - UmuC test – indukce přepisu *umuC::lac-Z* (Oda et al., 1985)
  - SulA test – indukce přepisu *sulA::lac-Z* (El Mzibri, 1996)
  - RecA test – indukce přepisu *recA::luxCDABE* (Min et al., 1999)
  - Vitotox – indukce přepisu *recN::luxCDABE* (Van der Leije et al., 1997)
  - Lux-fluoro test – indukce přepisu *recA::luxCDABE* (Baumstark-Khan et al., 2001)
- model 3:
  - Reparační test – pokles počtu CFU v důsledku poškození DNA (Green, 1977)

## AMESŮV TEST I.

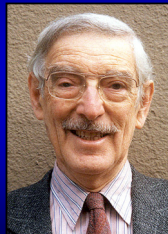
### Specifikace

- jednoduchý screeningový nástroj, který je nejčastěji používán a jako jediný všeobecně doporučován národními normami

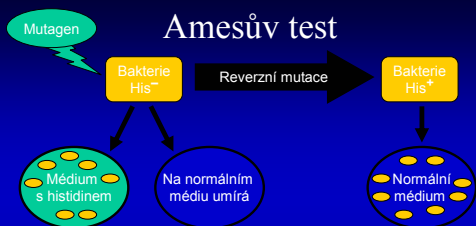
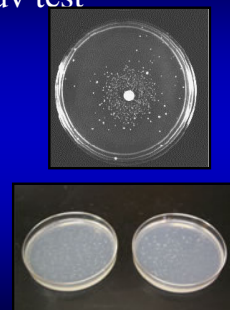
### Princip

- test je založen na indukci reverzních mutací v histidinovém lokusu v buňkách geneticky modifikovaného kmene *Salmonella typhimurium*
- reverzní mutace je spojena s přeměnou histidin-axotrofních buněk (His<sup>-</sup>) na histidin-prototrofní (His<sup>+</sup>)
- histidin-prototrofní buňky jsou následně schopné růst v médiu bez přítomnosti aminokyseliny histidinu
- obnova růstu a metabolické aktivity je signálem genotoxických účinků testovaného vzorku

## Amesův test



Bruce Ames (nar. 1928)



- Umožňuje studium reverzních mutací u histidin – deficientních kmenů bakterie *Salmonella typhimurium*. Tyto auxotrofní mutanty přežívají pouze na médiu obsahujícím histidin.
- Působením mutagenu dojde u některých buněk k reverzní mutaci, která způsobí „opravu“ genu pro syntézu histidinu. Bakterie s touto mutací tak znovu získají schopnost tvorby histidinu a přežívají i na médiu, které histidin neobsahuje.

## Amesův test

**0** Negativní kontrola  
SPONTÁNNÍ REVERTANTI  
Proč lze i na negativní kontrole (tj. na misce bez jakéhokoliv mutagenu) pozorovat nárůst bakterií?

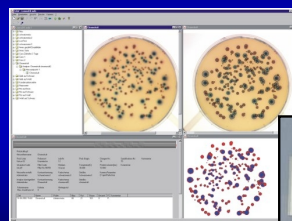
Miska s testovanou látkou  
GENOTOXICITA PROKÁZANA  
Interpretujte výsledek testu? Lze tímto výsledkem potvrdit genotoxicitu látky?

Pozitivní kontrola  
SLOUŽÍ KE KONTROLE PRŮBĚHU TESTU A PRO SROVNÁNÍ  
Vysvětlíte, jaký význam má pozitivní kontrola (tj. aplikace známého mutagenu)?

## Výsledek Amesova testu



## Amesův test – automatické odečtení výsledků



## AMESŮV TEST

### Flukтуаční verze Amesova testu – Mutachromoplate™ (EPBI)

Vyhodnocení: počet pozitivních jamek (žluté) X negativní kontrola.  
(statistické vyhodnocení – Poissonova distribuce).

Případně počítáme mutagenní aktivitu (M.A.).

## MUTATOX I.

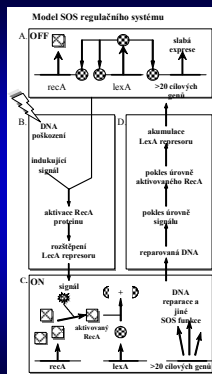
### Specifikace

- krátkodobý, velmi citlivý screeningový test založený opět na indukce reverzních mutací (model 1.)

