

MASARYKOVA UNIVERZITA V BRNĚ
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

RECETOX

*VÝZKUMNÉ CENTRUM PRO CHEMII ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ
A EKOTOXIKOLOGII*

***KVASINKY JAKO MODELOVÝ ORGANISMUS
PRO EKOTOXIKOLOGII***

Veronika Buráňová

Bakalářská práce



Vedoucí: Mgr. Klára Hilscherová, PhD.

Brno, Česká republika, rok 2009

Poděkování:

Poděkování patří především těmto lidem:

mojí vedoucí, Mgr. Kláře Hilscherové, PhD. za odborné vedení, konstruktivní připomínky a čas, který si na mě vždy našla a který musela trávit nad opravováním této bakalářské práce, *mojí konzultantce, Mgr. Barboře Jedličkové* za velmi vstřícné a milé jednání a cenné rady, které mi poskytla,

mému příteli, Ing. Patriku Priknerovi, PhD. za „materiálovou“ výpomoc, za pomoc při úpravě a překládání obrázků, za zázemí, které mi už 4. rokem bezmezně poskytuje, a především za to, že mě má rád,

mé mámě, Janě Buráňové za poskytnuté zázemí a za ochotu, s jakou se stará o spoustu „běžných“ věcí, kterými jsem se díky ní během psaní této bakalářské práce nemusela vůbec zabývat.

Obsah:

SEZNAM ZKRATEK	4
ÚVOD A CÍL PRÁCE	6
1 BIOLOGIE KVASINEK	7
1.1 ÚVOD.....	7
1.2 SYSTEMATICKÉ ZAŘAZENÍ.....	8
1.3 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA.....	9
1.4 CYTOLOGIE KVASINEK.....	10
1.5 MORFOLOGIE KVASINEK.....	12
1.6 ROZMNOŽOVÁNÍ.....	13
1.6.1 Nepohlavní rozmnožování.....	13
1.6.2 Pohlavní rozmnožování.....	15
1.7 ŽIVOTNÍ (BUNĚČNÝ) CYKLUS.....	17
2 BIOTESTY ZALOŽENÉ NA KVASINKOVÝCH MODELECH	19
2.1 KVASINKOVÉ MODELKY.....	19
2.2 TESTY TOXICITY.....	20
2.3 PŘEHLED TESTŮ.....	20
2.3.1 Test cytotoxicity.....	20
2.3.2 Test genotoxicity.....	21
2.3.3 Analýza transkriptomu kvasinek metodou microarray.....	23
2.3.4 Kvasinky jako model pro studium stárnutí buněk.....	24
2.3.5 Specifické testy toxicity závislé na aktivaci nukleárních receptorů.....	26
a) Testy se steroidními receptory.....	26
b) Testy s arylhydrokarbonovým receptorem.....	34
c) Srovnání kvasinkových testů s podobnými testy prováděnými na savčích buněčných liniích.....	35
3 PRAKTICKÁ ČÁST	38
3.1 POPIS STANDARDNÍ OPERAČNÍ PROCEDURY PRO KVASINKOVÝ TEST.....	38
3.1.1 Příprava médií a roztoků.....	38
3.1.2 Příprava agarových ploten.....	40
3.1.3 Zahájení kultivace ze zmražené kvasinkové kultury.....	41
3.1.4 Zahájení pre-kultivace z agarové plotny.....	41
3.1.5 Testování vzorků na kvasinkách.....	41
3.1.6 Metodika testování modelových sloučenin na GR.....	42
3.2 VÝSLEDKY A VYHODNOCENÍ.....	43
SHRNUTÍ A ZÁVĚR	48
ANOTACE	50
ANOTATION	50
POUŽITÁ LITERATURA	51

Seznam zkratek:

- A₆₅₀*...absorbance při 650 nm
AhR...arylhydrokarbonový (dioxinový) receptor (z angl. arylhydrocarbone receptor)
AhR komplex...arylhydrokarbonový receptorový komplex (z angl. arylhydrocarbone receptor complex)
AR...androgenní receptor
AREs...úseky DNA, na které nasedá aktivovaný androgenní receptor (z angl. androgen response elements)
ARNT protein...protein zodpovědný za přenos aktivovaného receptorového komplexu do jádra (z angl. AhR receptor nuclear translocator)
cDNA...komplementární DNA, DNA vznikající reverzní transkripcí mRNA
CFU...jednotka množství mikroorganismů uváděná na jednotku objemu (z ang. colony-forming units), značí kolik se v daném prostředí nachází mikroorganismů schopných vytvořit samostatnou kolonii při vyočkování na tuhou kultivační půdu
CRPG...chromogenní substrát (z angl. chlorophenol red-β-galactopyranosid)
DREs...úseky DNA, na které nasedá aktivovaný dioxinový receptor (z angl. dioxin response elements)
E2...17β-estradiol
EC50...koncentrace způsobující 50% efekt
ER...estrogenní receptor
EREs...úseky DNA, na které nasedá aktivovaný estrogenní receptor (z angl. estrogen response elements)
FI...násobek indukce (z angl. fold induction)
GFP protein...zelený fluoreskující protein
GR...glukokortikoidní receptor
HI(3)...histon skupiny 1(3)
HEQ...hormonální ekvivalent
HREs...obecně úseky DNA, na které nasedá receptor aktivovaný vazbou se steroidními hormony (z angl. hormone response elements)
HSP... stresové proteiny (proteiny teplotního šoku, z angl. heat shock proteins)
I... inhibice růstu vyjádřená v %
IC50...koncentrace způsobující 50% inhibici
IR...indukční poměr
ISO standard...norma standardizovaná mezinárodní organizací pro standardizaci (z angl. international standard organization)
lacZ gen...gen kódující β-galaktosidázu
LD50...toxikologické označení pro množství substance, které je po podání určité látky smrtelnou dávkou pro daného živočicha v 50 % případů
LOEC...nejnižší koncentrace, při které byl pozorován účinek
luc...kvasinkový kmen, který stabilně vytváří luciferázu a který se používá jako kontrola v bioluminiscenčním testu
MMS...methylmetansulfonát
OD...optická hustota kvasinkové kultury
oNPG... chromogenní substrát, 2-nitrofenyl-β-D-galaktopyranosid
PAHs... polycyklické aromatické uhlovodíky (z angl. polycyclic aromatic hydrocarbons)
PDR5 gen...gen kódující transportní protein typu ABC zodpovědný za rezistenci kvasinky k hydrofobním látkám (z ang. pleiotropic drug response)
PR...progesteronový receptor
PREs...úseky DNA, na které nasedá aktivovaný progesterogenní receptor (z ang. progesterone response elements)
RAD54 gen...gen řídící opravu poškozené DNA (z ang. radiation repair)
REP... relativní efektivní potenciál (z ang. relative effective potency)
RIE...relativní induktivní účinnost (z ang. relative inductive efficiency)
RIP...relativní inhibiční potenciál (z ang. relative inhibition potency)
RLU... relativní luminiscenční jednotky (z ang. relative luminiscence units)
R-mutant...kvasinka tvořící drsné kolonie, která má zvýšený aerobní metabolismus
RNR2 gen...gen řídící opravu poškozené DNA (z ang. ribonucleoside-diphosphate reductase)
S9 frakce...jaterní homogenát obsahující jaterní enzymy, je zodpovědný za metabolickou aktivaci
SHBG... protein vázající pohlavní hormony (z ang. sex hormone binding globulin)
SNQ2 gen...gen kódující transportní protein typu ABC zodpovědný za rezistenci kvasinky k 4-nitrochinolin-N-oxidu
SOS Chromotest...bakteriální test genotoxicity prováděný na *Escherichia coli*

TCDD...2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin

TEQ...toxický ekvivalent

TR...thyroidní receptor

umuC test...bakteriální test genotoxicity prováděný na *Salmonella typhimurium*

URA3 gen... gen kódující orotidin-5-monofosfát dekarboxylázu - enzym účastnící se syntézy uracilu

YOR1 gen...gen kódující transportní protein typu ABC zodpovědný za rezistenci kvasinky k oligomycinu (z ang. yeast oligomycine resistance)

Úvod a cíl práce

Kvasinky, zejména nejlépe prostudovaný rod *Saccharomyces*, jsou okem neviditelné, avšak velmi užitečné eukaryotické organismy. Už od starověku se využívá jejich fermentační schopnost při výrobě alkoholických nápojů a při pečení. Jsou zdrojem řady vitamínů a dalších důležitých látek pro lékařské účely. V oblasti buněčného výzkumu se díky dobře prostudovanému genomu a snadné kultivaci používají jako modelové organismy pro studium biologie Eukaryot. V oblasti ekotoxikologie kvasinkové *in vitro* testy patří do 2. generace ekotoxikologických testů, tzv. mikrobiotestů, jejichž použití nabízí alternativu ke standardním testům již zakotveným v národních normách. Hlavní předností kvasinek je jejich snadná kultivace a schopnost rychlého rozmnožování, s čímž souvisí levnost a rychlost prováděných testů. Tyto *in vitro* testy také představují etičtější, levnější a rychlejší alternativu k drahým a časově náročným *in vivo* testům, ve kterých je pro statistické prokázání výsledku nutné usmrtit velké počty zvířat.

Cílem této bakalářské práce bylo pojednat o kvasinkách jako modelových organismech pro ekotoxikologii: v první části především shrnout základní informace o biologii kvasinek, především kvasinky obecně charakterizovat a specifikovat výhody a nevýhody kvasinek jako modelového organismu, uvést postavení v taxonomickém systému a informace o cytologii a morfologii buňky, způsobu rozmnožování a životním cyklu.

V druhé části bylo cílem zaměřit se na využitelnost kvasinkových modelů pro ekotoxikologické studie a podat přehled testů, které se v oblasti ekotoxikologického výzkumu na kvasinkách provádějí.

V poslední, praktické části bylo úkolem autorky této bakalářské práce provést kultivaci kvasinek dle standardní operační procedury a především poprvé ekotoxikologicky charakterizovat kvasinkový model transfekovaný glukokortikoidním receptorem v bioluminiscenčním testu vyhodnocením křivky dávka-odpověď pro dvě referenční sloučeniny – dexamethason a hydrokortison. Uvedený bioluminiscenční test vychází z vědecké práce P. Leskinen [35, 36, 37, 39].

1 Biologie kvasinek

1.1 Úvod

Kvasinky jsou převážně jednobuněčné eukaryotické organismy, které se zařazují do říše *Fungi* a které již od nepaměti slouží lidem při různých kvasných výroбах [1]. Fermentace jako proces zkvašování sacharidů na CO₂ a etanol je spjat s lidskou civilizací již od starověku a to v souvislosti s výrobou nápojů podobných dnešnímu pivu a vínu, kvasinky jako takové však unikaly pozornosti až do 17. století, kdy je svým prvním mikroskopem poprvé pozoroval Antony van Leeuwenhoek. Jejich hlavní úloha ve fermentačním procesu byla definitivně prokázána až o století později francouzským vědcem, Luisem Pasteurem. Dnes se počítají mezi významné organismy (nejen) díky fermentaci, která se široce využívá při výrobě piva, vína, lihu, pekařského droždí nebo krmné biomasy a která inspirovala Theodora Schwanna v 19. století k pojmenování kvasinek jako cukerných hub - „Zuckerpilz“- (latinsky *Saccharomyces*). V medicíně jsou kvasinky důležitým zdrojem ergosterolu (provitaminu D), vitamínů skupiny B a dalších látek (nicméně jsou původcem i lidských onemocnění, které patogenní kvasinky, např. rod *Candida*, vyvolávají především u oslabeného organismu). Druh *Saccharomyces cerevisiae* disponuje vlastnostmi, pro které se v oblasti výzkumu stal důležitým modelovým organismem pro Eukaryota – využívá se skutečnosti, že v kvasinkách probíhá řada životních dějů analogicky jako v savčích buňkách. Známe u nich, jako vůbec u prvních Eukaryot, celou genetickou informaci, se kterou můžeme poměrně snadno manipulovat a vnášet do ní cizí geny, např. geny pro savčí receptory látek, jejichž úlohu v buňce sledujeme. Mohou existovat v haploidním stavu, což usnadňuje přípravu mutantních kmenů. V genovém inženýrství je hojně využíván jejich 2 μm plasmid jako základ pro přípravu kvasinkových vektorů. Výhodné jsou kvasinky i proto, že jsou nenáročné na kultivaci a rychle se množí. Testy prováděné na kvasinkách jsou oproti testům na savčích buňkách levné, rychlé a nenáročné na přípravu.

Kvasinky však nejsou dokonalým prototypem savčí buňky, což v testech představuje určitá úskalí související s rozdílným složením kultivačních medií a s přítomností kvasinkové buněčné stěny, které mohou ovlivňovat rychlost příjmu testovaných látek do buněk. Rozdíly mezi oběma typy buněk panují i v rychlosti, s jakou dokáží testovanou látku metabolizovat a ve způsobu metabolismu obecně – některé metabolické reakce, stejně jako některé proteiny, mohou u kvasinek chybět [2].

Kvasinky mohou být méně citlivé na určité látky než savčí buňky a jindy naopak oproti savčím buňkám vykazují vyšší citlivost na cytotoxicitu.

