

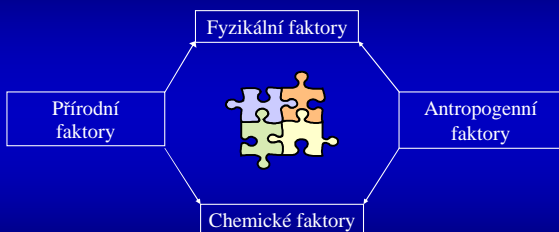
MUTACE

- 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 dvojitřroubovice, 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 včas opravena.

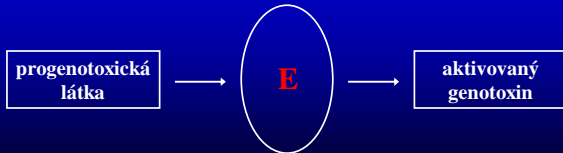
GENOTOXICKÉ FAKTORY



AKTIVACE PROGENOTOXINŮ I.

přímé mutageny – skupina látek, jež vykazují 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

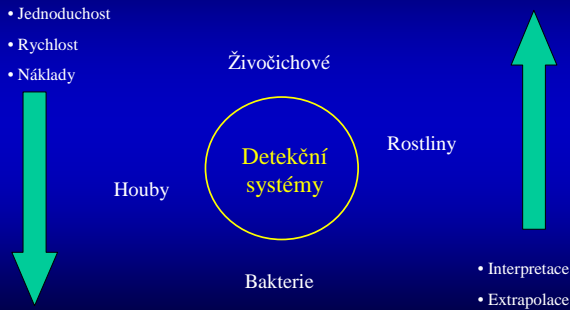
Nejčastěji využívaným provedením metabolické aktivace je příprava mikrosomální frakce (S9 frakce):

- **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



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 mutagenезi**
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)
 - **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 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

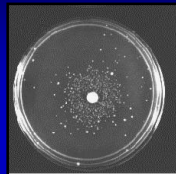
Princip

- test je založen na indukci reverzních mutací v histidinovém lokusu v buňkách geneticky modifikovaného kmene *Salmonella typhimurium*
- reverzní mutace je spojena s přeměnou histidin-axotrofních 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

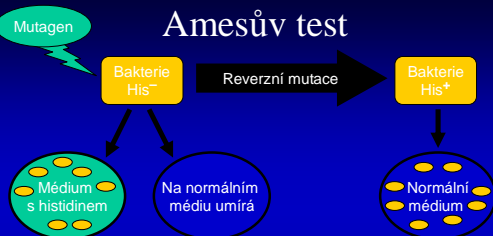
Amesův test



Bruce Ames (nar. 1928)



Amesův test



- 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 PROKÁZÁNA

Interpretujte výsledek testu? Lze tímto výsledkem potvrdit genotoxicitu látky?

Pozitivní kontrola

SLOUŽÍ KE KONTROLE PRŮBĚHU TESTU A PRO SROVNÁNÍ

Vysvětlete, jaký význam má pozitivní kontrola (tj. aplikace známého mutagenu).

Výsledek Amesova testu



Amesův test – automatické odečtení výsledků



The image displays a computer interface with two petri dish images and a data table. To the right is a piece of laboratory equipment labeled 'APOTON COUNTER' with a digital display showing '299'. Below it is a computer workstation with a monitor, keyboard, and mouse.

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.

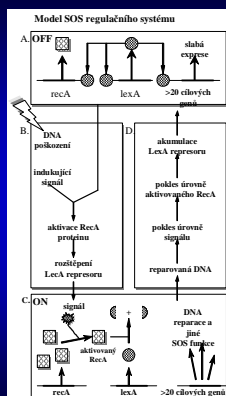
Specifikace

- 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.



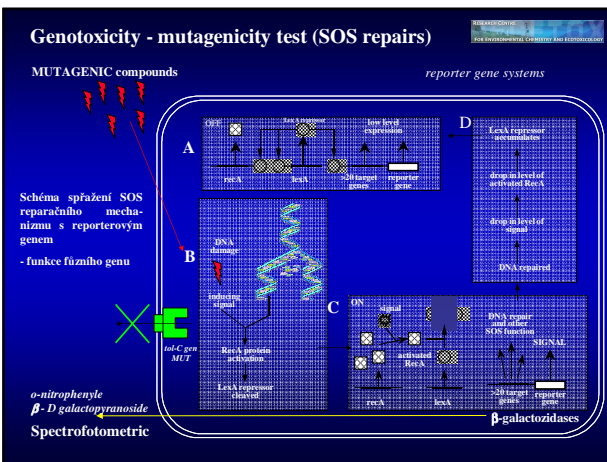
SOS CHROMOTEST I.

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 **sulA genu s reportérovým lac-Z genem**
- cílenou genovou manipulací byl do kmene **Escherichia coli PQ 37 vložen specifický fúzní gen sulA::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 specifitou k různým skupinám genotoxických faktorů, který je založený na indukcí 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

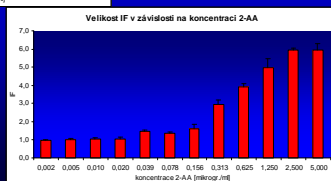
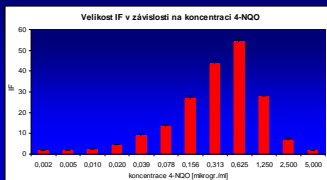
UMUC TEST IX.

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 reduktázy
- 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.



VITOTOXI.

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 fúzní gen *recN:luxCDABE*)
- reportérový operon je uložen v plazmidu pMOL1067 nebo pMOL1068

recA TEST

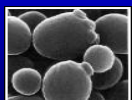
Specifikace

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

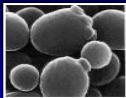
Princip

- 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 luxCDBAE* 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

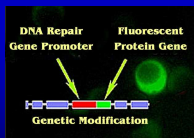


➤ RAD54 - GFP



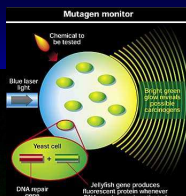
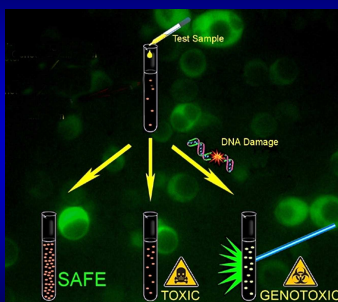
Geneticky modifikovaný kmen *Saccharomyces cerevisiae*

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



➤ RAD54 - GFP

Princip testu:



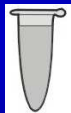
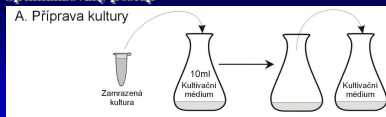
Po poškození DNA dojde ke spuštění reparačního procesu a tím i k produkci tohoto GFPproteinu, který je detekován měřením fluorescence

Paralelně sledování cytotoxicity měřením absorbance (A600)



Optimalizovaný postup

A. Příprava kultury



100 ul inok (O.D. 1.0)
800 ul Yeast media (YG - viz obr)
10 ul VZORKU (s DMSO)

Rozpřepjetování obsahu Eppendorf zkumavky po 200 ul do 3 jamek (opakovat)



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