

Praktické využití mutantů

.

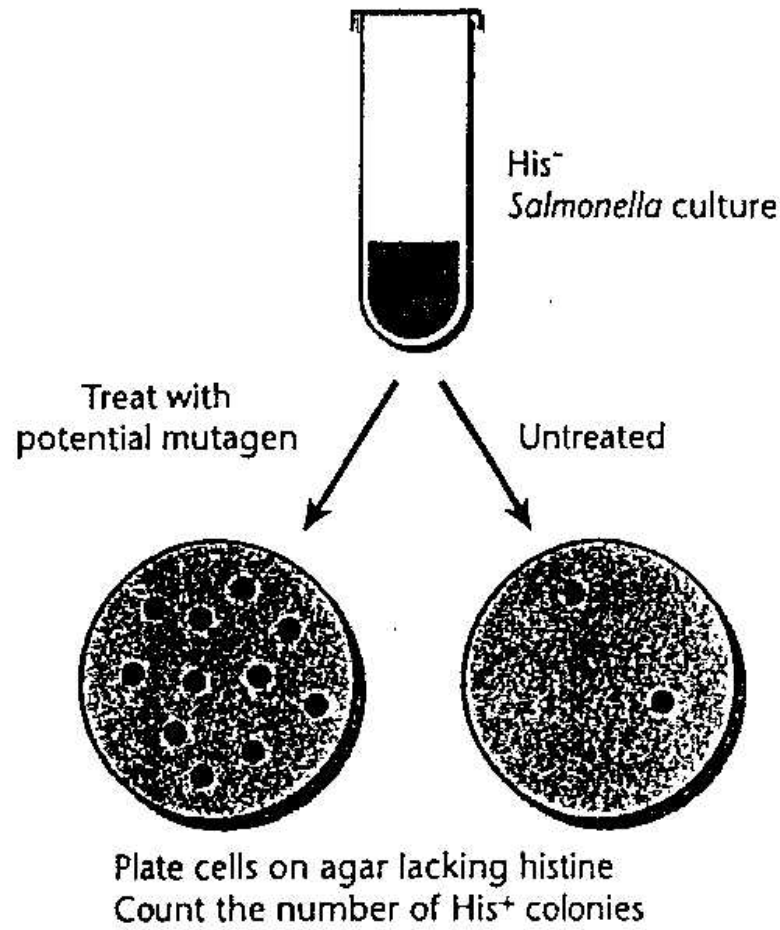
Amesův test

- Metoda pro detekci mutagenů
- Využívá auxotrofních mutantů *Salmonella typhimurium* LT2 neschopných biosyntetizovat histidin
- (*Salmonella enterica* sérovar Typhimurium)

Účinkem mutagenní látky

- Mutanty His- revertují na His+
- Revertanty jsou detekovány na mediu bez histidinu
- Dojde-li ke zvýšení počtu His+ revertantů, testovaná látka je mutagenní

Schéma Amesova testu (Snyder a spol. 1997)

