



RESEARCH CENTRE
FOR ENVIRONMENTAL CHEMISTRY AND ECOTOXICOLOGY



Ekotoxikologické biotesty

Část

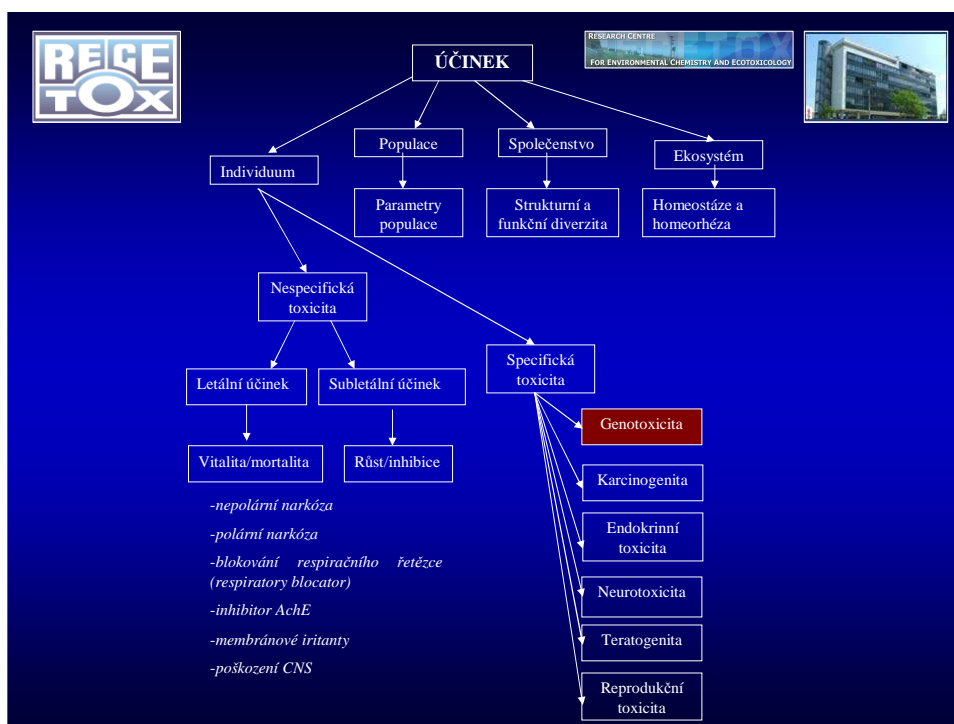
TESTY GENOTOXICITY A MUTAGENITY

Přednášející: *Pavel Čupr*

RECETOX – Ekotoxikologické biotesty – Testy genotoxicity a mutagenity – přednáška

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, buněčné smrti, chromozomálním aberacím a dalším neméně závažným důsledkům



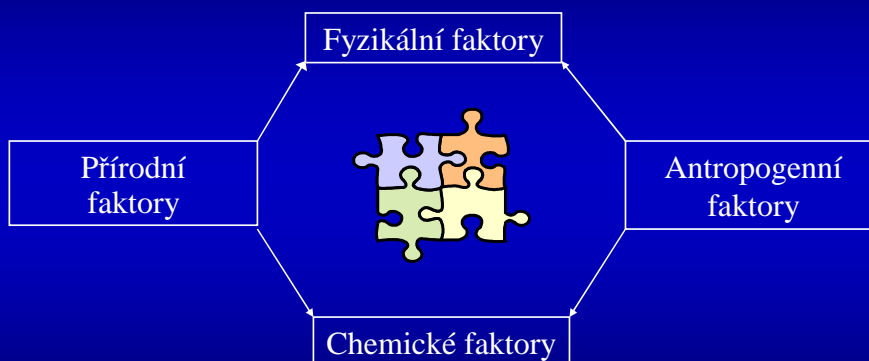
MUTACE

- 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 mutagenese nemusí být dokončen v případě, že daný genotoxický zásah je pro danou buňku letální či mutace byla včas opravena.