1.2 Systematické zařazení

Kvasinky patří mezi mikroskopické pravé houby (lat. *Fungi*), v rámci této říše však netvoří taxonomicky jednotnou skupinu. Závisí na způsobu pohlavního rozmnožování, do které skupiny hub je zařadíme: převážnou část pohlavně se množících, tzv. teleomorfních kvasinek najdeme v oddělení *Ascomycota* a v primitivních skupinách oddělení *Basidiomycota*, naproti tomu anamorfní, nepohlavně se množící kvasinky, u kterých pohlavní rozmnožování dosud nebylo objeveno, jsou prozatím vyčleňovány v rámci oddělení *Deuteromycota* do pomocné třídy *Blastomycetes* [3].

Kromě kvasinek existuje ještě skupina tzv. kvasinkovitých mikroorganismů, vyznačujících se dimorfickým životním cyklem, ve kterém však dominuje (stejně jako u všech ostatních kvasinek) pučení jako převládající způsob rozmnožování [1].

Říše: *Fungi*

Oddělení: *Ascomycota*

Pododdělení: *Taphrinomycotina*

Třída: *Schizosaccharomycetes*

Řád: *Schizosaccharomycetales*

Rod: *Schizosaccharomyces*

Třída: *Taphrinomycetes*

Řád: *Taphrinales*

Rod: *Taphrina*

Pododdělení: *Saccharomycotina* (syn. *Hemiascomycotina*)

Třída: *Saccharomycetes*

Řád: *Saccharomycetales* (syn. *Endomycetales*)

Rod: *Saccharomyces*

Rod: *Dipodascus*

Rod: *Endomyces*

Rod: *Saccharomycodes*

Rod: *Kluyveromyces*

Rod: *Trigonopsis*

Rod: *Kloeckera*

Oddělení: *Basidiomycota*

Třída: *Ustilaginomycetes*

Řád: *Malasseziales*

Rod: *Malassezia*

Řád: *Sporidiales*

Rod: *Leucosporidium*

Pomocné oddělení: *Deuteromycota (syn. Fungi imperfecti)*

Pomocná třída: *Blastomycetes*

Rod: *Candida*

Rod: *Trichosporon*

Schéma 1: Systém vybraných druhů kvasinek [3]

1.3 Obecná charakteristika

Není jednoduché kvasinky obecně charakterizovat kvůli již zmíněné taxonomické roztržitosti a kvůli mnoha výjimkám z obecného schématu jako jsou např. existující druhy zahrnované mezi kvasinky, které, navzdory svému jménu, zdroje energie a uhlíku nekvasí, ale oxidují. Uvedená charakteristika se tedy nebude týkat striktně všech kvasinek, ale převážné většiny z nich.

Kvasinky jsou heterotrofní organismy s eukaryotickou stavbou jádra. Jadernou DNA obsaženou v jádře doprovází stejně jako u Eukaryot specifické proteiny typu histonů. Jejich struktura se však u některých (H3) výrazně liší a přítomnost některých (H1) zatím nebyla prokázána [1]. Ačkoli kvasinky patří mezi žijícími organismy k nejnižším Eukaryotům, uchovaly si mnoho genů a proteinů, které sdílejí společně s vyššími Eukaryoty, včetně člověka [4].

Stejně jako další eukaryotické buňky se brání stresovým podmínkám jak enzymatickými (superoxiddismutáza, kataláza, glutationperoxidáza), tak neenzymatickými (glutathion) antioxidantními obrannými systémy, které také reagují na vznikající kyslíkové radikály jako je superoxidový, hydrogenperoxidový a hydroxylový anion poškozující lipidy, DNA a proteiny. Při přechodném vystavení vysokým teplotám syntetizují HSP proteiny (stresové proteiny neboli proteiny teplotního šoku, z angl. heat shock proteins) a specificky akumulují trehalózu [5].

Narozdíl od jiných Eukaryot u nich nebyla prokázána skupinová translokace – proces, při kterém se přenášená látka současně chemicky modifikuje [1], ani přítomnost aromatasu – enzymu, který katalyzuje přeměnu testosteronu na estrogen [6].

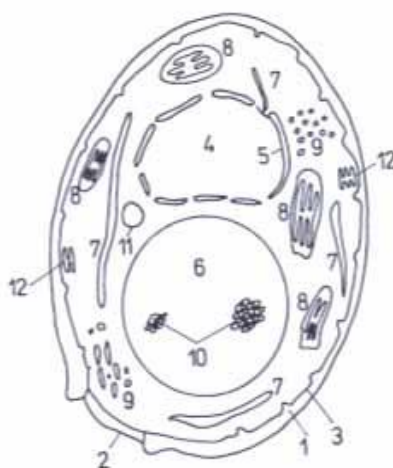
Mitóza na rozdíl od vyšších Eukaryot probíhá uzavřeně stejně jako u ostatních hub, tzn. že jaderný obal zůstává po celou dobu zachován a nedochází k jeho rozpouštění a následné obnově v dceřiných buňkách [3].

Od živočišných Eukaryot se odlišují přítomností buněčné stěny a vakuol, které však zastávají funkci živočišných lysozomů.

Výskyt chitinu jakožto dominantní složky buněčné stěny je, narozdíl od ostatních hub a vláknitých druhů kvasinek, soustředěn pouze do oblastí jizev po pučení a nahrazen polysacharidem mannanem a β -(1,3)(1,6)-glukany. Hyfová vlákna, typická pro houby tvořící podhoubí (mycelium), jsou ve většině případů redukována na jednobuněčnou stélku [3]. Nepříznivé podmínky kvasinky přežívají v podobě tzv. chlamydospor, které jsou srovnatelné s bakteriálními spory. Jako zásobní látka vystupuje, stejně jako u živočichů, glykogen.

1.4 Cytologie kvasinek

V prostoru kvasinkové buňky, obklopené cytoplazmatickou membránou a buněčnou stěnou, je cytoplazma, ve které se nachází jednotlivé, membránami oddělené kompartmenty, z nichž nejdůležitější jsou (kromě endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu) jádro, mitochondrie a vakuola (obr. 1). Pohybové orgány typu bičků u nich chybí.



Obr. 1: Schéma průřezu buňkou kvasinek. 1 - buněčná stěna, 2 - jizva zrodu, 3 – cytoplazmatická membrána, 4 - jádro, 5 - jaderná membrána, 6 - vakuola, 7 - endoplazmatické retikulum, 8 - mitochondrie, 9 - glykogen, 10 - polymetafosfát (volutin), 11 - lipidy, 12 - Golgiho aparát [7].

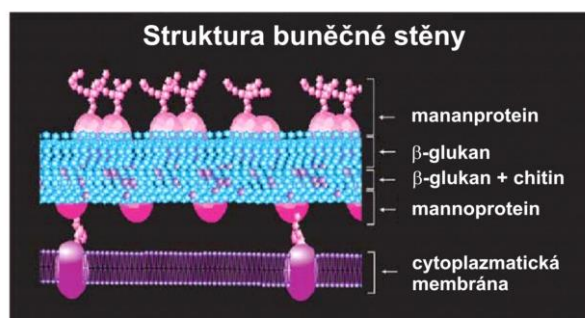
Řídící centrum buňky představuje **jádro** eukaryotické stavby. Je obaleno dvojitou membránou a obsahuje jadernou DNA, jadérko jako zdroj ribonukleotidů pro rRNA a polové tělísko vřetenka, ze kterého vychází vlákna mikrotubulů a které hraje důležitou roli při dělení jádra během rozmnožování. Jadernou DNA tvoří u nejprostudovanějšího rodu *Saccharomyces* 16 lineárních chromozomů (v haploidním stavu) a 2 μm plasmid s kruhovou stavbou, který může být v buňce i 100x nakopírován. Jaderné chromozomy jsou velmi malé a málo kondenzované, což ztěžuje jejich barvení pro mikroskopické pozorování [1, 7].

Dýchání a výroba energie je u kvasinek zajišťována **mitochondriemi**. Tyto strukturální útvary se značně liší co do velikosti a tvaru i v rámci jedné buňky, všechny však obklopuje dvojitá membrána, jejíž vnitřní část je laločnatě zprohýbaná směrem do středu v krysty. Mitochondrie jako semiautonomní organela je vybavena vlastní DNA a proteosyntetickým aparátem pro výrobu proteinů, který však svým mechanismem připomíná spíše prokaryotní syntézu bílkovin u bakterií. Počet a tvar mitochondrií udávají kultivační podmínky (mimo jiné i fyziologický stav a růstová fáze, ve které se buňka nachází): za aerobních podmínek na nezkvasitelných substrátech buňky především získávají energii oxidací, což se odráží i na velkém počtu bohatě vyvinutých mitochondrií, kterých může být až 20 v jedné buňce; za nepřístupu vzduchu a na substrátech s glukózou se vlivem převládající fermentace mitochondrie zmenšují a snižuje se jejich počet [1, 7].

Zajímavostí je bezpochyby fakt, že narozdíl od živočišných buněk kvasinka přežívá i s nefunkčními mitochondriemi, které jsou prosty DNA a že mitochondrie jsou schopny fúze a dělení, což se projevuje při procesu sporulace [1].

Vakuoly kvasinek jsou metabolicky aktivní kulovité útvary, které od buněčné cytoplazmy odděluje jednovrstevný tonoplast. Fungují podobně jako živočišné lysozomy – pomocí specifických hydrolytických enzymů recyklují složitější makromolekuly jako je mRNA nebo některé enzymy. Jsou rezervoárem K^+ , Ca^{2+} , aminokyselin, purinů, polyfosfátu ve formě granul volutinu apod. Přesunem H^+ přes membránu tonoplastu do vakuoly udržují konstantní pH v cytoplazmě. Počet vakuol souvisí s fází růstu a se stářím buňky: v mladých množících se buňkách převládá větší počet menších vakuol, naopak u zralých klidových buněk ve stacionární fázi se počet vakuol redukuje na jednu velkou [1, 7].

Buněčná stěna kvasinek (obr. 2), která je narozdíl od cytoplazmatické membrány propustná pro většinu sloučenin, slouží k ochraně před mechanickými vlivy a osmotickým šokem a udržuje tvar buňky. U nejlépe prostudovaného rodu *Saccharomyces* ji tvoří zejména polysacharidy a proteiny, minoritně doplněné o lipidy a fosforečnany, které se esterickými vazbami vážou na polysacharidy a udělují tak buněčné stěně celkový záporný náboj [7].



Obr. 2: Struktura buněčné stěny kvasinek (upraveno

[internet:http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Key_Resources/Lysing_Enzymes.html])

Vnitřní a střední vrstvu buněčné stěny vyplňují polymery glukózy – fibrilární β -1,3-glukan a amorfní β -1,6-glukan, které zodpovídají za udržování tvaru. Antigenní vlastnosti kvasinek určují glykosylované proteiny – mannanproteiny, které obsazují vnější vrstvu buněčné stěny, ale zasahují i do střední vrstvy, kde se spojují s glukany. Především v oblasti jizev po pučení je zastoupen polymer N-acetylglukosamin (chitin) [1].

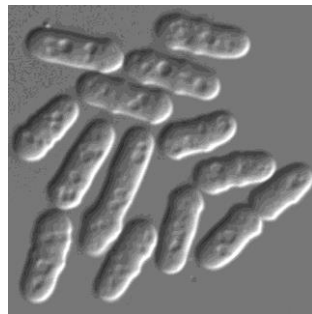
Cytoplazmatická membrána (plazmalema) kvasinek se strukturou a složením neliší od klasické cytoplazmatické membrány vyšších Eukaryot. Je to 7,5 – 8 nm tlustá vrstva složená z fosfolipidů a proteinů. Vytváří četné vychlípeniny vybíhající do cytoplazmy. Je volně propustná pouze pro malé molekuly bez náboje. Tvoří osmotické rozhraní mezi buňkou a vnějším prostředím. Je sídlem transportních mechanismů umožňujících příjem látek buňkou a transport látek z buňky do prostředí [7].

1.5 Morfologie kvasinek

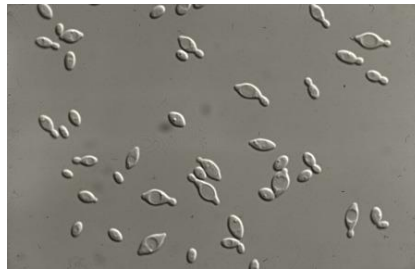
To, jak bude buňka kvasinky vypadat, je do značné míry závislé na charakteru vnějších podmínek (složení kultivačního media, hodnotě pH, koncentraci důležitých látek, povrchovém napětí, redoxním potenciálu apod.) a na způsobu nepohlavního rozmnožování. Od základního tvaru reprezentovaného rotačním elipsoidem se odvozují vlivem změněných vnějších podmínek tvary kulovité, které indukuje dlouhodobější kultivace na stejném mediu nebo kultivace na mediu s převládajícím obsahem minerálních látek, či zvýšenou hodnotou povrchového napětí. Naopak při kultivaci za dostatku kyslíku, ale na živinami chudém mediu, či za nízkého povrchového napětí, se buňky protahují, někdy až do extrémních, vláknitých forem. Tyto protáhlé až vláknité formy buněk jsou pak základem speciálních struktur jako je právě mycelium oddělené přehrádkami a tzv. pseudomycelium, u kterých nedochází

k oddělování nově vzniklých protáhlých buněk od mateřských, které tak zůstávají pohromadě ve snaze proniknout k živinám z vyčerpaného středu kolonie směrem k periferii [8].