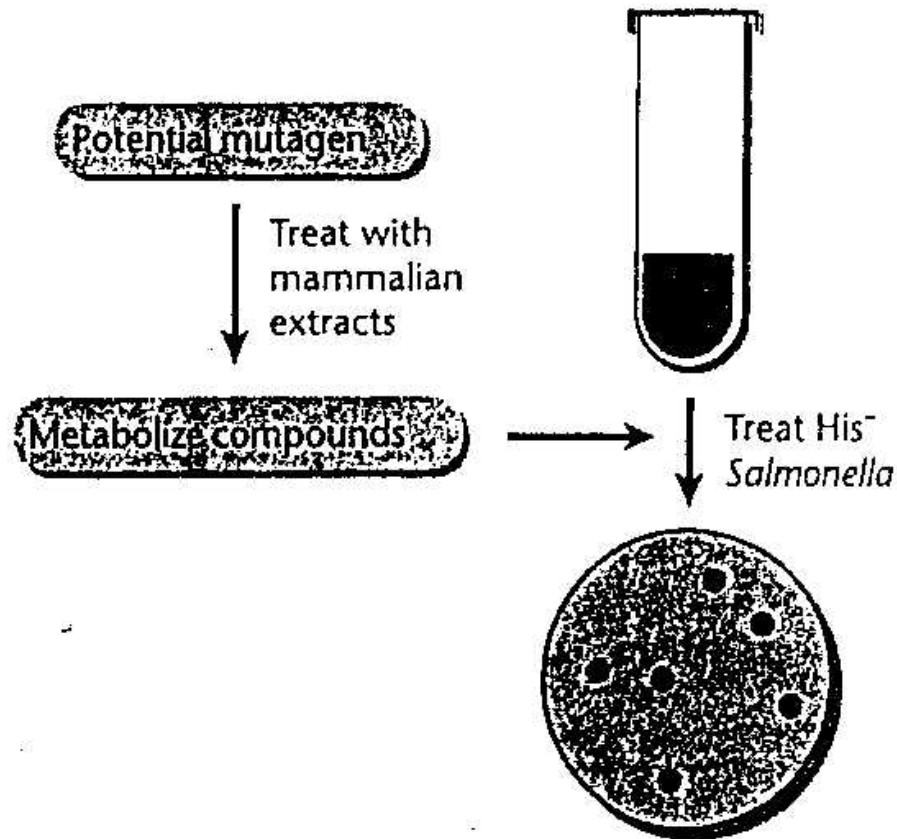


V některých případech

- testovaná látka musí být metabolizována, aby byla mutagenní
- Potenciální mutagen je nejprve inkubován s jaterním extraktem
- A potom je testován v Amesově testu

Metabolická aktivace promutagenu (Snyder a spol. 1997)

To determine if the test compound
must be metabolized to be mutagenic:



Promutagen, metabolická aktivace

- Promutagen je chemická látka, která se stává mutagenem vlivem metabolické aktivace v organismu
- Jako metabolická aktivace se označuje přeměna promutagenu v mutagen enzymovou činností organismu

Prokancerogen

- Mutageny s kancerogenním účinkem
- Prokancerogen je chemická látka, která se stává kancerogenní vlivem metabolické aktivace

V Amesově testu se využívá

- Větší počet kmenů
- Nesou různý typ mutací v histidinovém operonu, které umožňují detekovat působení různých mutagenů
- A další mutace

Kmeny základní testovací řady a kmeny doplňkové

- Základní: TA100, TA98, TA1538, TA1535, TA1537,
- Doplňkové: G46, TA492, TA494, TA97, TA102, TA1951, TA1977, TA1978
- Jsou určeny pro detekci mutagenů s různým typem účinku

Kmen TA100

- se využívá pro detekci mutagenů vyvolávajících bodové mutace
- nese *hisG46* mutaci v genu G,
- jež koduje první enzym histidinové dráhy
- reverze je indukována např. mitomycinem C

Kmeny TA98, TA1538

- pro detekci posunových mutagenů
- nesou *hisD3058* mutace v genu D,
- jež kóduje histidin dehydrogenázu,
- reverse vede k obnovení správného čtecího rámce
- je indukována např. 2-nitrofluorenem, daunomycinem

KmenTA102

- detekuje mutageny,
- které indukují vznik zkřížené vazby v DNA
- jako formaldehyd, mitomycin C a další

Kmeny nesou další mutace

- *rfa* ...změna buněčné stěny, zvyšuje se permeabilita buněčné stěny pro velké molekuly testované látky (deficience v povrchovém lipopolysacharidu buněčné stěny)
- *uvrB* ...delece genu pro excisní reparaci, zvyšuje se množství detekovaných revertantů

Doplňkový kmen TA102

- nenesí *uvrB* mutaci
- protože byl konstruován s cílem detekovat mutageny, jejichž účinek je opravován excisním reparačním systémem

Kmeny TA97, TA98, TA100, TA102

- Nesou R faktor
- tj. plasmid pKM101,
- který zvyšuje citlivost kmenů na mutageny
- plasmid nese geny *mucA* a *mucB* kódující proteiny MucA, MucB,
- které umožňují DNA polymeráze replikovat DNA, i když je poškozená

Význam testování mutagenních látek

- Látky, které vyvolávají mutace, mohou být kancerogenní
- Chemické látky, potravinářská aditiva aj. musí být testovány s ohledem na jejich kancerogenní potenciál (genotoxicitu)
- Genotoxické látky poškozují DNA a proto se k testování můžou použít i bakterie
- Testování na zvířecích modelech je drahé a časově náročné na rozdíl od bakterií
- A proto bývají používány až v dalších testech