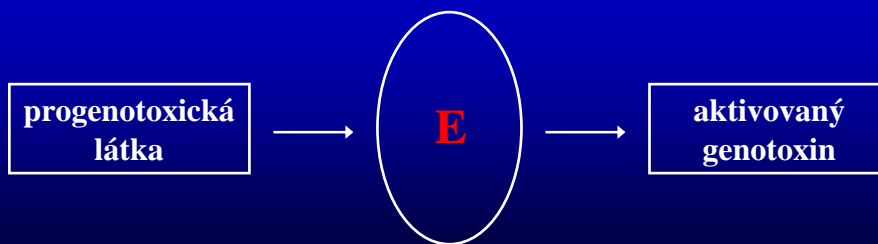
GENOTOXICKÉ FAKTORY



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):

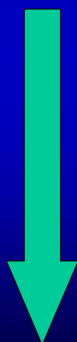
- játerní mikrosomální frakce z potkanů či myší
- mikrosomální frakce z plic, ledvin či mozku potkanů a myší
- játerní mikrosomální frakce lidských jater
- játerní mikrosomální frakce z ryb
- rostlinná mikrosomální frakce

PŘEHLED NEJPOUŽÍVANĚJŠÍCH TESTŮ GENOTOXICITY A MUTAGENITY

VYHODNOCOVÁNÍ, INTERPRETACE A EXTRAPOLACE VÝSLEDKŮ TESTŮ

DETEKČNÍ SYSTÉMY GENOTOXICKÝCH ÚČINKŮ

- Jednoduchost
- Rychlost
- Náklady



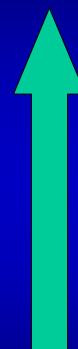
Houby

Živočichové



Rostliny

Bakterie



- Interpretace
- Extrapolace

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 mutagenezi**

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 buňky**

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)
 - Ampicilínový test – vznik ampicilín-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 přepise *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 Lelie 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.

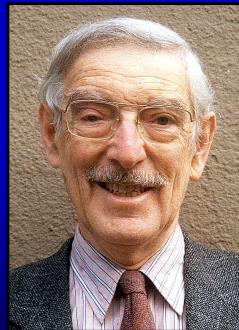
Specifikace

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

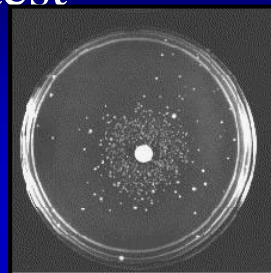
Princip

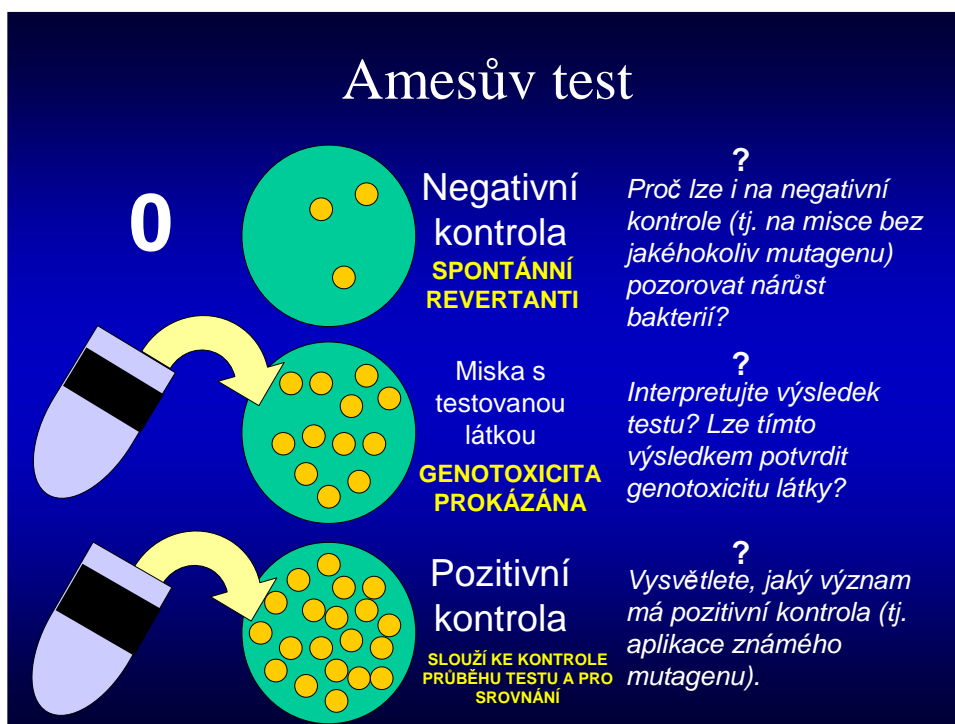
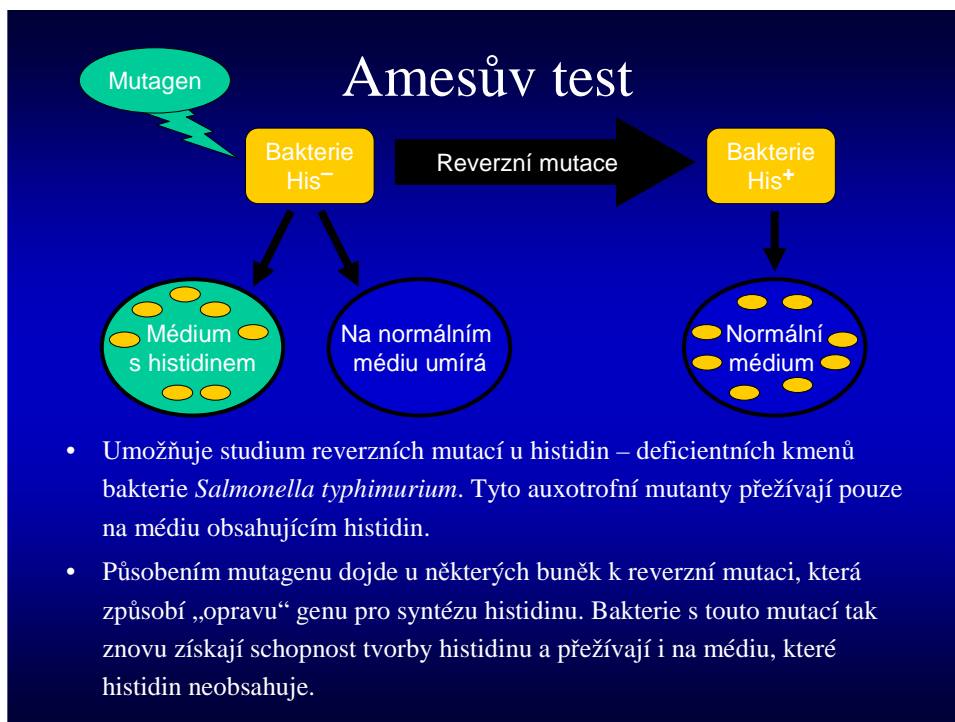
- test je založen na indukci reverzních mutací v histidinovém lokusu v buňkách geneticky modifikovaného kmene *Salmonella typhimurium*
- reverzní mutace je spojena s přeměnou histidin-auxotrofních buněk (His⁻) na histidin-prototrofní (His⁺)
- histidin-prototrofní buňky jsou následně schopné růst v médiu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