Tvorba pseudo- i pravého mycelia je typická pro druhy se silným aerobním metabolismem a vyskytuje se i u R-mutantů (rough - drsný), tzn. kvasinek tvořících drsné kolonie, které mají zvýšený aerobní metabolismus. Netradiční druhy, co se tvaru buněk týče, reprezentuje rod *Kloeckera* (obr. 4) citronovitého, rod *Trigonopsis* trojúhelníkovitého či rod *Schizosaccharomyces* (obr. 3) oválného tvaru buněk [7].



Obr. 3: Zástupce rodu *Schizosaccharomyces*



Obr. 4: Zástupce rodu *Kloeckera*

Charakter okolních podmínek ovlivňuje i dimorfismus kvasinkovitých organismů, tzn. zda bude převládat vláknitá nebo kvasinkovitá forma vegetativních buněk [8].

1.6 Rozmnožování

Kvasinky se rozmnožují pohlavně i nepohlavně, opět v závislosti na kultivačních podmínkách.

1.6.1 Nepohlavní rozmnožování

Za vhodných kultivačních podmínek, s dostatkem zkvasitelných cukrů v médiu, převládá nepohlavní rozmnožování v podobě **pučení** a **prostého dělení** (obr. 5).

V prvním případě se v mateřské buňce syntetizují kopie všech důležitých orgánů pro nově vznikající pupen, který je s mateřskou buňkou spojen krčkem. Krček se postupně uzavírá formující se cytoplazmatickou membránou a buněčnou stěnou.

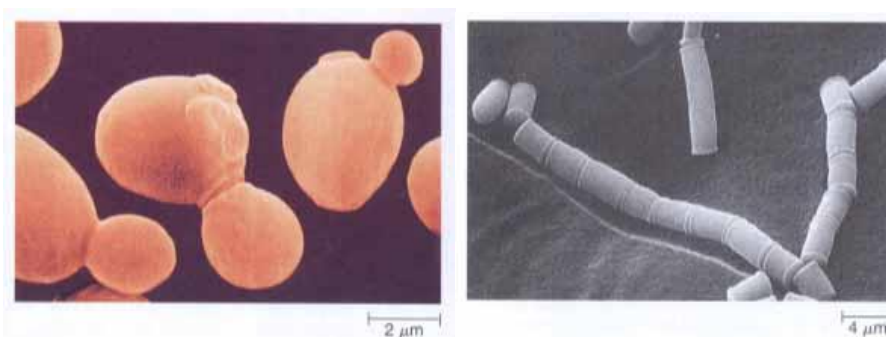
Pupeny nevznikají nahodile - existují pravidla, podle kterých dělíme kvasinky do 3 skupin: monopolárně pučící kvasinky zastupuje pouze rod *Malassezia*, který své pupeny soustřeďuje do jednoho místa na pólu buňky; bipolárně pučící kvasinky, jak už název napovídá, pučí střídavě na obou pólech buňky; poslední skupina tzv. multipolárně pučících kvasinek nevyhrazuje pupenům konkrétní místo, pupen může vznikat po povrchu celé buňky, ale nikdy ne dvakrát na stejném místě. Počet generací pupenů je tak prostorově omezen [1].

Zvláštní typy pupenů v podobě krátkých buněk elipsoidního tvaru – blastospor - nacházíme i u vláknitých kvasinek.

V případě prostého dělení figuruje postupně se protahující mateřská buňka, která je v určitém místě přepažena cytoplazmatickou membránou. Ta se prstencovitě vchlípuje směrem do středu buňky a dává vznik buňce dceřiné, která však zůstává spojena s buňkou mateřskou. Podobné rozmnožovací techniky využívá i rod *Schizosaccharomyces*, kde však cytoplazmatická membrána separuje obě buňky úplně.

Přechodným typem nepohlavního rozmnožování mezi pučením a prostým dělením, typickým pro rod *Saccharomyces*, je tzv. **pučení na široké základně**, kdy je pupen spojen s mateřskou buňkou prostřednictvím širokého krčku a po dosažení žádané velikosti je pupen oddělen přepážkou [7].

Vzácně, především u vláknitých kvasinek, dochází k rozpadu vlákna thalickým (neboli artrickým) způsobem za vzniku jednotlivých konidií – artrospor [3].

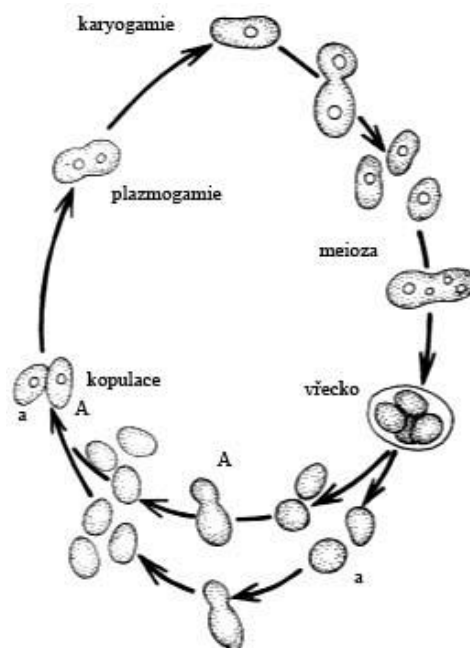


Obr.5: Pučící blastospory a dělící se artrospory [9]

1.6.2 Pohlavní rozmnožování

Pohlavní rozmnožování - spájení neboli **konjugace** - nastává za méně vhodných podmínek a můžeme ho navodit uměle, kultivací na mediu, které postrádá zkvasitelné cukry. V takových podmínkách diploidní kultura dává přednost sporulaci za vzniku haploidních rozmnožovacích útvarů tvořících se endogenně ve vřecku (viz. Ascomycetové kvasinky) nebo exogenně z bazidií či promycelu (viz. Bazidiomycetové kvasinky). Pokud se spolu spojují buňky o přibližně stejné velikosti, mluvíme o spájení izogamním. Naproti tomu heterogamní spájení se týká buněk nestejně velikosti, např. mateřské buňky a jejího pupene. Dále rozlišujeme kvasinkové kmeny homothalických buněk, které jsou schopné spájet se s vlastními pupeny. U kmenů heterothalických je konjugace možná jen mezi druhy pohlavně rozlišenými, tzn. mezi opačnými párovacími typy nejčastěji označovanými zkratkami *a* a *A*. Tyto kmeny spolu komunikují prostřednictvím kvasinkových feromonů - specifických peptidů, které u buněk s opačným párovacím typem zastavují buněčný cyklus v G1 fázi a změkčují buněčnou stěnu pro snadnější aglutinaci buněk nutnou pro následné spájení (konjugaci) [7].

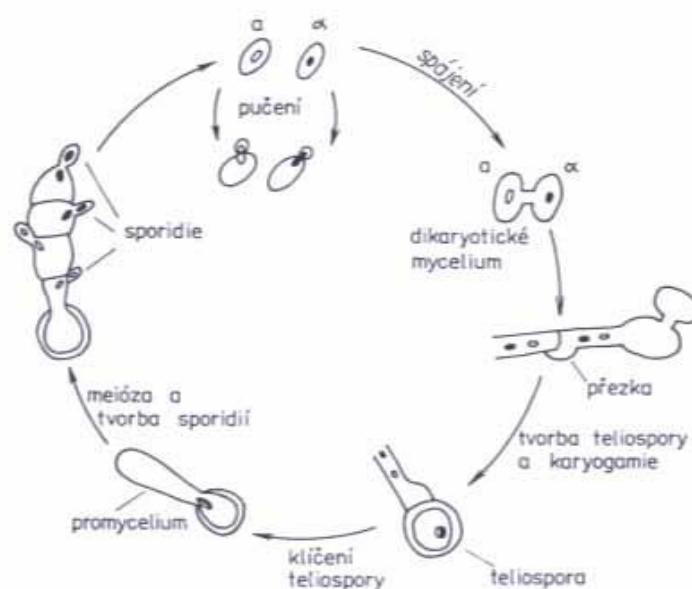
Askomycetové kvasinky (obr. 6) patří mezi tzv. holozygotní druhy, rozmnožující se kopulací opačných párovacích typů *a* a *A* haploidních buněk za vzniku diploidní zygoty, ze které bezprostředně vzniká tzv. vřecko (ascus). Ve vřecku probíhá proces meiozy a následné mitózy za výsledné tvorby 8 haploidních askospor jako budoucí generace nových haploidních buněk, kterými se celý cyklus uzavírá [3].



Obr. 6: Životní cyklus kvasinky pивní (*Saccharomyces cerevisiae*) [10]

Spájení haploidních buněk opačných párovacích typů u **bazidiomycetových kvasinek** (obr. 7) probíhá za vzniku tzv. dikaryotického mycelia, tzn. mycelia, ve kterém se spojily cytoplazmy buněk (plazmogamie), ale ještě ne samotná jádra. Obě jádra se mitoticky dělí a jedno z nich vniká do přezky. Přezka je výběžek vychlípující se z hyfy proti směru jejího růstu a dopravuje jádro do budoucí, tzv. subterminální buňky, kde toto jádro nahradí ve funkci jedno ze dvou přítomných. Celý proces je doplňován současnou tvorbou buněčných přepážek tak, aby se ve výsledku mohla spájet ve dvou vzniklých buňkách (terminální a subterminální) dvě geneticky odlišná jádra. Buňky se následně mění buď do podoby tlustostěnné teliospory nebo protáhlé bazidie. V obou útvarech dochází ke splývání (karyogamii) jader za vzniku diploidního útvaru. Teliospora se vyvíjí v promycelium, v němž probíhá meiotická tvorba 4 haploidních exogenně vznikajících sporidií. Bazidie jako místo karyogamie i meiózy oproti tomu klíčí ve 4 stopečky (sterigmata), kterými se zralá haploidní bazidiospora stěhuje z bazidie směrem na vrchol [3].

Bazidiospory mohou být rozšiřovány pasivně, u některých kvasinek jsou však aktivně vymršťovány zvláštním kapalinovým mechanismem a nazývají se příznačně balistospory [1, 7].

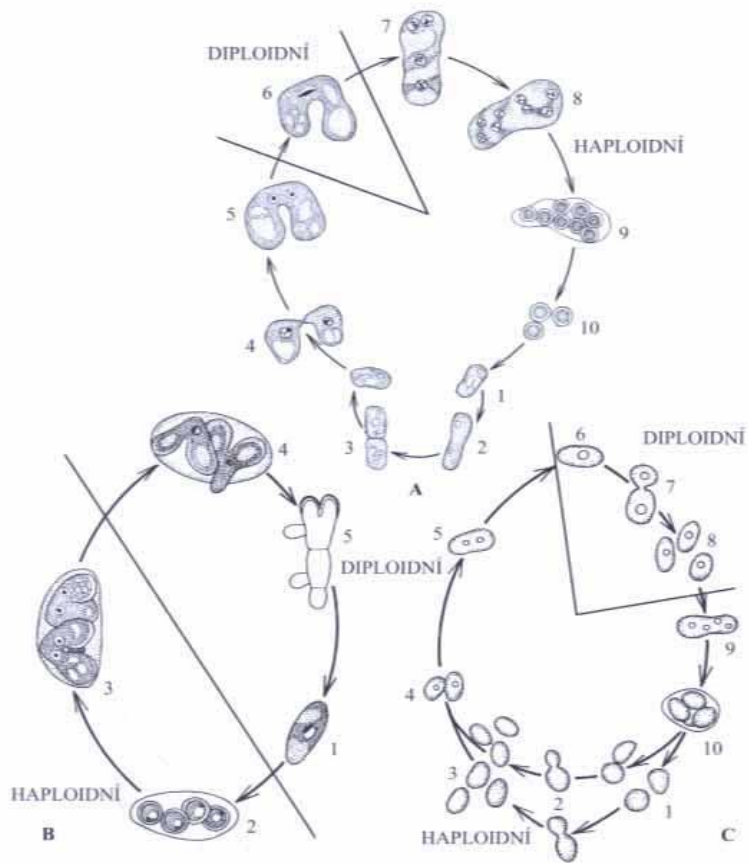


Obr. 7: Životní cyklus u rodu *Leucosporidium* [7]

1.7 Životní (buněčný) cyklus

Životní (buněčný) cyklus obecně je cyklus definovaný jako období od konce jednoho dělení po ukončení dělení následujícího. Délka buněčného cyklu kvasinek se hodně liší v závislosti na různých faktorech, jako je použitý testovací kmen, růstové médium a teplota, za které rozmnožování probíhá. Za běžných podmínek se uvádí, že laboratorní haploidní kmeny kvasinek inkubované v kompletním YPD (1% kvasinkový extrakt, 2% pepton, a 2% glukóza) médiu se rozdělí přibližně za 90 minut, v minimálním médiu během exponenciální fáze růstu za přibližně 120 minut při optimální teplotě, která dosahuje 30° C [11].

