

Návod k praktické úloze „Testování specifických účinků environmentálních vzorků“

1. Cíl cvičení

Cílem cvičení je, aby byl po jeho absolvování student schopný provést *in vitro* test s kvasinkovými kulturami, aby chápal principy jeho fungování a aby byl schopen vyhodnotit změřené výsledky.

2. Teoretický úvod

Řada látek přítomných v životním prostředí působí nejen akutní toxicitou, ale také toxicitou chronickou projevující se často subletálními účinky. Mezi tyto látky patří především persistentní organické polutanty a jejich deriváty, polyaromatické uhlovodíky, pesticidy, těžké kovy nebo farmaka.

Mezi subletální a chronické účinky těchto látek patří například karcinogenita a genotoxicita, imunotoxicita, teratogenita nebo endokrinní disrupce. Řada z těchto účinků je spojována především s modulací receptorových mechanismů, kdy dochází k narušení přirozených převodů signálů mezi receptory, což může vést k nežádoucím efektům na úrovni celého organismu. Protože testování chronických a subletálních účinků chemických látek na zvířecích modelech *in vivo* je velice nákladné, dlouhotrvající a je nutné použít velkého množství zvířat, používají se často testy *in vitro*.

Mezi *in vitro* modely lze zařadit především buněčné, tkáňové a orgánové kultury. Využívají se zejména pro studium specifických mechanismů toxicity nebo pro rychlý „screening“. Jejich výhodou oproti *in vivo* testům je nižší cena, možnost automatizace, nebo kratší doba trvání testu. Nevýhodou je především izolace systému od organismu.

Endokrinní disrupce

Látky narušující hormonální rovnováhu organismů (endokrinní disruptory) ovlivňují syntézu, sekreci, transport, nebo vazby či vylučování endogenních hormonů, které se podílejí na homeostatických, reprodukčních, vývojových a behaviorálních funkcích organismu.

Tyto účinky mají na příklad některé pesticidy, polyaromatické uhlovodíky, polychlorované bifenyly nebo některá farmaka. Přestože tyto látky mohou ovlivňovat hormonální rovnováhu na různých úrovních, nejčastěji je studován jejich vliv na přenosy signálů buněčných receptorů. Intenzivně studováno je především ovlivnění signálních drah estrogenních nebo androgenních receptorů a to jak jednotlivými xenobiotiky tak komplexními vzorky z životního prostředí.

***In vitro* modely endokrinní disrupce**

In vitro modely jsou často používány pro stanovení specifických mechanismů účinku a jedná se o testy využívající hlavně buněčné a tkáňové kultury. Většina těchto testů je prováděna na různě modifikovaných buněčných liniích odvozených z nádorů, používají se především linie odvozené z nádorů savců. Kromě těchto testů se využívají také testy s kvasinkovými kulturami. Kvasinkové testy jsou jednodušší, rychlejší a méně náročné na vybavení a zkušenosti. Oproti tomu, výhodou testů se savčími buněčnými liniemi je především zahrnutí intracelulárního metabolismu, zvláště možné ovlivnění hladin cytochromů a dalších důležitých enzymů a také zohlednění vlivu dalších aktivovaných receptorů na signální dráhy studovaných receptorů (např. vliv aktivace AhR při antiandrogenitě nebo antiestrogenitě). Nejčastěji jsou používány modely založené na expresi vloženého reporterového genu, která je spuštěna po aktivaci sledovaného receptoru. Jedná se například o reporterový gen pro tvorbu enzymu luciferasy, ale také např. β -galaktozidasy.

3. Provedení testu

Obsah:

1. Metoda
2. Chemikálie a materiál
3. Pracovní postup
4. Výsledky
5. Použitá literatura

1. METODA

Jedná se o rychlý a levný test na kvasinkovém organismu, který slouží ke sledování specifických mechanismů účinku nejen čistých látek, ale i komplexních směsí. Směsi bývají extrahovány z různých environmentálních matric jako jsou sedimenty, voda, půda či vzduchy. Test umožňuje ohodnotit celkový účinek směsi látek, což znamená, že zahrnuje potenciální interakce mezi látkami, jako antagonismus či synergismus.

Testovacím organismem je transgenní kvasinková linie *Saccharomyces cerevisiae*, u níž je do genomu vložen „reporterový“ gen, který citlivě odpovídá na aktivaci receptorového mechanismu.