Amesův test



Bruce Ames (nar. 1928)

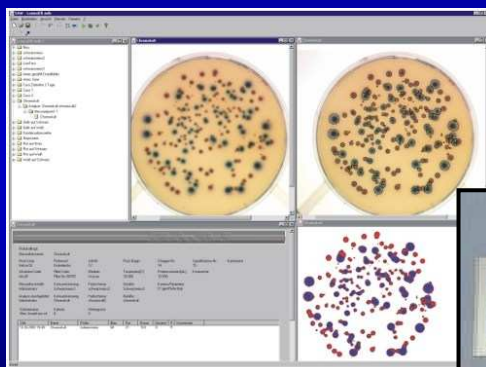




Výsledek Amesova testu



Amesův test – automatické odečtení výsledků



AMESŮV TEST

Fluktuační 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.

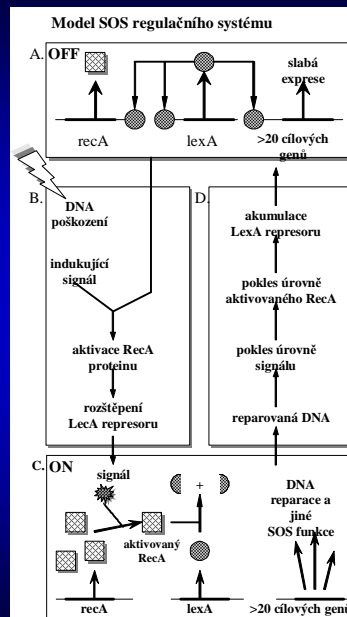
Specifikace

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

Princip

- test je opět založen na indukcii 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 kyvetách, či mikrodestičkách
- v důsledku reverzní mutace je obnovena schopnost luminiscence 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 ***sulA* genu s reportérovým *lac-Z* genem**
- cílenou genovou manipulací byl do **kmene *Escherichia coli* PQ 37 vloženo specifický fúzní gen *sulA::lac-Z***
- jako kontrola toxicity vzorku je kontinuálně bakterií **syntetizována alkalická fosfatáza, jejíž pokles aktivity signalizuje inhibici buněk**