U kvasinek jsou zastoupeny všechny 3 možné varianty, které mohou u životního cyklu nastat: vedle převládající haploidní nebo diploidní fáze se objevuje i rodozměna (obr. 8) *Schizosaccharomyces octosporus* je typickým příkladem haplobionta vegetujícího převážně v haploidním stadiu, u kterého je diploidní stadium omezeno pouze na zygotu vznikající splýváním jader dvou haploidních buněk. Zygota se bezprostředně mění ve vřeco s 4 haploidními askosporami vzniklými redukčním dělením. Úplně jiná situace nastává u druhu *Saccharomyces ludwigii*, zástupce s převažujícím diploidním stadiem v životním cyklu, kde je haploidní stadium redukováno pouze na 4 askospory ve vřecu, které zde však bezprostředně konjugují za vzniku 2 diploidních buněk, jejichž osud dále pokračuje nepohlavním množением za vzniku diploidních blastospor měnících se prostřednictvím meiozy opět ve vřeco se 4 askosporami. Poslední případ rodozměny, charakteristický pro rod *Saccharomyces cerevisiae*, můžeme snadno řídit v laboratorních podmínkách prostřednictvím vhodného media. Kultivací na bohatém živném médiu navozujeme konjugaci haploidních buněk s opačným párovacím typem za vzniku diploidní kultury, která dá v neměnicích se podmínkách přednost vegetativnímu množení. Vegetativní množení probíhá pouze tak dlouho, dokud není kultura přenesena na živinami chudé medium, které v diploidních buňkách vyvolá sporulaci a meiozu za vzniku vřeca se 4 askosporami [3].



Obr. 8: Životní cykly různých kvasinek. A – *Schizosaccharomyces octosporus*, příklad haplobionta: 1 – somatická buňka, 2 – dělení buněk, 3 – dceřiné buňky, 4 – počátek kopulace dvou buněk, 5 – plazmogamie, 6 – karyogamie, 7 – meióza, vznik mladého vřecka se čtyřmi jádry, 8 – stadium s osmi askosporami, 9 – zralé vřecko s askosporami, 10 - askospory; B – *Saccharomyces ludwigii*, příklad diplobionta: 1 – diploidní blastospora před miózou, 2 – vřecko se čtyřmi sporami, 3 – plazmogamie mezi askosporami ve vřecku, 4 – karyogamie, 5 – pučení se širokou bází; C – *Saccharomyces cerevisiae*, příklad haplo-diplobionta: 1 – askospory, 2 – pučení s úzkou bází, 3 – pučením vzniklé nové haploidní buňky, 4 – kopulace, 5 – plazmogamie, 6 – karyogamie, 7 – pučení, 8 – diploidní somatické buňky, 9 – mladé vřecko po meióze, 10 – zralé vřecko se čtyřmi askosporami [3]

2 Biotesty založené na kvasinkových modelech

Kvasinky jsou eukaryotické organismy, které se v buněčné biologii uplatňují jako modelové organismy pro studium celé řady procesů, mimo jiné pro studium stárnutí buněk. Kvasinky se dále v buněčné biologii využívají v oblasti analýzy transkriptomu metodou microarray. Jejich hlavní oblast využití v ekotoxikologii zahrnuje testy stanovující genotoxicitu testovaných látek a specifické mechanismy toxicity závislé na aktivaci nukleárních receptorů. V těchto typech testů je nutné paralelní stanovení cytotoxicity nejčastěji měřením absorpance kultury či měřením bioluminiscence pro odhalení falešně negativních či falešně pozitivních výsledků. V rámci testů genotoxicity kvasinkové testy představují alternativu k testům, ve kterých se obdobným způsobem pracuje s bakteriemi, v případě stanovování specifických mechanismů toxicity zprostředkovaných aktivací nukleárních receptorů zase k testům pracujícím se savčími buněčnými liniemi.

K testům se používají kvasinkové kmeny, které jsou geneticky modifikovány tak, aby v testech vykazovaly co největší citlivost na specifické působení testovaných látek. Kvasinky jsou transfekovány reportérovými geny jako biomarkery toxicity či geny pro nukleární receptory lidských hormonů pro specifické testy toxicity závislé na aktivaci nukleárních receptorů. Jednotlivé typy testů se liší ve zmiňovaných transfekcích kvasinkových modelů, všechny však pracují stejným způsobem - po působení testovaných látek získáváme biologickou či biochemickou odpověď zprostředkovanou aktivací reportérového genu, kterou měříme a ze které usuzujeme na závažnost daného problému.

Kvasinkové *in vitro* testy slouží jako předstupeň pro výběr rizikových sloučenin, jejichž škodlivý účinek by měl být dále zkoumán v *in vivo* testech [12, 13].

2.1 Kvasinkové modely

Převážná většina kvasinkových modelů používaných pro ekotoxikologické testování náleží do rodu *Saccharomyces*, i když je tento rod rozmnožující se pučením evolučně velmi vzdálený od savců. Oproti tomu rody kvasinek, které se množí prostým dělením, jsou savcím buňkám mnohem bližší, ať už buněčným cyklem, transkripcí nebo strukturou chromozomů. Z tohoto důvodu některé studie pracují s rodem *Schizosaccharomyces pombe* jako testovacím kvasinkovým organismem [4].

2.2 Testy toxicity

Toxické látky negativně ovlivňují organismy, ať už přímým poškozením důležitých makromolekul (DNA, enzymů, membránových fosfolipidů) či nepřímo - vazbou na receptory a pozměněním genové exprese ve prospěch aktivace jaderných a mitochondriálních genů, které kódují detoxifikační a reparační enzymy či jiné důležité proteiny.

Testy hodnotící stupeň toxicity jsou v zásadě dvojího druhu:

- **testy akutní toxicity**

Zkoumají okamžitý jednorázový účinek testované látky na organismus. V těchto testech je testovací organismus vystaven působení testované látky pouze na část svého životního cyklu.

- **testy chronické toxicity**

Řeší otázku dlouhodobého vystavení organismů nízkým dávkám polutantů přítomným v prostředí a snaží se tak simulovat reálné podmínky. Testy probíhají po většinu života testovacího organismu nebo alespoň postihují jeho dominantní část.

Z výše uvedené definice, na základě které se testy toxicity dělí, a z udávané délky životního cyklu tedy vyplývá závěr, že prováděné testy na kvasinkách jsou chronické (přínejmenším pro dělicí se mateřské buňky), jelikož i nejkratší 2-hod. expozice zahrnuje dominantní část životního cyklu.

Vizuální projev toxicity látek pro kvasinky mohou představovat tzv. *petite* kolonie, což jsou drobné kolonie kvasinek, které ztratily schopnost respirace v důsledku poškození mitochondriální DNA a rostou proto pouze na mediu obsahujícím zkvasitelné cukry [14]. Tyto drobné a pomalu rostoucí kolonie s malou četností vznikají pořád, jejich výskyt se však rapidně zvyšuje po působení toxických látek.

2.3 Přehled testů

2.3.1 Testy cytotoxicity

Testy cytotoxicity se paralelně provádějí jak v testech genotoxicity [15, 17, 18], tak i ve specifických testech toxicity závislé na aktivaci nukleárních receptorů [35, 36], kde kontrolní kmeny kvasinek slouží k určení hodnot LOEC (nejnižší koncentrace, při které jsme ještě schopni pozorovat nějaký účinek, z angl. *lowest observable effect concentration*) či IC50 (tzn. hodnota koncentrace, která způsobuje 50% inhibici růstu ve srovnání s kontrolní kulturou) pro

různé testované sloučeniny a k odhalení cytotoxických účinků testovaných látek na buňku, které by mohly ovlivnit, případně zkreslit výsledek specifického účinku.

Testy hodnotí celkové procento inhibice růstu v kmeni inkubovaném s testovanou látkou (ve srovnání s kontrolním kmenem, který byl inkubován bez toxické látky) z růstových křivek sestavených pro jednotlivé koncentrace testovaných látek. Růst kultury se stanoví určením optické hustoty kultury změřením absorbance při 600 nm či změřením bioluminiscence v tzv. bioluminiscenčním testu. V tomto testu se jako kontrolní kmeny používají kvasinky (označené jako *luc*), které neobsahují nukleární receptor a které stabilně vytváří luciferázu, jejíž množství detekujeme jako bioluminiscenční signál [35, 36, 37]. Cytotoxicita látky se projevuje snížením bioluminiscenčního signálu kultury ve srovnání s maximálním bioluminiscenčním signálem kontrolní neexponované kultury kvasinek. V závislosti na míře cytotoxicity testovaných látek je tedy inhibovaný bioluminiscenční signál tím vyšší, čím je látka cytotoxičtější [35, 36, 37]. Na cytotoxicitu se testují nejvyšší připravené koncentrace látky, které jsou kvasinky v testu exponovány a také rozpouštědlo, které bylo pro přípravu koncentračních roztoků použito.

Doba působení testované látky je odvislá od typu testu, pro který se cytotoxicita hodnotí a je vždy stejně dlouhá jako v paralelně prováděném testu. Celkové procento inhibice růstu I se vypočítá z následujícího vzorce:

$$I = \frac{G_C - G_T}{G_C} * 100,$$

kde I je procento inhibice růstu, G_C vyjadřuje aritmetický průměr optické hustoty kontroly při absorbanci 600 nm (OD_{600}) na konci inkubační doby (upravené na počáteční buněčnou hustotu) a G_T je aritmetický průměr OD_{600} testované kultury na konci inkubační doby (upravené na počáteční buněčnou hustotu) [12, 15].

Výsledky se prezentují v hodnotách LOEC, pod kterými jsou pak měřeny specifické účinky, a v hodnotách IC50 či EC50 [15].

Výsledky řady studií naznačují, že testy inhibice růstu prováděné s *S. cerevisiae* jsou účinné pro detekci chronické toxicity chemických látek přítomných ve vodním prostředí a jsou srovnatelné s testy používajícími vodní jednobuněčné organismy: bakterie, řasy, či kmen řasnatých prvoků (*Ciliophora*) [12].

2.3.2 Testy genotoxicity

Genotoxicita je schopnost látek poškodit genetickou informaci, ať už modifikací, vazbou, či rozštípnutím DNA řetězců, nebo inhibicí enzymů začleněných do procesu transkripce, s doprovodným mutagenním či karcinogenním účinkem.

Genotoxicitu vyvolávají strukturně různorodé hydrofobní látky, které mají schopnost pronikat buněčnými membránami a akumulovat se v organech.

Rod *Saccharomyces* se škodlivým účinkům těchto látek brání zapínáním speciálních genů kódujících membránové a vnitrobuněčné proteiny (tzv. transportní proteiny typu ABC), které tyto látky enzymaticky degradují nebo metabolicky inaktivují, mění cílová místa jejich působení a aktivně tyto látky exportují přes cytoplazmatickou membránu do vnějšího prostředí [15].

Kvasinkové kmeny se proto pro větší senzitivitu testů upravují následujícími transfekcemi:

1. vymazání PDR5 (*pleiotropic drug response*), SNQ2 (*sensitivity to 4-nitroquinoline-N-oxide*) a YOR1 (*yeast oligomycin resistance*) genů zodpovědných za rezistenci buněk k hydrofobním látkám
2. vložení reportérového genu pro GFP protein jako biomarkeru genotoxicity do promotoru genů, řídících opravu poškozené DNA, RAD54 (*radiation repair*) nebo RNR2 (*ribonucleoside-diphosphate reductase*), z nichž druhý jmenovaný prokázal větší citlivost v testu s MMS (látky pravidelně používané jako referenční sloučeniny pro ohodnocení potenciálu testované sloučeniny vyvolat mutaci a poškodit DNA) [16].

Oba promotory obsahují evolučně starou sekvenci, jejíž přepis se vždy spouští jako odpověď na poškození DNA [16, 17].

Princip testu spočívá v tom, že látka, která poškozuje DNA, aktivuje geny pro příslušné reparační enzymy a tím i reportérový gen pro GFP protein, jehož množství bude záviset na velikosti poškození.

Výstupem testu je intenzita fluorescenčního signálu získaná po 8 hodinové inkubaci s testovanou koncentrací látky, která se měří v 60 min intervalech a která se porovnává s intenzitou fluorescence negativní kontroly. Intenzita fluorescenčního signálu je závislá na inkubační době a koncentraci toxikantu a přepočítává se na indukční poměr. Indukční poměr je hodnota fluorescence normalizovaná na růst buněčné kultury dělením této hodnoty

odpovídající optickou hustotou, která je pozorována při definované absorbanci v kontrolním testu chronické toxicity [17]:

$$IR = I/G_i \times C_i/C_N,$$

kde IR je indukční poměr, C_i je průměrná fluorescence získaná po inkubaci s testovanou koncentrací (i) látky (upravená podle blanku), C_N je průměrná emise světla negativní kontroly (upravená podle blanku) a G_i představuje inhibici růstu buněk [17, 18].

IR menší jak 1,5 signalizuje dle ISO standardu (13829, 1997) genotoxickou odpověď [15, 17].