V rámci cvičení budeme používat AR - responsivní linii kvasinek, transfekované genem pro androgenní receptor (AR) a reporterovým genem pro luciferázu. Ligand (komplexní vzorek) se v jádře naváže na receptor. Vazbou na specifické responsivní elementy (ARE) v oblasti promotoru cílového genu se aktivuje transkripce příslušného enzymu – luciferázy. Po přidání substrátu (D-luciferinu) se měří luminiscence.

Paralelně obvykle probíhá kontrolní kvasinkový test (kmen „luc“) kvůli případné cytotoxicitě, který v rámci cvičení používat nebudeme. Kvasinkové buňky tohoto kmene jsou ransfekovány genem pro enzym luciferázu, který není vázán na specifickou odpověď (po přidání D-luciferinu živé buňky vždy indukují luminiscenci).

2. CHEMIKÁLIE A MATERIÁL

- agar, kvasinkové kultury, sterilní roztoky komplexního a minimálního média , 40% roztok glukosy a sterilní roztoky aminokyselin, 1mM roztok luciferinu
- plastové Petriho misky o průměru 5cm
- špičky
- sterilní lahvičky 20ml a lahve 100 a 250ml
- opakovací a automatické pipety 1-10 μ l, 100-1000 μ l
- 30°C inkubátor s třepačkou na mikrodestičky pro inkubaci
- bílé 96-ti jamkové mikrodestičky
- luminometr, autokláv, flow-box, spektrofotometr

Důležité: s kvasinkovými kulturami musíme pracovat za sterilních podmínek v laminárním boxu – nástroje a laboratorní nádobí musíme udržovat sterilní nebo ho sterilizovat v plameni či autoklávu.

Média pro buňky budou pro potřeby cvičení připravena dopředu, ale jsou uchovávána bez uhlíkového zdroje a aminokyselin. Roztoky glukózy a aminokyselin proto budeme do médií v čas potřeby přidávat.

3. PRACOVNÍ POSTUP: 1.den - *zajistí vedoucí cvičení, studenti neprovádějí*

Příprava agarových ploten

1. 30ml komplexního média bez glukosy a aminokyselin sterilně odlijte do nejméně 100-mililitrové láhve.
2. Láhev zakryjte, ale ne úplně! Autoklávujte jako kapaliny.
3. Po autoklávování sterilně přidejte roztoky **glukosy (50ml/l)** a aminokyselin (**histidin 10ml/l, adenin 10ml/l, leucin 10ml/l**).
4. Nalijte agar na sterilní plotny (cca 15ml na 1 misku).
7. Plotny nepřikrývejte dokud nejsou úplně ztuhlé.
8. Pokud ihned nezahájíme kultivaci kvasinek, uchováваме garové plotny při pokojové teplotě dnem vzhůru tzn. agarovou stranou nahoru zakryté parafilmem.

Zahájení kultivace z glycerolové zmrzlé kultury

1. Agarové plotny pro kmeny kvasinek, které chceme kultivovat označte jménem kvasinek, datem a osobními monogramy.
2. Za sterilních podmínek ve flow-boxu seškrábněte trochu z povrchu zamrzlé kultury sterilní špičkou a naneste kulturu křížovým roztěrem na agarovou plotnu.
3. Zbývající zmrzlou kulturu vraťte **ihned** zpět do mrazáku (-80 °C).
4. Agarové plotny se uchovávají dnem vzhůru ve 30 °C **dva** až tři dny ve tmě do velikosti jedné kolonie kvasinek **1mm**.

PRACOVNÍ POSTUP: 3.den – 1. den cvičení pro studenty (cvičení potrvá max. 1h)

Ke sterilnímu minimálnímu médiu přidejte sterilně příslušné množství glukosy (50ml/l) a aminokyselin (histidin 10ml/l, adenin 10ml/l, leucin 10ml/l).

Nárůst kultur v roztoku příslušného média - zahájení pre-kultivace z agarové plotny

1. Ve flow-boxu nalijte 3ml minimálního média s glukosou a aminokyselinami do sterilní „penicilínky“. Kvůli provzdušňování kultury neplňte lahvičku víc než do dvou třetin.
2. Vyberte samostatnou kvasinkovou kolonii o velikosti cca 1mm a přeneste ji z agaru do tekutého média v „penicilínce“. Nezavírejte úplně.
3. Inkubujte ve 30 °C za mírného třepání ve tmě přes noc.