Genotoxicity - mutagenicity test (SOS repairs)

RESEARCH CENTRE
FOR ENVIRONMENTAL CHEMISTRY AND ECOTOXICOLOGY

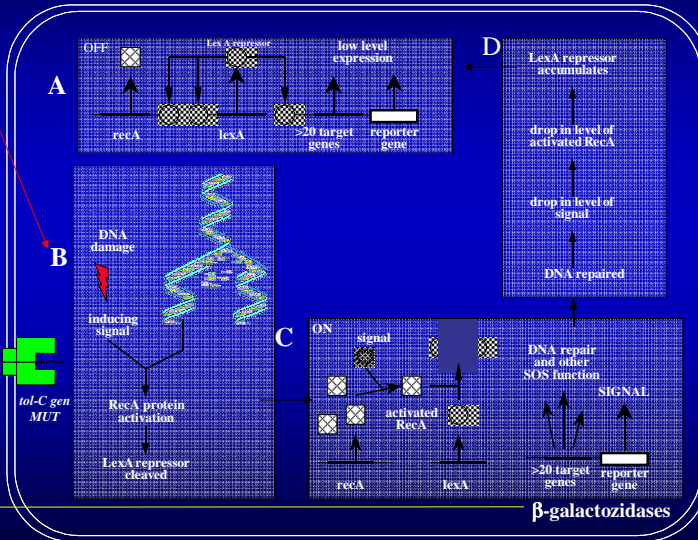
MUTAGENIC compounds

reporter gene systems

Schéma spřažení SOS
reparačního mecha-
nizmu s reporterovým
genem

- funkce fúzního genu

o-nitrophenyle
β-D galactopyranoside
Spectrofotometric



RECETOX – Ekotoxikologické biotesty – Testy genotoxicity a mutagenity – přednáška

UMUC TEST I.

Specifikace

- Jednoduchý, rychlý, screeningový nástroj s miniaturizovaným provedením a širokou specifitou 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 aktivace: 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

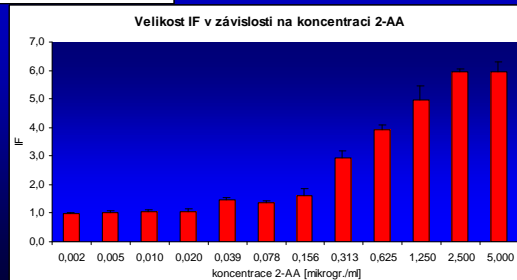
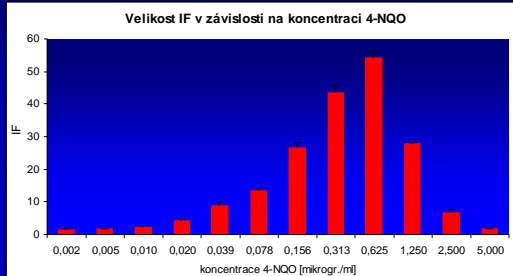
OY1001/1A2 - produkce CYP 1A2 a NADPH-P450 reductázy

NM5004 - produkce krysího 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 luxCDABE izolovaný z *Vibrio fischeri* a opatřený recN promotorem podléhající regulaci ze strany *lexA* proteinu (tedy řízní gen *recN:luxCDABE*)
- reportérový operon je uložen v plazmidu pMOL1067 nebo pMOL1068

recA TEST

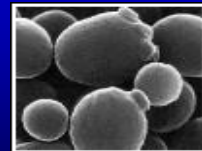
Specifikace

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

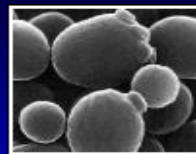
Princip

- 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 luxCDABE* izolovaným z *Vibrio fischeri*, který byl opatřen promotorem recA genu podléhajícímu regulaci ze strany *lexA* proteinu
- reportérový operon je uložen v plazmidu