Kvasinkový test genotoxicity je obdobou Amesova testu, *umuC* testu a SOS Chromotestu, které však mohou být méně relevantní, protože využívají geneticky modifikované bakteriální kmeny jako modelové organismy [15, 16]. Prokaryotům totiž (oproti kvasinkovým kmenům) chybí kromě mitochondrií a pravého jádra enzymatická výbava, která by metabolicky aktivovala potenciální pro-mutageny. Pro zvýšení citlivosti je proto v bakteriálním testu nutný další krok - přidavek jaterního homogenátu, tzv. S9 frakce [17].

Výsledky obou typů testů se mohou pro řadu sloučenin lišit, což souvisí s omezeními specifickými pro oba testy: např. aktinomycin D vykazuje pozitivní výsledky v kvasinkovém testu oproti negativnímu bakteriálnímu testu. Na druhé straně řada sloučenin pozitivních v bakteriálním testu nejeví stejné výsledky v kvasinkovém testu, což by se dalo vysvětlit možnou enzymatickou inaktivací, nedostatečnou penetrací látky přes buněčnou stěnu, detoxifikací látky nebo dalšími vlastnostmi specifickými pro kvasinky. Tyto nedostatky je možné odstranit speciálními transfekcemi genů pro příslušné savčí enzymy (např. genů pro enzymy cytochromu P450, které by podporovaly větší citlivost vůči některým mutagenům), dále transfekcemi, které by podporovaly větší propustnost buněčné stěny a vyřazovaly kvasinkový detoxifikační aparát a exportní pumpy, které kvasinkám udělují rezistenci vůči některým látkám [16]. Další možností je inkubace testovaných látek ještě před vlastní inkubací s kvasinkovými buňkami s S9 frakcí, která obsahuje jaterní enzymy a je zodpovědná za metabolickou aktivaci [19].

Kvasinkový test je účinný i při rozeznávání genotoxického potenciálu látek poškozujících DNA nepřímo (např. hydroxymočovina, která inaktivuje enzym ribonukleosidreduktázu katalyzující syntézu deoxynukleotidů: dochází tak k inhibici syntézy DNA a akumulaci poškození [15]), je vhodný pro stanovení genotoxického potenciálu individuálních sloučenin [15, 17], ale i jejich směsí [18].

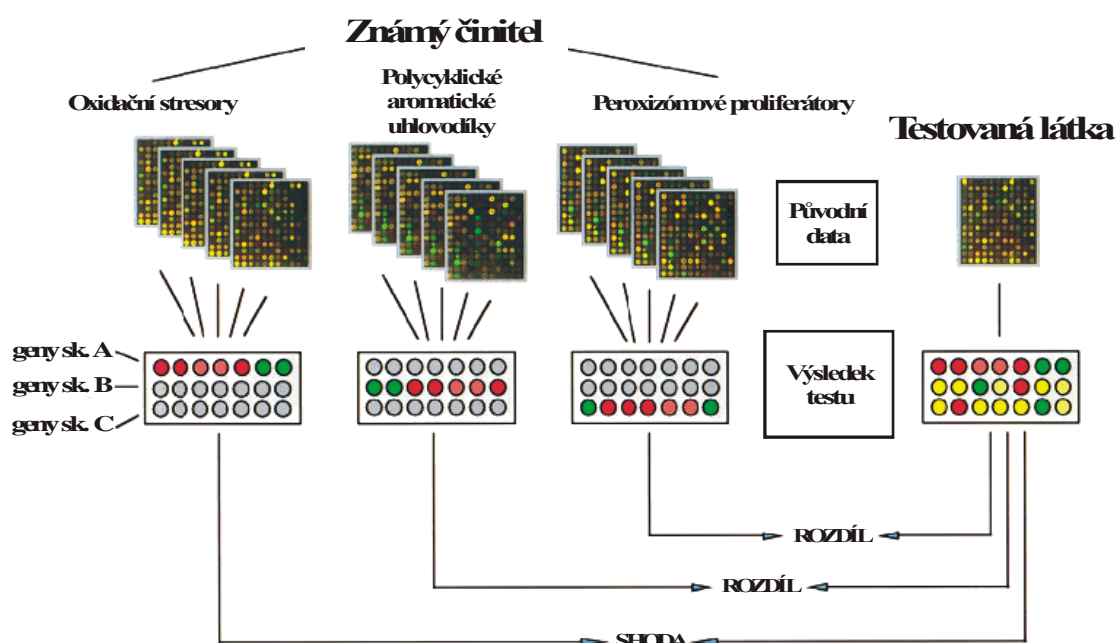
2.3.3 Analýza transkriptomu kvasinek metodou microarray

Tyto testy zaznamenávají aktivitu genů prostřednictvím analýzy jejich transkriptomu (mRNA profilů), k čemuž využívají metody *microarray* [14, 21].

Tato metoda je schopna simultánní analýzy všech genů přepisovaných jako důsledek 2-hod působení toxikantu. Záleží právě na druhu toxikantu, které geny budou indukovány k expresi. mRNA profil neznámého toxikantu je pak porovnáván statisticky *shlukovou analýzou* s mRNA profily již známých skupin toxikantů. Ve výsledku je pak naše toxická látka přiřazena do skupiny s podobným toxickým účinkem (obr. 10).

Kvasinky byly vybrány na základě znalosti jejich DNA sekvencí a faktu, že téměř všechny otevřené čtecí rámce mohou být rozmístěny na jednom skleněném slidu, umožňujícím detekci celistvé buněčné odpovědi, a to s použitím jediného DNA čipu [22].

Metoda má své opodstatnění v ekotoxikologii, zejména proto, že nám podhaluje mechanismus toxicity testovaných látek [22]. Použití těchto metod však obnáší určitá úskalí, vzhledem k tomu, že analýza transkriptomu nemusí odpovídat analýze proteomu, bioinformatické a statistické metody založené na biologických aspektech nejsou plně vyvinuté a pro DNA microarray analýzu máme pouze omezené množství dat pro srovnání [22].



Obr. 10: Schéma DNA microarray analýzy, upraveno [21]

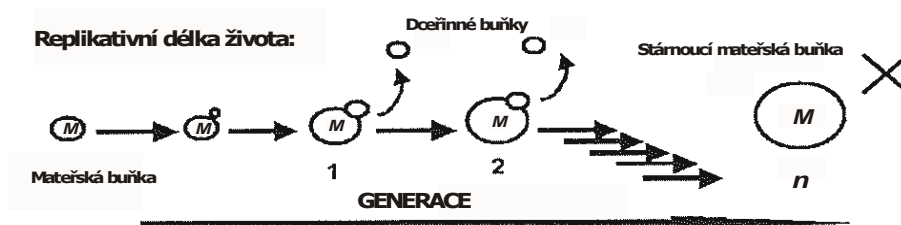
2.3.4 Kvasinky jako model pro studium stárnutí buněk

Stárnutí je stochastický proces, který primárně zahrnuje postupnou ztrátu buněčných a tkáňových funkcí v průběhu času a který vyústí až ve ztrátu viability. Může být zpomalen

dodáním většího množství energie pro udržení životních funkcí, avšak za cenu ztráty energie nutné pro reprodukci a růst. Mnoho druhů investuje celkovou energii podle existujících podmínek vnějšího prostředí. Stejně tak kvasinky v podmínkách nedostatku živin vynakládají více energie na zvládnutí stresu než na rozmnožování a růst a naopak [23].

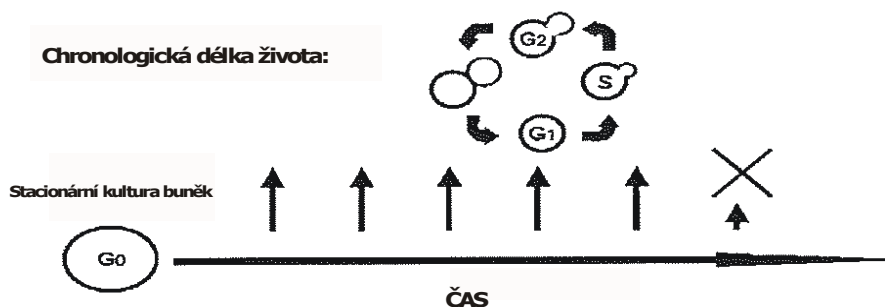
Testy založené na kvasinkových modelech v rámci studia procesů stárnutí zkoumají mechanismy (proteiny a signální dráhy), které řídí dlouhověkost a odolnost organismu vůči stresu 2 způsoby:

1. **Replikativní délka života** studuje celkový počet dceřinných buněk, které je aktivně se dělící buňka mateřská schopna vyprodukovat. Počet dělení je limitován, protože s každým dalším pupenem se v mateřské buňce hromadí molekuly kruhové DNA, které vznikají vystřížením z chromozomální DNA a které kódují rRNA. Jejich replikace se tak stává nezávislou na chromozomální replikaci (*extrachromosomal ribosomal circles*) - buňka stárne.



Obr. 11: Schéma replikativní délky života, upraveno [23]

2. **Chronologická délka života** zkoumá dobu, po jakou je stacionární nedělící se kultura (jejíž životní cyklus je zastaven v G_0 fázi) schopna udržet si v daných podmínkách svou životaschopnost, tzn. schopnost po přenesení do nového media pokračovat v životním cyklu, rozmnožit se a vytvořit nové jednotky CFU (*colony forming unit*) [24, 25].



Obr. 12: Schéma chronologické délky života, upraveno [23]

2.3.5 Specifické testy toxicity závislé na aktivaci nukleárních receptorů

Nukleární receptory

Nukleární receptory jsou proteiny rozmístěné uvnitř buněk [26], které interagují se specifickými signálními molekulami. Ve spolupráci s dalšími proteiny regulují expresi specifických genů, a kontrolují tak řadu klíčových procesů v organismu jako je vývoj, homeostáza a metabolismus organismu. Jsou schopné přímé vazby na DNA a fungují jako transkripční faktory.

Z nukleárních receptorů je v ekotoxikologii nejčastěji studována rodina steroidních hormonálních receptorů I. typu, kromě nich i tzv. dioxinový (arylhydrokarbonový) receptor.

a) Testy se steroidními receptory

Významnou skupinou studovanou i v ekotoxikologii představují steroidní hormonální receptory, které komunikují se steroidními hormony. Steroidní receptory patří do velké rodiny nukleárních receptorů, která zahrnuje také skupinu strukturálně homologních receptorů (receptory II. typu), které vážou nesteroidní ligandy (jako je thyroïdní hormon; vitamín A, D apod.). Nejvíce ekotoxikologických studií bylo prováděno s estrogenním (ER) a androgenním (AR) receptorem, méně probádané jsou receptory pro progesteron (PR) a thyroïdní receptor (TR), málo známé jsou interakce látek s glukokortikoidním receptorem (GR).

Endokrinní disruptory

Endokrinní disruptory jsou látky, které narušují hormonální rovnováhu v organismech a to buď přímo, vazbou na receptory, nebo nepřímo, ovlivněním hladiny přirozených hormonů narušením jejich syntézy, metabolismu, distribuce nebo odbourání, či ovlivněním citlivosti tkání k hormonům pozměněním hladiny tkáňových receptorů [26]. Narušená endokrinní rovnováha sekundárně ovlivňuje i správnou reprodukční a imunitní funkci [28].

Nebezpečí těchto látek, které interagují s receptory, se skrývá v jejich vlastnostech:

1. některé se chovají jako přirozené hormony. Dokáží se vázat na nukleární receptory přítomné uvnitř buněk, které buď aktivují k nespecifické odpovědi (tzv. agonismus) nebo receptory zablokují úplně a žádná odpověď nevzniká (tzv. antagonismus) [26].
2. i když mají často nižší afinitu k receptorům než přirozené hormony, jejich biodostupnost je vyšší, jelikož narozdíl od přirozených hormonů nejsou dostatečně vychytávané sérovými proteiny v krvi a jejich metabolismus probíhá pomaleji - látky

tak mají dostatek času k tomu, aby se zakoncentrovaly do hladin usnadňujících vazbu na receptor [29].

3. zahrnují různorodou skupinu chemických látek, jejichž chemická struktura se mnohdy liší od chemické struktury přírodních hormonů, což nám brání předpovědět potenciál k endokrinní disrupci jen na základě jejich chemické struktury [6, 13].

Příprava kvasinkových modelů

Při konstruování kvasinkových modelů pro odhalení potenciálu testovaných látek soutěžit s přirozenými hormony ve vazbě na steroidní receptory využíváme skutečnosti, že kvasinky obsahují proteiny homologní s proteiny přítomnými v savcích buňkách, které se účastní transkripce, a že nemají žádné geny pro nukleární receptory lidských hormonů (až na ty, které do nich sami záměrně pro účely testu vložíme) [29]. Vyhýbáme se tak možnosti, že by testovaná látka interferovala ještě s jiným receptorem [13].

Do kvasinek jsou vnášeny dva plasmidy, z nichž jeden obsahuje genetickou informaci pro příslušný receptor. Druhý plasmid obohacuje kvasinkovou DNA o tzv. reportérový gen a hormonální responzivní element (HRE), což je úsek DNA, který se včleňuje do promotorové oblasti reportérového genu. Reportérový gen je obecně gen, jehož produkt vizualizuje expresi genů, které nás zajímají.