SOS chromotest

- Další bakteriální test pro testování genotoxicity látek
- Je to test kvantitativní
- Využívá tzv. SOS reakce buněk *E.coli*

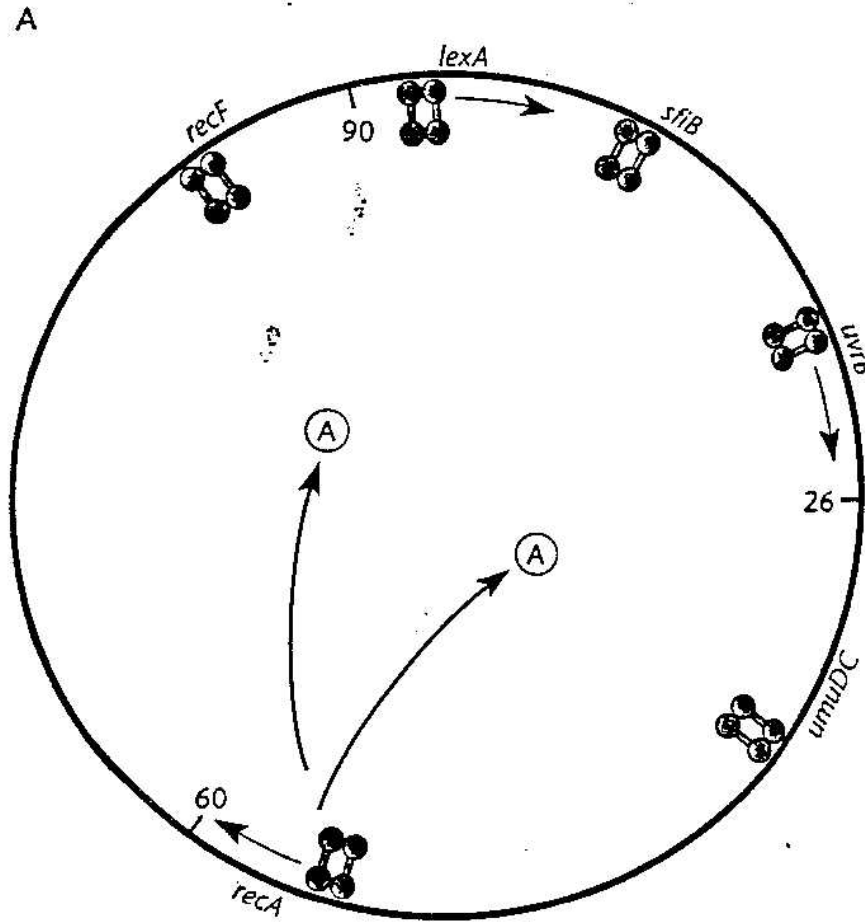
SOS reakce se aktivuje

- Když jsou buňky *E. coli* vystaveny látkám, které vyvolávají poškození DNA
- Je to složitý proces, který je řízen řadou genů

Princip SOS reakce

- Geny účastníci se SOS reakce jsou rozmístěny podél chromosomu *E. coli* a reprimovány LexA proteinem (LexA represor),
- takže nedochází k jejich expresi nebo jen k velmi nízké expresi