### Princip

- test je opět založen na indukci reverzních mutací v důsledku iniciace substitucí, translokace, inhibice syntézy DNA nebo tvorby DNA aduktů genotoxickými látkami v *luxCDABE operonu* geneticky modifikované bakterie *Photobacterium phosphoreum* (*Vibrio fischeri*) M 169, která **není schopná luminovat (dark cells)**
- test probíhá v tekutém médiu !! v květech, či mikrodestičkách
- v důsledku reverzní mutace je obnovena schopnost luminescence buněk a na základě její kvantifikace je odhadován genotoxický potenciál testovaného vzorku

### testy modelu 2.



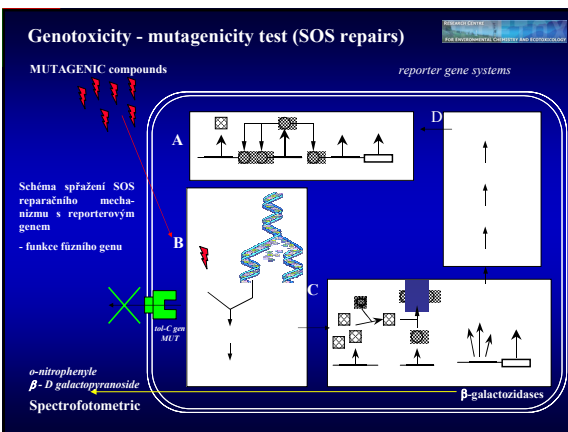
## SOS CHROMOTEST I.

### Specifikace

- jednoduchý, rychlý, screeningový nástroj s miniaturizovaným provedením založený na stejném principu jako umuC test

### Princip

- podstatou SOS chromotestu je indukce SOS odpovědi v důsledku poškození DNA genotoxickou látkou
- ze skupiny SOS genů (din genů) je tentokrát využíváno propojení *su1A* genu s reportérovým *lac-Z* genem
- cílenou genovou manipulací byl do kmene *Escherichia coli* PQ 37 vložen specifický fúzní gen *su1A::lac-Z*
- jako kontrola toxicity vzorku je kontinuálně bakterií syntetizována alkalická fosfatáza, jejíž pokles aktivity signalizuje inhibici buněk



## UMUC TEST I.

### Specifikace

- Jednoduchý, rychlý, screeningový nástroj s miniaturizovaným provedením a širokou specifičtostí k různým skupinám genotoxických faktorů, který je založený na indukci SOS odpovědi (model 2)

### Princip

- podstatou umuC testu je indukce SOS odpovědi v důsledku poškození DNA genotoxickou látkou
- ve skupině SOS genů (din genů) jsou obsaženy i geny *umuC* a *umuD*, jejichž přepis je zahrnut v komplexním procesu SOS odpovědi
- cílenou genovou manipulací byl do kmene *Salmonella typhimurium* TA 1535 vložen plazmid pSK1002 nesoucí specifický fúzní gen *umuC::lac-Z*

## UMUC TEST

- test bez metabolické aktivity: IF = 1,5
- test s metabolickou aktivací: IF = 2,0
- podmínkou pro správnost odhadu IF je skutečnost, že při testování dané látky (v určité koncentraci) nesmí být dosaženo více než 50 % inhibice růstu (G nesmí být menší než 0,5)

### Testovací biologický systém

*Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002

## UMUC TEST IX.

### MODIFIKACE KLASICKÉHO UMUC TESTU

#### A) Nové kmeny *Salmonella typhimurium*

NM1011 - zvýšená produkce nitrátreduktázy

NM 2009 - zvýšená produkce O, N-acetyltransferáz

NM 3009 - zvýšená produkce nitrátreduktázy a O, N-acetyltransferáz

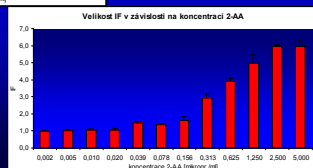
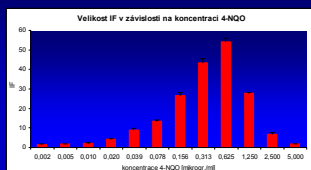
OY1001/1A2 - produkce CYP 1A2 a NADPH-P450 reduktázy