Mechanismus působení

Endokrinní disruptor (obecně ligand), který působí prostřednictvím interakce s receptory a který nebyl v krvi vycytán sérovými proteiny (ať už nespecifickým albuminem či specifickým SHBG (*sex hormone binding globulin*) [29]), má otevřenou cestu pro vstup do buňky, kde se váže na steroidní receptor. Tato aktivace receptoru způsobí změnou konformace molekuly receptoru disociaci Hsp90 proteinů (*heat shock proteins*), které obklopovaly neaktivní receptor, a umožní dimerizaci receptoru. Vytvořený ligand-receptorový komplex v dimerizované podobě vykazuje větší afinitu k responzivním elementům promotoru – chová se vlastně jako transkripční faktor, který společně s RNA-polymerásou spolupracuje při přepisu reportérového genu [30]. Transkripcí reportérového genu vzniká produkt, jehož množství měříme příslušnou detekční technikou (jedná se o detektory luminiscence a fluorescence a detektory měřící absorbanci produktů, viz dále u jednotlivých typů testů).

Charakteristika testů

Testy zkoumají:

1. **agonistický účinek** látky na základě velikosti transkripce reportérového genu v závislosti na koncentraci dané látky. Mírou agonistického účinku látek je jejich efektivní koncentrace (EC50) (*effective concentration*), tzn. koncentrace látky indukující 50% účinek referenční sloučeniny – přirozeného hormonu. Čím méně látky stačí k vyvolání 50% účinku přirozeného hormonu, tím je látka účinnější a nebezpečnější. Pro srovnání účinnosti testovaných látek se provádí výpočet dvou parametrů:

- **relativní efektivní potenciál (REP)** (*relative effective potency*) – definuje se jako poměr mezi hodnotou EC50 referenční sloučeniny a EC50 testované látky. Hodnota REP pro referenční sloučeninu je definována jako 1 [31].

$$\text{REP} = \frac{EC50_{\text{ref. slouč.}}}{EC50_{\text{testované látky}}}$$

- **relativní induktivní účinnost (RIE)** (*relative inductive efficiency*) - značí poměr mezi maximální odpovědí testované látky zprostředkované aktivací reportérového genu a maximální odpovědí referenční sloučeniny zprostředkované aktivací reportérového genu, násobený 100. Vyjadřuje se v procentech [31].

2. **antagonistický účinek** látky na základě schopnosti látky soutěžit s přirozenými hormony ve vazbě na receptor. Hodnotí se, jaké procento přirozeného hormonu bylo inhibováno ve vazbě na receptor v závislosti na koncentraci testované látky. Toxická účinnost testovaných látek se v testech srovnává pomocí parametru IC50 (*inhibitive concentration*), který nám říká, jaká koncentrace stačí, aby způsobila 50% inhibici účinku referenční sloučeniny. Platí úměra, že čím méně látky stačí pro vyvolání 50% inhibice účinku referenční sloučeniny, tzn. čím menší je hodnota IC50, tím je látka účinnější. Pro srovnání účinnosti testovaných látek se stanovuje:

- **relativní inhibiční potenciál (RIP)** (*relative inhibition potency*) – počítá se podělením hodnoty IC50 referenční sloučeniny hodnotou IC50 testované látky. Hodnota RIP pro referenční sloučeninu je definována jako 1 [31].

$$\text{RIP} = \frac{IC50_{\text{ref. slouč.}}}{IC50_{\text{testované látky}}}$$

Největší potenciál k vazbě na steroidní receptor a transkripci reportérového genu má referenční sloučenina (dihydrotestosteron pro testy na androgenní receptor či estradiol pro testy vazby na estrogení receptor), vůči které se počítají relativní efektivní (či inhibiční) potenciály testovaných látek. U vzorků obsahujících směsi látek testovaných na schopnost jejich interakce se steroidními receptory se míra aktivity jednotlivých sloučenin vyjadřuje tzv. hormonálními steroidními ekvivalenty (HEQ), které se počítají vynásobením REP s koncentrací dané látky.

Přehled testů na základě použitých reportérových genů

Test indukce růstu kvasinek zprostředkované aktivací ER

Pro tento starší typ testu se používal geneticky upravený kmen PL3 rodu *Saccharomyces*, který vyžadoval pro růst na selektivním mediu uracil a který pro účely testu obsahoval:

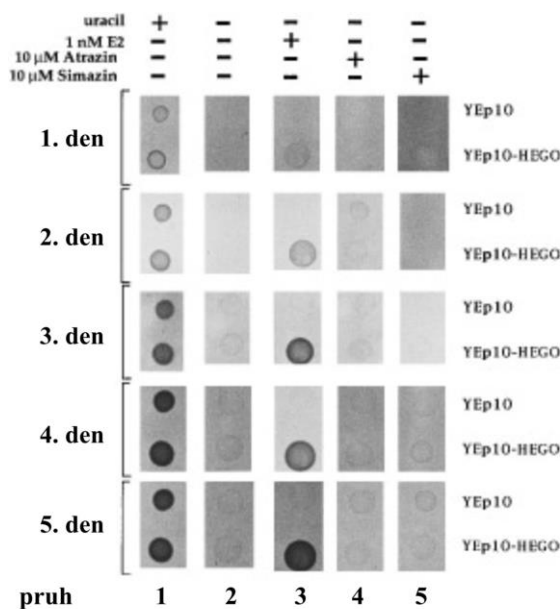
1. cDNA lidského estrogeního receptoru
2. URA3 auxotrofní reportérový gen (URA3 gen kóduje enzym účastnící se syntézy aminokyseliny uracilu, orotidin-5-monofosfát dekarboxylázu)
3. ERE sekvence

Kmen byl kultivován na selektivním mediu, které postrádalo aminokyselinu uracil, a tudíž mu bylo zabráněno v růstu. Růst jako biomarker toxicity se projevil teprve inkubací s takovou testovanou látkou, která vykazovala schopnost vázat se na estrogení receptor. Vazbou na estrogení receptor došlo k dimerizaci a navázání dimerizovaného ligand-receptorového komplexu na ERE sekvence, které řídily přepis URA3 genu pro orotidin-5-monofosfát dekarboxylázu. Výsledkem byla syntéza uracilu a prokázání schopnosti testované látky vázat se na estrogení receptor, což se projevilo růstem kvasinkového kmene na selektivním mediu.

Jako pozitivní kontrola sloužil kmen PL3 s ER (YEp10-HEGO), jehož kultivace s uracilem či s přirozeným hormonem (E2) růst podporovaly, a jako negativní kontrola

kvasinkový kmen PL3 bez ER (YEp10), jehož kultivace na selektivním mediu bez uracilu růst kvasinek inhibovala (obr. 13) [32, 33].

Z prostudované literatury ([32, 33]) vyplývá, že tento test měl pouze monitorovací účel – odpovídal v zásadě pouze na otázku indukce růstu ANO – NE a nedával kvantitativní odpověď.



Obr. 13: Test indukce růstu kvasinek (ukázka testu s herbicidy atrazinem a simazinem) [32]

β-galaktosidázový test

(YES – yeast estrogen screen, YAS - yeast androgen screen, progesteronový test)

β-galaktosidázový test pracuje s *lacZ* genem pro β-galaktosidázu jako reportérovým genem. Gen pro steroidní receptor (estrogenní – ER, androgenní – AR, progesteronový – PR) je začleněn do genomu kvasinky společně s:

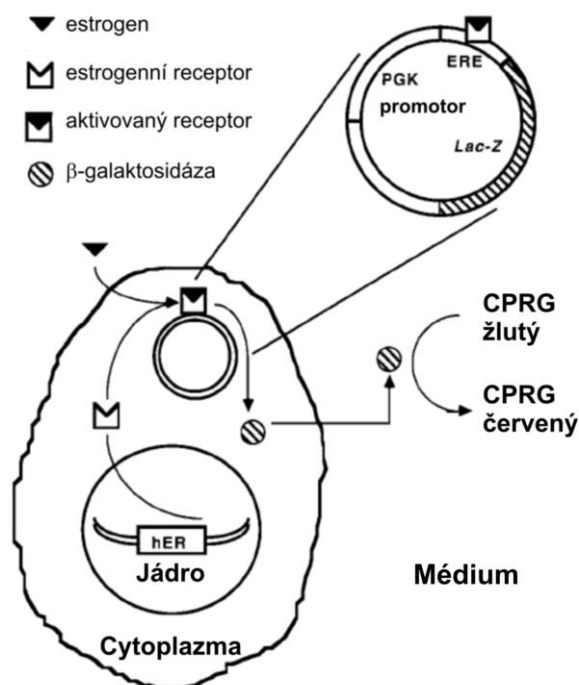
1. plasmidem nesoucím příslušný responzivní element (ERE pro estrogenní, ARE pro androgenní a PRE pro progesteronový receptor) obsažený v promotoru genu pro β-galaktosidázu
2. plasmidem kódujícím RSP5 protein určeným pro test s progesteronovým receptorem nebo plasmidem kódujícím SPT3 protein určeným pro test s androgenním receptorem. Oba proteiny představují homology k savcím proteinům a využívá se jejich schopnost zlepšovat účinnost transkripce steroidních receptorů [26].

Testovaná látka se spojuje s receptorem do podoby ligand-receptorového komplexu, který dimerizuje, nasedá na místo responzivního elementu a přepíše reportérový gen (obr.

14). Vznikající β -galaktosidáza je sekretována z buňky do media, kde metabolizuje výchozí sloučeninu - žlutý CRPG (*chlorophenol red- β -galactopyranosid*) - na červený produkt chlorophenol [13], popř. bezbarvý oNPG (*2-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid*) na žlutý orthonitrofenol [26], jehož množství stanovíme změřením absorbance při dané vlnové délce.

Design dřívějších testů zahrnoval přidání β -galaktosidázového substrátu již na začátku inkubace kvasinek s testovanou látkou a zhruba 3-denní inkubaci [13, 30, 35]. Ještě před měřením absorbance bylo navíc nutné provést lyzi buněk [24, 32, 34].

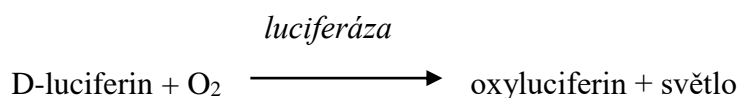
Bylo však prokázáno, že i používané β -galaktosidázové substráty a jejich produkty se vážou na steroidní receptory, a proto byl design experimentu upraven: β -galaktosidázový substrát je přidán do media až na konci inkubace kvasinek s testovanou látkou, a to společně s cykloheximidem, který zastavuje proteinovou syntézu, tedy i syntézu β -galaktosidázy. Tato úprava zkracuje trvání testu ze 3 dnů na necelé dva dny (24 hod. inkubace s testovanou látkou + 18 hod. inkubace s CPRG) a zabraňuje možné interferenci použitého β -galaktosidázového substrátu se steroidním receptorem a falešně pozitivním výsledkům [34]. Paralelně se stanovuje kontrolní test cytotoxicity měřením absorbance kultury při 600 nm.



Obr. 14: Schéma galaktosidázového testu pro estrogení receptor [13]

Bioluminiscenční testy

Bioluminiscence je produkce a vyzařování světla některými živými organismy jako výsledek chemické reakce, během které je chemická energie přeměněna na energii světelnou. Tato schopnost je zakódována v genech pro enzym luciferázu, který za přítomnosti O₂ katalyzuje chemickou přeměnu přidaného pigmentu D-luciferinu na oxyluciferin za vyzáření světla.



Kvasinky jsou pro tyto testy transfekovány:

1. geny pro nukleární receptory steroidních hormonů
2. reportérovými geny pro luciferázu světlušek rodu *Photinus*
3. responzivními elementy řídícími expresi reportérového genu

Vazba testované sloučeniny na receptor se projeví aktivací genů pro luciferázu a přeměnou D-luciferinu, který se přidává na konci inkubační doby (po 2,5 hodinách) do kultivačního media, na oxyluciferin. Odpovědí testu je tedy intenzita vyzářeného světla, která se vyjadřuje v relativních luminiscenčních jednotkách (RLU), v závislosti na koncentraci testované látky [35]. Získané hodnoty RLU jsou specifické pro daný přístroj a normalizují se na pozadřovou luminiscenci blanku.

Pro výpočet indukce kvasinek *FI* se používá následující vzorec:

$$FI = SL_S/SL_B,$$

kde SL_S je luminiscence kvasinek indukovaná v přítomnosti testované látky a SL_B množství světla, které kvasinky vyzáří v prostředí blanku [36].

V dřívějších testech musel D-luciferin na cestě za luciferázou, která je jakožto cizorodý enzym v kvasinkách přenášena do peroxizómů, pronikat nejen cytoplazmatickou, ale i peroxizomální membránou, čímž se stával limitujícím faktorem. Testy dodatečně vyžadovaly lyzi buněk před stanovením RLU. Bioluminiscenční test se v důsledku těchto procedurálních problémů prodlužoval a ztrácel citlivost [37].