SOS reakce E. coli



Po poškození DNA genotoxickou látkou

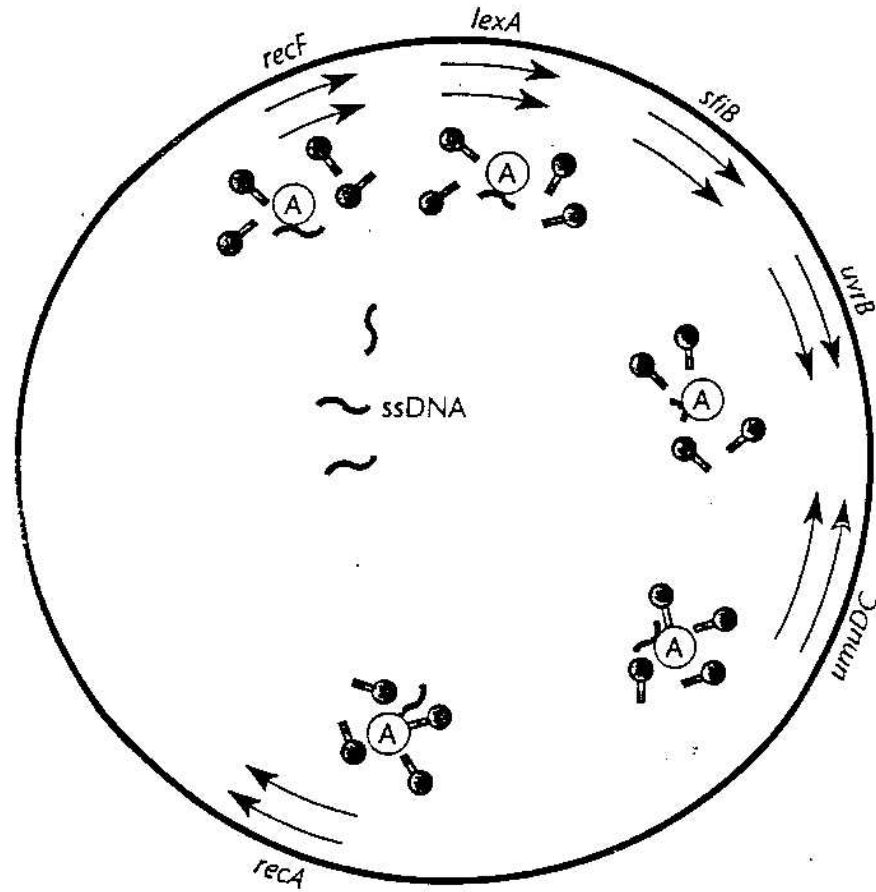
- se v buňkách hromadí ssDNA, která se váže k proteinu RecA a vazbou aktivuje jeho proteázovou aktivitu

Aktivovaný RecA protein

- indukuje rozštěpení LexA represoru
- uvolnění LexA represoru z promotorů SOS genů a
- k expresi těchto genů.
- Buňky se přestanou dělit a začne se reparovat DNA

SOS reakce E. coli

B



Pro SOS chromotest

- Byl zkonstruován kmen *E.coli* PQ37
- Kmen byl zkonstruován s využitím technik klasické genetiky

Kmen *E.coli* PQ37

- strukturální gen pro beta-galaktosidázu (*lacZ*) byl zfusován s genem *sfiA* (SOS gen)

Exprese a aktivita beta-galaktosidázy

- závisí na expresi *sfiA* genu,
- přičemž hladina exprese je úměrná účinku agens poškozujícího DNA