NM5004 - produkce kysího glutathionu-S-transferázy

NM6001 a NM6002 - produkce lidských NAT1 a NAT2

TA1535/pSK-luc - reportérovým genem je zde gen pro luciferázu

## UMUC TEST X.



## VITOTOX I.

### Specifikace

- Jednoduchý, rychlý, screeningový nástroj s miniaturizovaným provedením založený na stejném principu jako umuC test

### Princip

- podstatou Vitotoxu je opět indukce SOS odpovědi v důsledku poškození genomu testovacího kmene *Salmonella typhimurium*
- tentokrát je využíván geneticky manipulovaný kmen *Salmonella typhimurium*, jež obsahuje lux operon luxCDBAE izolovaný z *Vibrio fischeri* a opatřený recN promotorem podléhající regulaci ze strany *lexA* proteinu (tedy fúzní gen *recN:luxCDBAE*)
- reportérový operon je uložen v plazmidu pMOL1067 nebo pMOL1068

## recA TEST

### Specifikace

- Jednoduchý, rychlý, screeningový nástroj s miniaturizovaným provedením založený na stejném principu jako umuC test

### Princip

- podstatou RecA je opět indukce SOS odpovědi v důsledku poškození genomu testovacího kmene *Escherichia coli* **DPD2794**
- tentokrát je využíván geneticky manipulovaný kmen *Escherichia coli*, jež obsahuje fúzní gen **recA:luxCDABE**
- Fúzní gen je tvořen bezpromotorovým operonem **lux operon luxCDBAE** izolovaným z *Vibrio fischeri*, který byl opatřen promotorem *recA* genu podléhajícímu regulaci ze strany *lexA* proteinu
- reportérový operon je uložen v plazmidu

## RECA TEST

- v důsledku indukce SOS odpovědi probíhá reakce, v jejímž důsledku začnou buňky luminovat:



- paralelně probíhá testování toxicity, kdy je sledována inhibice růstu buněk během inkubace (600 nm)

## VÝVOJ V BAKTERÁLNÍCH TESTECH GENOTOXICITY

### AMESŮV TEST

- 4 základní kmeny (TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537)
- agarové plotny
- S9, + S9
- expozice 48 – 72 hodin
- počty CFU na misku

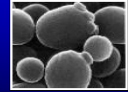
### NEVÝHODY

- několik kmenů
- vliv His ve vzorku
- design
- přídavek S9 frakce
- délka expozice
- toxicita nekontrolována
- vyhodnocování

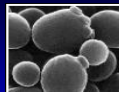
### VÝHODY

- standardizace (normy)
- vysoká citlivost
- dobrá srovnatelnost výsledků s testy na vyšších organismech
- nejpoužívanější test
- uznávaný test

## TESTY GENOTOXICITY NA KVASINKÁCH

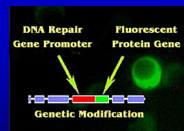


### ➤ RAD54 - GFP



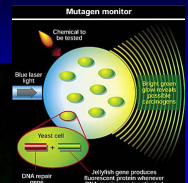
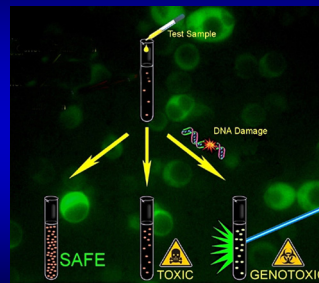
#### Geneticky modifikovaný kmen *Saccharomyces cerevisiae*

Kopie promotoru pro reparační gen umístěn před gen pro GFP protein vykazující fluorescenci



### ➤ RAD54 - GFP

#### Princip testu:



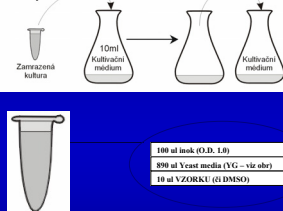
Po poškození DNA dojde ke spuštění reparačního procesu a tím i k produkci tohoto GFPproteinu, který je detekován měřením fluorescence