Navazující optimalizace testů proto zahrnují odstranění sekvence zodpovědné za přenos luciferázy do peroxizómů z genu pro luciferázu. Takto vylepšené kvasinkové modely dávají

vyšší hladiny vyzářeného světla a měření je možné provést přímo na neporušených buňkách, které navíc po odstranění peroxizomálních sekvencí vykazují rychlejší růst [37].

Společně s testováním schopnosti látky aktivovat receptor se v testech současně hodnotí i cytotoxicita použitím kontrolního kmene kvasinek *luc*. Bioluminiscenční signál získaný jako odpověď na působení testované látky je pak možné normalizovat podle životaschopnosti buněk a podle nespecifických účinků matrice (zodpovědných za zvýšení emise v důsledku stimulačních účinků způsobených živinami v médiu) a toxických účinků testovaných látek (zodpovědných za pokles vyzářeného světla v důsledku inhibice růstu kvasinkových buněk), které ovlivňují buněčný růst a následně i expresi reportérového genu [35, 36].

Test je rychlý, expozice trvá 2,5 hodiny a výsledky obdržíme v průběhu jednoho dne [36].

Fluorescenční test

Fluorescence je luminiscence, při které molekula přechází do excitovaného stavu pohlcením fotonu o větší energii a z tohoto aktivovaného stavu se pak zpátky vrací do původního stavu vyzařováním světla o větší vlnové délce a tedy nižší energii. Tento jev je znám např. u medúzy rodu *Aequorea*, která fluoreskuje díky genům pro GFP protein, pokud ji vystavíme záření z modré části spektra.

Kvasinky jsou pro tyto testy upraveny následujícími transfekcemi:

1. geny pro nukleární receptory steroidních hormonů
2. reportérovým genem pro GFP protein z medúzy rodu *Aequorea*
3. responzivními elementy řídicími přepis reportérového genu [38]

Mechanismus je stejný jako u předešlých testů. Vazba testované látky na receptor se prokáže aktivací nukleárního receptoru, který v nově nabitě funkci transkripčního faktoru nasedá na HRE a aktivuje gen pro GFP protein.

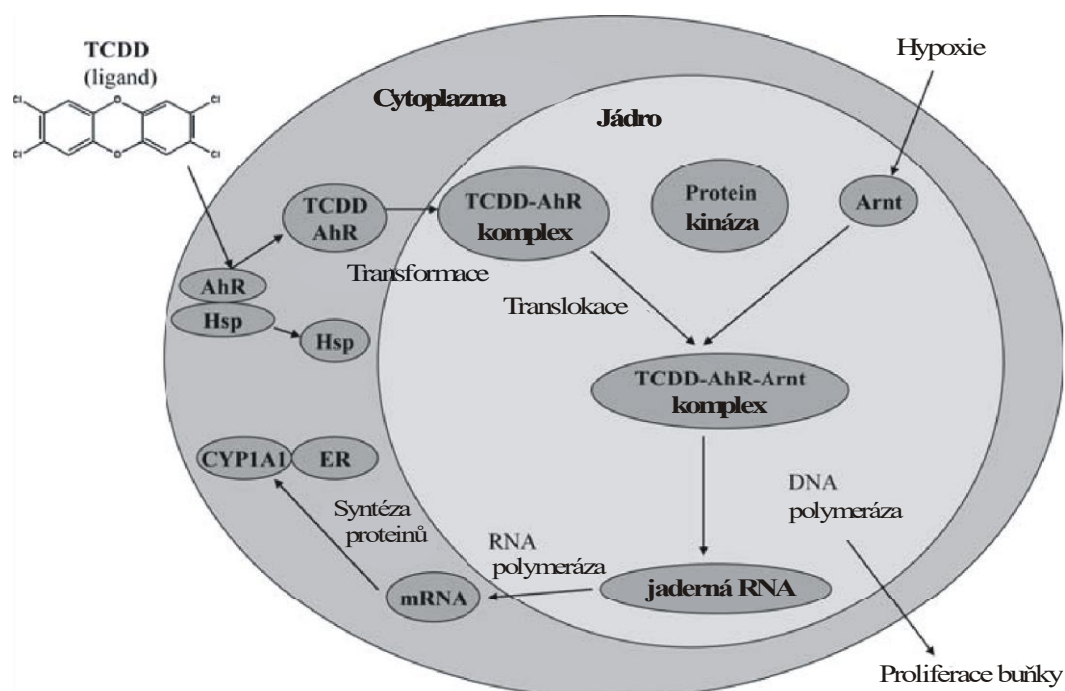
Odpovědí testu je intenzita fluorescence indukovaná ozářením příslušnou kratší vlnovou délkou s větší dávkou energie. Čím větší má látka potenciál k interakci s receptorem, tím větší množství fluorescence detekujeme [27, 30]. Pro kontrolu se opět určuje optická densita kultury měřením při dané absorbanci, abychom zjistili, zda není testovaná látka pro kvasinky toxická a zda negativně neovlivňuje růst kultury [25].

Testy jsou rychlé (fluorescence se určuje po 4- a nejdéle po 24- hod. expozici), nevyžadují rozrušení buněčné stěny a oproti bioluminiscenčním testům není potřeba přidávat drahý D-luciferin do média [30, 38].

b) Testy s arylhydrokarbonovým receptorem

Dioxinový (arylhydrokarbonový) receptor (AhR) je transkripční faktor, který patří do skupiny proteinů vázajících se na DNA s motivem helix-loop-helix [39] a který je jako jediný z této skupiny aktivovaný vazbou s ligandy: především planárními chlorovanými organickými látkami, které zahrnují 7 polychlorovaných dibenzo-dioxinů s TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) jako nejtoxičtější zástupcem, 10 polychlorovaných dibenzofuranů a 12 polychlorovaných bifenyli. AhR je dále aktivován vazbou s planárními polycyklickými aromatickými uhlovodíky (PAHs), s dalšími produkty spalování a fyto-sloučeninami jako flavonoidy a indol-3-carbinol [40].

Arylhydrokarbonový receptor je v cytoplazmě asociován se dvěma Hsp90 proteiny. Po vazbě ligandu vzniká ligand-receptorový komplex, který je přenesen do jádra. V jádře se ke komplexu připojí protein ARNT (*AhR receptor nuclear translocator*) za vzniku heterodimerního AhR komplexu (*arylhydrocarbon receptor complex*). Tento komplex nabývá schopnosti vázat se v podobě transkripčního faktoru na DNA v místě tzv. dioxinové responzivní sekvence, DRE, umístěné v promotoru responzivních genů (v tomto případě CYP1A1 genů, obr. 15) které jsou následně překládány do proteinové podoby (v tomto případě do podoby enzymového detoxifikačního aparátu, zastoupeného cytochromy P-450 1A1 [40], obr. 15).



Obr. 15: Mechanismus toxického působení TCDD přes arylhydrokarbonový receptor [40]

4 transfekce nutné pro zdárný průběh testu zahrnují:

1. geny pro arylhydrokarbonový receptor
2. gen pro ARNT protein
3. responzivní elementy (DRE) (*dioxin response element*)
4. reportérový gen (v testech se používají geny pro β -galaktosidázu s 18-hod. expozicí nebo gen pro luciferázu s 3,5-hod. expozicí)

Největší potenciál k vazbě na AhR a transkripci reportérového genu má sloučenina 2,3,7,8-TCDD, která se v testech používá jako referenční sloučenina, vůči které se počítají relativní efektivní potenciály testovaných látek. U vzorků obsahujících směsi toxických látek se míra toxicity jednotlivých sloučenin vyjadřuje tzv. toxickými ekvivalenty (TEQ), které se počítají vynásobením REP s koncentrací dané látky [39, 41].

c) Srovnání kvasinkových testů s podobnými testy prováděnými na savčích buněčných liniích

Výsledky kvasinkových testů ve srovnání s podobnými testy prováděnými na savčích buňkách jsou ovlivněné několika skutečnostmi: řada testovaných látek má hydrofobní charakter a **rychlost příjmu** těchto látek je ovlivněna složením kultivačního média, které má v případě kvasinek nízké pH, malý obsah proteinů a tuků ve srovnání s médiem pro savčí buňky, což způsobuje jeho nízkou schopnost vázat a transportovat hydrofobní sloučeniny. Pro difúzi hydrofobních sloučenin navíc představuje bariéru kvasinková buněčná stěna. Dále bylo zjištěno, že oba typy testů se liší v **rychlosti metabolismu** některých testovaných sloučenin a v **citlivosti jednotlivých typů receptorů** pocházejících z různých druhů obratlovců [2].

1. Kvasinkové testy

- jsou jednoduché a levné, protože kvasinky nejsou náročné na kultivaci
- jsou citlivé, reprodukovatelné a mohou být použity pro hodnocení látek v širokém rozsahu koncentrací [26, 29]
- jsou receptorově specifické a stanovení tak není rušeno interferencí látek s dalšími endogenními receptory
- kultivují se na médiu, které postrádá steroidní látky [30]

- vykazují větší rezistenci k některým environmentálním kontaminantům jako jsou např. toxické kovy nebo bakteriální endotoxiny [27]

Použití testů v praxi však omezuje řada nevýhod:

- ne vždy jsou kvasinky schopny rozeznat agonisty od antagonistů [6, 26]
- přítomnost kvasinkové buněčné stěny může ovlivnit vstup testovaných látek do buněk [2]
- vyšší práh citlivosti k některým toxickým látkám (např. 4-*n*-nonylfenol a 4-*n*-oktylfenol) má za následek, že kvasinky odumřou dříve, než jsme schopni získat odpověď na potenciál testovaných látek k endokrinní disrupci [6]
- kvasinky postrádají metabolické dráhy zodpovědné za aktivaci některých látek (což je však možné odstranit inkubací testovaných látek s S9 frakcí po 1 hodinu při 37°C ještě před vlastní inkubací s kvasinkami [19])

Fakt, že chybí některé metabolické dráhy, v jejichž důsledku se např. proestrogeny metabolicky aktivují v estrogény, může na první pohled znamenat omezení, na druhé straně však nepřítomnost metabolických drah v testu jasně prokáže, zda za je za pozorovaný účinek zodpovědná látka samotná nebo její metabolický produkt [26].

2. Savčí buněčné linie

- vykazují v testech větší citlivost na řadu sloučenin než kvasinky
- s jejich pomocí můžeme identifikovat potenciálně účinné látky, které vyžadují metabolickou aktivaci [30]
- jsou schopné rozlišit mezi agonisty a antagonisty [6]

Nevýhody jsou spojené s:

- pracným a drahým udržováním buněčných linií, vyžadujícím speciální instrumentaci a striktní dodržení sterilních podmínek při kultivaci [6, 39]
- různorodostí savčích linií, jelikož stejně jako se v různých typech savčích buněk liší skladba kofaktorů a hladiny receptorů, liší se i citlivost k testovaným látkám a tím i odpovědi testů v závislosti na použité buněčné linii [36]
- nutností důkladné extrakce a čištění environmentálních vzorků (vzorků říčních sedimentů) před vlastním provedením testu [39]

Tabulka 1: Přehled kvasinkových biotestů

Typ testu	Transfekce			Princip stanovení	Délka testu (délka inkubace s testovanou látkou)	Reference
	Nukleární receptor	Reportérový gen	Další transfekce			
Testy cytotoxicity	-	-	-	měření absorbance kvasinkové kultury při 600 nm	v závislosti na principu stanovení (2,5 - 24 hodin)	13, 26, 27, 30
	-	gen pro luciferázu světláček rodu <i>Phothinus</i>	-	měření bioluminiscence		35, 36, 37
Test genotoxicity	-	GFP	vymazání PDR5, SNO2, YOR1 genů	měření fluorescence	8 hodin (měření v 60 min. intervalech)	16; 17; 18
		URA3 auxotrofní gen	HRE v promotoru reportérového genu	HRE v promotoru reportérového genu	sledování indukce růstu	5 dní
Specifický test toxicity závislý na aktivaci nukleárního receptoru	steroidní	lacZ gen pro β-galaktosidázu	HRE v promotoru reportérového genu, gen pro RSP5 protein (PR), gen pro SPT3 protein (AR)	měření absorbance produktu (chlorofenol, orthonitrofenol)	24 hodin (celý test 32 hodin)	13; 26; 34
		gen pro GFP protein z mečizny rodu <i>Aequorea</i>	HRE v promotoru reportérového genu	měření intenzity fluorescence	24 hodin	27; 30; 38
		gen pro luciferázu světláček rodu <i>Phothinus</i>	HRE v promotoru reportérového genu	měření bioluminiscence	max. 2,5 hodiny	35; 36; 37
		arylylhdrokarbonový	geny pro β-galaktosidázu, luciferázu	gen pro ARNT protein, DRE v promotoru reportérového genu	závislé na použití reportérovém genu	18 hodin (lacZ gen) 3,5 hodin (gen pro luciferázu)
Analýza transkriptomu metodou microarray	-	-	-	statistické porovnávání mRNA profilů shlukovou analýzou	2 hodiny	21; 22

3 Praktická část

V rámci praktické části, jejímž cílem bylo v oblasti vědeckého zkoumání poprvé charakterizovat kvasinkový model transfekovaný glukokortikoidním receptorem, byl proveden bioluminiscenční test na kvasinkovém modelu rodu *Saccharomyces cerevisiae*, který byl transfekován genem pro glukokortikoidní receptor a genem pro luciferázu. Uvedený bioluminiscenční test vychází z vědecké práce P. Leskinen [35, 36, 37, 39].