Neindukovaná a indukovaná buňka

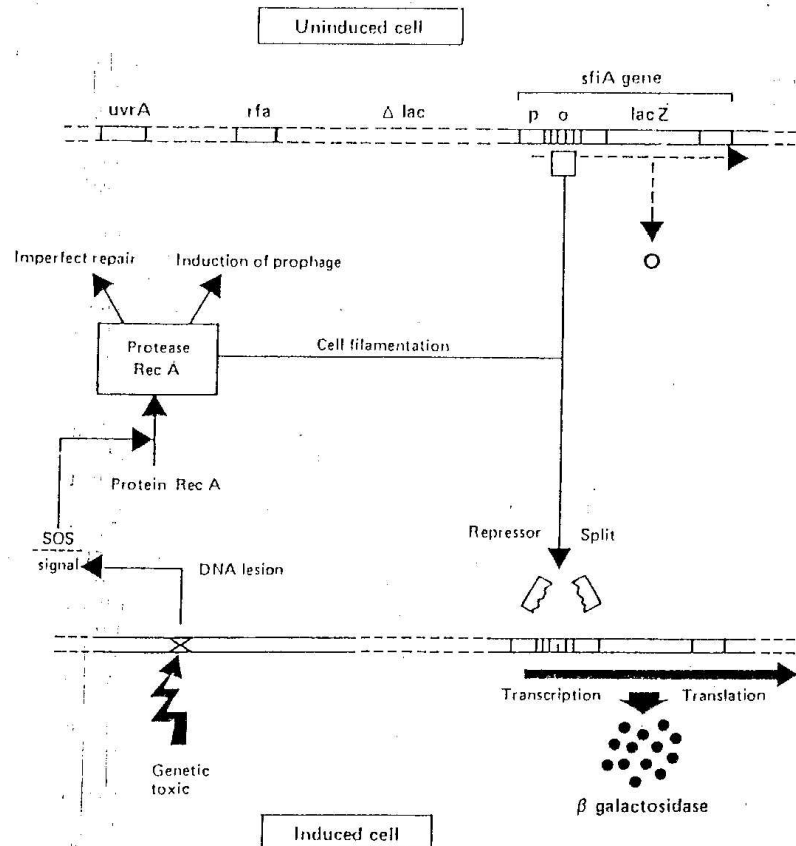


Fig. 1. Principle of the SOS Chromotest. Upper part: uninduced cell. The LexA repressor prevents expression of the *sfiA::lacZ* fusion. Lower part: induced cell. DNA damage has triggered activation of the RecA protein. The LexA repressor has been cleaved by the activated RecA protein, resulting in induction of the expression of the *sfiA::lacZ* operon fusion. (See text for additional explanation.)

E. coli PQ37 nese další mutace

- *Δlac* U169 ... delece lac operonu
- *uvrA* ... zvyšuje citivost kmene vůči genotoxickým látkám (deficientní v excisní reparaci)
- *rfa* ... usnadňuje průnik molekul testované látky do buněk

Další úpravy kmene

- Kmen byl upraven tak, že konstitutivně exprimuje alkalickou fosfatázu (Pho C fenotyp),
- aktivita je sledována spektrofotometricky (substrát PNPP: pnitrofenyldisodiumfosfát)

Úprava byla provedena proto

- Aby se vyloučily falešně negativní výsledky
- Protože některé chemické látky mohou inhibovat syntézu proteinů

Postup stanovení genotoxicity

- Kmen se smíchá s mutagenní látkou
- a po určité době, potřebné pro syntézu proteinu, je spektrofotometricky testována aktivita beta-galaktosidázy
- (substrát ONPG: o-nitrophenyl-beta-D-galaktosid)
- A sledována aktivita alkalické fosfatázy
- Test umožňuje kvantifikaci

Testování různých koncentrací genotoxické látky s využitím SOS chromotestu

SOS chromotestu

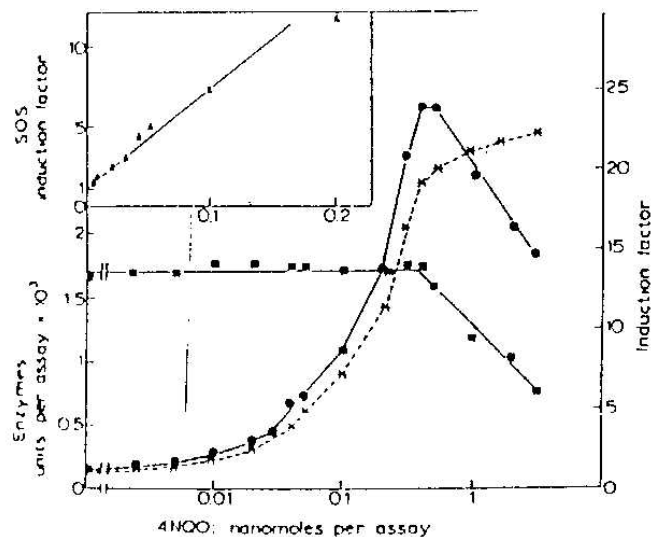


Fig. 3. Dose response in the SOS Chromotest for the compound 4NQO. Assays were performed without metabolic activation. The abscissa represents the amount of compound per assay (0.3 ml). The amount per ml is thus 3.33 times higher. β -Galactosidase activity (●) increases to a maximum and then decreases. Alkaline phosphatase activity (■) is constant and then decreases. The decrease in activity is attributed to inhibition of protein synthesis. The ratio of the activities, β -galactosidase/alkaline phosphatase, divided by its value at concentration 0 of the compound tested is the induction factor (*). The induction factor increases to a plateau. The linear portion of the increase (top left) permits calculation of the SOSIP.