Paralelně sledování cytotoxicity měřením absorbance (A600)

### Optimalizovaný postup

*Saccharomyces cerevisiae*

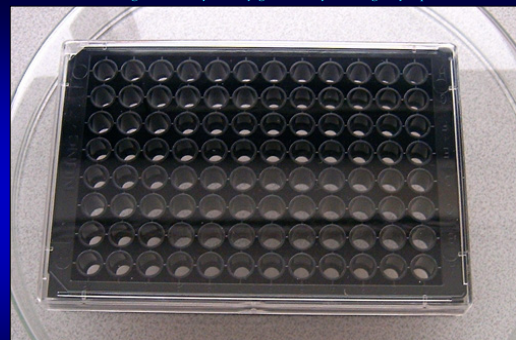
#### A. Příprava kultury



Resuspicejte asi 100 µl Eppendorf skleničky po 200 ul do 3 jarek (kapaliny)



Design založení testu v mikrodětičce (černá, s čířým dnem pro fluorimetrii)



Design založení testu v mikrodětičce (černá, s čířým dnem pro fluorimetrii)

Aplikovaný experimentální design

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	V <sub>01</sub> 1.0	V <sub>01</sub> 1.0	V <sub>01</sub> 1.0	V <sub>01</sub> 1.1	V <sub>01</sub> 1.1	V <sub>01</sub> 1.1	V <sub>01</sub> 1.2	V <sub>01</sub> 1.2	V <sub>01</sub> 1.2	V <sub>01</sub> 1.4	V <sub>01</sub> 1.4	V <sub>01</sub> 1.4
<b>B</b>	V <sub>02</sub> 1.0	V <sub>02</sub> 1.0	V <sub>02</sub> 1.0	V <sub>02</sub> 1.1	V <sub>02</sub> 1.1	V <sub>02</sub> 1.1	V <sub>02</sub> 1.2	V <sub>02</sub> 1.2	V <sub>02</sub> 1.2	V <sub>02</sub> 1.4	V <sub>02</sub> 1.4	V <sub>02</sub> 1.4
<b>C</b>	V <sub>03</sub> 1.0	V <sub>03</sub> 1.0	V <sub>03</sub> 1.0	V <sub>03</sub> 1.1	V <sub>03</sub> 1.1	V <sub>03</sub> 1.1	V <sub>03</sub> 1.2	V <sub>03</sub> 1.2	V <sub>03</sub> 1.2	V <sub>03</sub> 1.4	V <sub>03</sub> 1.4	V <sub>03</sub> 1.4
<b>D</b>	V <sub>04</sub> 1.0	V <sub>04</sub> 1.0	V <sub>04</sub> 1.0	V <sub>04</sub> 1.1	V <sub>04</sub> 1.1	V <sub>04</sub> 1.1	V <sub>04</sub> 1.2	V <sub>04</sub> 1.2	V <sub>04</sub> 1.2	V <sub>04</sub> 1.4	V <sub>04</sub> 1.4	V <sub>04</sub> 1.4
<b>E</b>	V <sub>05</sub> 1.0	V <sub>05</sub> 1.0	V <sub>05</sub> 1.0	V <sub>05</sub> 1.1	V <sub>05</sub> 1.1	V <sub>05</sub> 1.1	V <sub>05</sub> 1.2	V <sub>05</sub> 1.2	V <sub>05</sub> 1.2	V <sub>05</sub> 1.4	V <sub>05</sub> 1.4	V <sub>05</sub> 1.4
<b>F</b>	V <sub>06</sub> 1.0	V <sub>06</sub> 1.0	V <sub>06</sub> 1.0	V <sub>06</sub> 1.1	V <sub>06</sub> 1.1	V <sub>06</sub> 1.1	V <sub>06</sub> 1.2	V <sub>06</sub> 1.2	V <sub>06</sub> 1.2	V <sub>06</sub> 1.4	V <sub>06</sub> 1.4	V <sub>06</sub> 1.4
<b>G</b>	PK-1	PK-1	PK-1	PK-1	PK-1	PK-1	PK-2	PK-2	PK-2	PK-2	PK-2	PK-2
<b>H</b>	NK	NK	NK	NK	NK	NK	BL	BL	BL	BL	BL	BL