PRACOVNÍ POSTUP: 4.den - 2. den cvičení pro studenty (cvičení potrvá max. 6h)

1. Naočkovaná kvasinková pre-kultura v minimálním médiu s glukosou a aminokyselinami přes noc v tmavém prostředí za třepání ve 30 °C naroste.
2. Ráno na spektrofotometru změříme OD_{600nm} (optická hustota) z dvacetkrát naředěné kultury (50 μ l kvas. kultury + 950 μ l dest.vody). Před měřením zamíchejte střídavým obracením kyvety dnem vzhůru, aby se kvasinky neusadily.
3. Použijeme program Simple Reads na spektrofotometru CARY 50 Bio. Z naměřených hodnot OD vypočítejte rozředění v příslušném médiu pro celou desku. Rozředění musí být takové, aby konečná hodnota OD_{600nm} kultury byla okolo 0,4.

Příklad výpočtu:

Ráno jsem naměřil OD_{600nm} 0,213 – pokud mám směs v kyvetě naředěnou 20x, pak $0,153 \times 20 = 3,06$. To znamená, že mám v 1ml (v kyvetě je 1ml) $OD_{600nm} = 3,06$. Potřebuji ale 0,4, takže směs naředím 7,7x.

Na jednu desku potřebuji 10ml roztoku, takže vezmu 1,3 ml kvasinkové suspenze + 8,7ml minimálního média s glukosou a aminokyselinami.

4. Vhodně zředěnou kulturu dejte zpátky na třepačku do inkubátoru při teplotě 30°C do tmy na 2 hodiny k dosažení OD_{600nm} 0,6-0,7.
5. Poté pipetujte 100 μ l kvas. kultury pomocí opakovací pipety do každé jamky bílé destičky.
6. Přidejte 1 μ l vzorku nebo estradiolu – kalibrace (15 pM -100 000 pM) v MeOH (finální koncentrace rozpouštědla nesmí přesáhnout v jamce 2%).
7. Přikryjte destičku víčkem a třepejte 20s na třepačce. Inkubujeme při 30°C ve tmě po dobu 2,5 hodiny.
8. Po inkubaci pomocí dispenzorů v luminometru Luminoskan Ascent (Thermo) přidáme 96 μ l 1mM roztoku luciferinu.
9. Změříme ihned luminiscenci – vzorek je stálý pouze okolo 5 až 10-ti minut.

4. VÝSLEDKY:

Naměřené hodnoty jsou v relativních luminiscenčních jednotkách (RLU). Každý vzorek je změřen v triplicátech (tři opakování). Ze získaných dat vytvoříme průměrné hodnoty pro jednotlivé triplicáty, ze kterých vytvoříme nejdříve spojnicový graf, vypočteme směrodatné odchylky a odstraníme případné výrazně odlišné hodnoty.

Potom od všech hodnot odečteme průměrnou hodnotu luminiscence, kterou dosahuje samotné rozpouštědlo. Hodnoty RLU přepočítáme na procenta. Jako 0 % odpovědi bereme rozpouštědlovou kontrolu, jako 100% koncentraci testosteronu, která dosáhla nejvyšší indukce luminiscence.

Pro výpočet EC 50 zlogaritmujeme hodnoty koncentrace a vytvoříme bodový graf (osa x – koncentrace, osa y - % odpovědi). Body v lineární oblasti proložíme regresní přímkou a pomocí rovnice regrese vypočteme hodnotu logaritmu koncentrace a následným odlogaritmováním získáme hodnotu EC 50.

V případě pozitivní odpovědi vzorku vypočítáme kolik ng testosteronu způsobilo ekvivalentní odpověď vzorku - vypočítáme v jaké koncentraci vzorek způsobuje stejnou odpověď jako 50% (případně 25%) odpověď testosteronu. Po té vyhodnotíme množství androgenního ekvivalentu na 1 l vzorku, takže výsledný androgenní potenciál vzorku vyjádříme v jednotkách AEQ ng /l.

5. POUŽITÁ LITERATURA:

Leskinen P., Virta M., Karp M. (2003): One-step measurement of firefly luciferase activity in yeast, *Yeast* 2003, 20:1109-1113

Návod ke cvičení z ekotoxikologických biotestů od Martina Beníška

Protokol

Protokol by měl obsahovat:

- 1) Stručný popis principu metody
- 2) Použitý materiál a chemikálie
- 3) Postup: Vypsát co přesně jste dělali, jaké aminokyseliny se přidávaly do média, do agaru, jaké vzorky v jakých koncentracích byly testovány, jaká látka byla použita pro kalibraci atd.
- 4) Vyhodnocení výsledků – vytvoření spojnicového grafu, který obsahuje také směrodatné odchylky. Výpočet hodnoty EC 50, výpočet androgenního potenciálu vzorku.
- 5) Závěr