TESTY GENOTOXICITY NA KVASINKÁCH

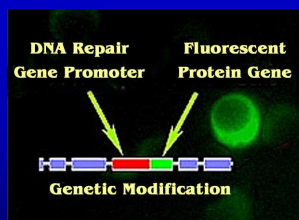


➤ RAD54 - GFP



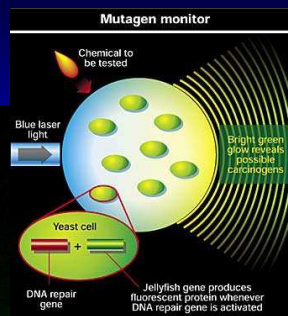
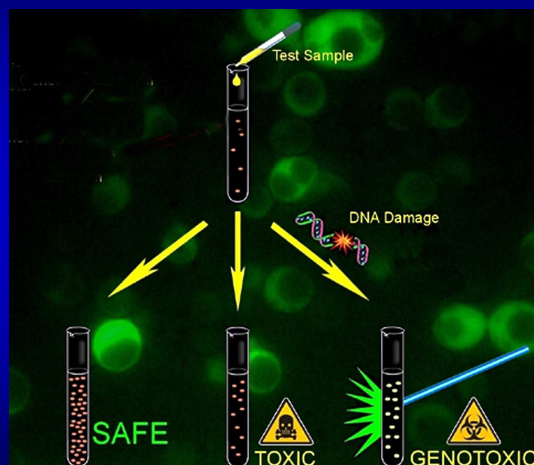
Geneticky modifikovaný kmen *Saccharomyces cerevisiae*

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



➤ RAD54 - GFP

Princip testu:



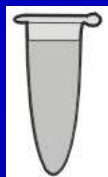
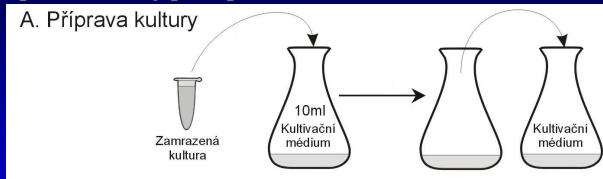
Po poškození DNA dojde ke spuštění reparačního procesu a tím i k produkci tohoto GFPproteinu, který je detekován měřením fluorescence

Paralelně sledování cytotoxicity měřením absorbance (A600)

Optimalizovaný postup

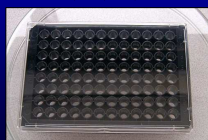
Úprava na O.D590 – 1.0

A. Příprava kultury



100 ul inok (O.D. 1.0)
890 ul Yeast media (YG – viz obr)
10 ul VZORKU (či DMSO)

Rozpipetování obsahu Eppendorf zkumavky po 200 ul do 3 jamek (opakování)



**Design založení testu v mikrodestičce (černá, s
čirým dnem pro fluorimetrii)**

RECETOX - Výzkumné centrum pro chemii životního prostředí a ekotoxikologii



**Design založení testu v mikrodestičce (černá, s
čirým dnem pro fluorimetrii)**

RECETOX - Výzkumné centrum pro chemii životního prostředí a ekotoxikologii



Aplikovaný experimentální design

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Vz1 1:0	Vz1 1:0	Vz1 1:0	Vz1 1:1	Vz1 1:1	Vz1 1:1	Vz1 1:2	Vz1 1:2	Vz1 1:2	Vz1 1:4	Vz1 1:4	Vz1 1:4
B	Vz2 1:0	Vz2 1:0	Vz2 1:0	Vz2 1:1	Vz2 1:1	Vz2 1:1	Vz2 1:2	Vz2 1:2	Vz2 1:2	Vz2 1:4	Vz2 1:4	Vz2 1:4
C	Vz3 1:0	Vz3 1:0	Vz3 1:0	Vz3 1:1	Vz3 1:1	Vz3 1:1	Vz3 1:2	Vz3 1:2	Vz3 1:2	Vz3 1:4	Vz3 1:4	Vz3 1:4
D	Vz4 1:0	Vz4 1:0	Vz4 1:0	Vz4 1:1	Vz4 1:1	Vz4 1:1	Vz4 1:2	Vz4 1:2	Vz4 1:2	Vz4 1:4	Vz4 1:4	Vz4 1:4
E	Vz5 1:0	Vz5 1:0	Vz5 1:0	Vz5 1:1	Vz5 1:1	Vz5 1:1	Vz5 1:2	Vz5 1:2	Vz5 1:2	Vz5 1:4	Vz5 1:4	Vz5 1:4
F	Vz6 1:0	Vz6 1:0	Vz6 1:0	Vz6 1:1	Vz6 1:1	Vz6 1:1	Vz6 1:2	Vz6 1:2	Vz6 1:2	Vz6 1:4	Vz6 1:4	Vz6 1:4
G	PK-1	PK-1	PK-1	PK-1	PK-1	PK-1	PK-2	PK-2	PK-2	PK-2	PK-2	PK-2
H	NK	NK	NK	NK	NK	NK	BL	BL	BL	BL	BL	BL