Testování bylo prováděno se dvěma referenčními sloučeninami, dexamethasonem a hydrokortizonem. Paralelně se specifickým testem vazby referenčních sloučenin na glukokortikoidní receptor byl proveden test s kontrolním kmenem kvasinek neobsahujícím glukokortikoidní receptor a stabilně vytvářejícím luciferázu (označení *luc*).

Kmeny byly kultivovány dle standardní operační procedury a test byl vyhodnocen v 96-jamkových sérologických destičkách na luminometru s dispensory typu Luminoscan Ascent, DLReady™.

3.1 Popis standardní operační procedury pro kvasinkový test

Testování účinků na různých receptorech kvasinkovým testem se řídí dle standardní operační procedury, která uvádí chemikálie a materiál potřebný pro kultivaci kvasinek, kroky nutné pro přípravu médií a metodologii testování vzorků. Práce se provádí se sterilními nástroji a roztoky za sterilních podmínek v laminárním boxu.

3.1.1 Příprava médií a roztoků

Chemikálie potřebné pro kultivaci a testování kvasinek:

- yeast nitrogen base w/o amino acids (Difco TM)
- yeast synthetic drop-out mix w/o leu, his, ura, trp
- (Difco) Bacto-Agar
- histidin, adenin hemisulfát, leucin, tryptofan, uracil
- glukóza
- D-luciferin
- kyselina citrónová, citrát trissodný
- HCl nebo NaOH pro úpravu pH
- voda

Materiál pro kvasinkové kultury:

- plastové Petriho misky o průměru 10 cm

- klička pro přenos kvasinkových kultur
- lahve na média
- špičky pro mikropipety (a opakovací pipety), mikropipeta a opakovací pipeta
- sterilní zkumavky s víčky
- inkubátor na 30°C pro inkubaci s třepačkou na mikrodestičky

Přístroje:

- Inkubátor na 30°C s třepačkou na mikrodestičky
- Spektrometr (Varian Cary 50 Bio, UV visible spectrophotometr)
- Luminometr s dispensory (Luminoskan Ascent, DLReady™)

Příprava médií:

a) syntetické minimální médium:

6,7 g yeast nitrogen base w/o amino acids se rozpustí v 910 ml vody. Toto množství dodržujeme vždy, když je v bázi přítomen současně síran amonný. Pokud v bázi není přítomen síran amonný, musíme ho 5 g/l přidat a v tomto případě snížíme přidávané množství yeast nitrogen base w/o amino acids na 1,7 g/l. Roztok zautokládujeme a sterilně přidáme příslušný uhlíkový zdroj a nezbytné aminokyseliny (viz tabulka č. 2).

Minimální médium se používá ke kultivaci a testování kvasinek.

b) syntetické komplexní médium:

Do roztoku minimálního media přidáme 1,4 g/l yeast synthetic drop-out mix w/o leu, his, ura, trp. V případě potřeby upravíme pH pomocí HCl a NaOH na 5,6. Roztok zautokládujeme a sterilně přidáme příslušný uhlíkový zdroj a nezbytné aminokyseliny.

Komplexní médium se používá pro přípravu agarových ploten.

Pozn.:

Roztoky aminokyselin se sterilizují přefiltrováním přes filtry o velikosti 0,22 mm. Všechny složky složky médií se uchovávají při pokojové teplotě, kromě tryptofanu, který je nutno uchovávat při +4°C. Při kultivaci kontrolního kmene *luc* se jak do minimálního, tak komplexního média přidává navíc aminokyselina tryptofan.

Tabulka 2: Roztoky na doplnění média

Přidávky do média	Zdroj uhlíku	Koncentrace roztoků	Kmen
50 ml/l	glukóza	40 % w/v (40 g/ 100 ml konečného objemu)	ER, AR, GR, luc
	100x koncentrované AMK		
10 ml/l	histidin	2 g/l	ER, AR, GR, luc
10 ml/l	adenin	5 g/l	ER, AR, GR, luc
10 ml/l	leucin	10 g/l	ER, AR, GR, luc
10 ml/l	tryptofan	2 g/l	luc

Pozn. *luc* = BMA64luc, ER = BMAEREluc/ER α , AR = BMAAREluc/AR, GR

Příprava 2x koncentrovaného luciferázového zásobního roztoku (0,002 M):

Do 0,2 M roztoku pufru citrátu sodného o pH 5, který připravíme smícháním 35 ml 0,2 M kyseliny citronové s 65 ml 0,2 M roztoku citrátu trissodného, se přidá D-luciferin do konečné koncentrace 0,002 M. Roztok se míchá pomocí magnetické míchačky tak dlouho, dokud se luciferin nerozpustí. Výsledný roztok se uchovává při -20°C v 5-ti ml aliquotech.

Pozn.:

D-luciferin je citlivý na světlo a proto je nutné ho během přípravy před světlem chránit.

Příprava 1x koncentrovaného roztoku luciferinu (0,001 M):

5 ml 2x koncentrovaného luciferinového roztoku se ještě před měřením v luminometru smíchá s 5 ml destilované vody.

Pozn.:

Rozmrazený luciferin může být uchováván v mrazáku po několik dní.

3.1.2 Příprava agarových ploten

20 g bakteriálního agaru/l konečného objemu se naváží do lahve a přidá příslušné množství komplexního média bez přidaného cukru a aminokyselin. Láhev se neplní víc než do poloviny celkového objemu, protože agar během autoklávování bobtná. Láhev se autoklávuje jako kapaliny. S vysterilizovanými lahvemi se pracuje za sterilních podmínek v laminárním boxu. Teprve po vychladnutí se do obsahu agaru přidává příslušný zdroj uhlíku a aminokyseliny. Obsah lahve se promíchá a naleje na připravené sterilní Petriho misky o průměru 10 cm, cca 30 ml agarového roztoku na 1 misku (zhruba 0,5 cm vrstvy). Misky se v laminárním boxu nechávají odkryté a přikrývají se až po dostatečném vysušení a ztuhnutí agaru. Uchovávání probíhá za pokojové teploty dnem vzhůru (agarovou stranou nahoru).

3.1.3 Zahájení kultivace ze zamražené kultury

Zamražené kultury se vyjmou z mrazáku a po celou dobu manipulace se udržují na ledu, aby neroztály. V laminárním boxu se sterilní tyčkou seškrábne malý počet buněk zmrzlé kultury z povrchu. Seškrábnuté množství se přenesse na ztuhlý agar a rozetře křížovým roztěrem. Zbývající zmrzlá kultura se vrátí zpátky do -70°C do mrazáku a agarové plotny se kultivují dnem vzhůru ve 30°C po 2 dny ve tmě do velikosti kolonií asi 1 mm. Naočkované agarové plotny se uchovávají v ledničce při 4°C max. po dobu 3 týdnů.

3.1.4 Zahájení pre-kultivace pro test z agarové plotny

Do sterilní zkumavky se odměří asi 3 ml minimálního média. Pomocí sterilní tyčky se vybere samostatná kvasinková kolonie z agarové plotny a přenesse se do tekutého média v baňce nebo zkumavce s víčkem, přičemž víčko se neutěšňuje úplně. Buňky se rozsuspendují pomocí sterilní tyčky a baňka či zkumavka s víčkem se nechá inkubovat ve tmě při 30°C s mírným třepáním.

3.1.5 Testování vzorků na kvasinkách

Testování látek je prováděno v 96-jamkových kultivačních deskách, celý test od přichystání roztoku kvasinek o příslušné optické hustotě až po změření aktivity luciferázy trvá 5h. Narostlá kvasinková prekultura v minimálním mediu se 20x naředí a změří se $\text{OD}_{600\text{nm}}$. Měření OD u kvasinek jsou lineární jen do hodnoty $\text{OD}_{600\text{nm}}=0,3$. Vyšší $\text{OD}_{600\text{nm}}$ odezvy nejsou lineární, v tom případě je potřeba roztok pro měření více rozředit. Z naměřených hodnot OD se vypočítá rozředění v minimálním mediu o teplotě 30°C pro celou desku, popř. desky. Rozředění musí být takové, aby konečná hodnota $\text{OD}_{600\text{nm}}$ kultury byla okolo 0,4. Takto připravené kultury se dají zpátky třepat do inkubátoru při teplotě 30°C do tmy na 2 hodiny k dosažení $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 0,6 - 0,7. Pomocí opakovací pipety se na sérologickou destičku do každé jamky pipetuje 100 μl kvasinkové kultury a přidává se 1 μl vzorku zředěného v MeOH. Finální koncentrace MeOH v jamce nesmí přesáhnout 1 %. V případě negativní kontroly se ke 100 μl kvasinkové kultuře přidává 1 μl rozpouštědla do každé jamky a to pro testy cytotoxicity v 6 – 9 opakováních. V případě pozitivní kontroly se ke 100 μl kvasinkové kultury přidává referenční sloučenina, nejméně v 6 různých koncentracích v rozsahu 0,01 – 1000 nM pro sestavení kalibrační křivky. Destička se přikryje páskou nebo víčkem a nechá se třepat 20 s na třepačce. Inkubace probíhá při 30°C ve tmě po dobu 2,5 hodiny. Po inkubaci s využitím dispenzorů v luminometru se vstříkuje 100 μl 1 mM

roztoku luciferinu do každé jamky. Měření v luminometru probíhá ihned – odpověď vzorku je stálá pouze okolo 5 min.

3.1.6 Metodika testování modelových látek na GR

Testování proběhlo na 4 různých zásobních kvasinkových kulturách rodu *Saccharomyces cerevisiae* označených zkratkami *GR 1*, *GR 2*, *GR 3*, *GR 4*, které byly pro účely bioluminiscenčního testu transfekovány GR a genem pro luciferázu. Kvasinkové kultury byly kultivovány dle standardní operační procedury.

Jako modelové sloučeniny byly použity léčivo - dexamethason a přirozený hormon - hydrokortison, z nichž byla rozpuštěním v metanolu připravena kalibrační řada nejprve 6 koncentrací v rozmezí od $1,65 \cdot 10^{-6}$ – $4 \cdot 10^{-4}$ M. Výsledky tohoto předběžného testu však ukázaly, že pro nejvyšší připravenou koncentraci nebylo dosaženo platu, a proto byl následně připraven ještě jeden koncentrovanější roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ M, což však byla nejvyšší koncentrace, při které ještě bylo možné obě sloučeniny rozpustit.

Všechny 4 zásobní kvasinkové kultury byly tedy předběžně exponovány oběma modelovým sloučeninám v rozmezí koncentrací $1,65 \cdot 10^{-6}$ – $4 \cdot 10^{-4}$ M. Pro *GR 3* byla provedena 2 opakování v rámci každé modelové sloučeniny. Předběžný test tedy nezahrnoval nejvyšší koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ M, která byla testována až dodatečně na *GR 1* a *GR 3* společně s předchozími 6 koncentracemi pro obě modelové sloučeniny teprve po vyhodnocení výsledků z předběžného testování. Pro *GR 1* byla tedy provedena celkem 2 opakování, pro *GR 2* 1 opakování, pro *GR 3* celkem 3 opakování a pro *GR 4* 1 opakování (dohromady tedy 7 opakování v rámci každé modelové sloučeniny). Test byl proveden v 96-jamkových sérologických destičkách, přičemž do každé jamky bylo opakovací pipetou vstříknuto 100 μ l příslušné kvasinkové kultury a 1 μ l z připravených kalibračních roztoků pro obě modelové sloučeniny.

V rámci testování byla rovněž provedena zkouška cytotoxicity s kontrolním kvasinkovým kmenem *luc* pro 3 testované koncentrace obou standardních látek ($1 \cdot 10^{-6}$ M, $1 \cdot 10^{-5}$ M, $1 \cdot 10^{-4}$ M) ve srovnání s rozpouštědlovým blankem (methanol), pro nějž bylo již dříve prokázáno, že v koncentracích nepřesahujících 1 % nepůsobuje cytotoxicitu.

Expozice probíhala standardně 2,5 hodiny bez přístupu světla v inkubátoru při teplotě 30°C. Po inkubaci bylo s využitím dispensorů v luminometru vstříknuto 100 μ l 1 mM roztoku luciferinu do každé jamky a ihned provedeno měření bioluminiscence.

Z dosažených křivek dávka-odpověď byly vyhodnoceny průměrné hodnoty EC25, EC50, EC75. Ke každé z hodnot byly spočítány odpovídající směrodatné odchylky. Hodnoty NOEC a LOEC byly zjištěny statisticky (ANOVA). Homogenita rozptylu byla testována pomocí Levenova testu.

Pro každou kulturu byly spočítány násobky indukce (fold induction) podělením hodnoty pro nejvyšší luminiscenci indukované v přítomnosti testované látky hodnotou luminiscence pro rozpouštědlovou kontrolu.

V rámci charakterizace kvasinkového modelu bylo také provedeno srovnání všech 4 kvasinkových kultur pro oba standardy.

3.2 Výsledky a vyhodnocení

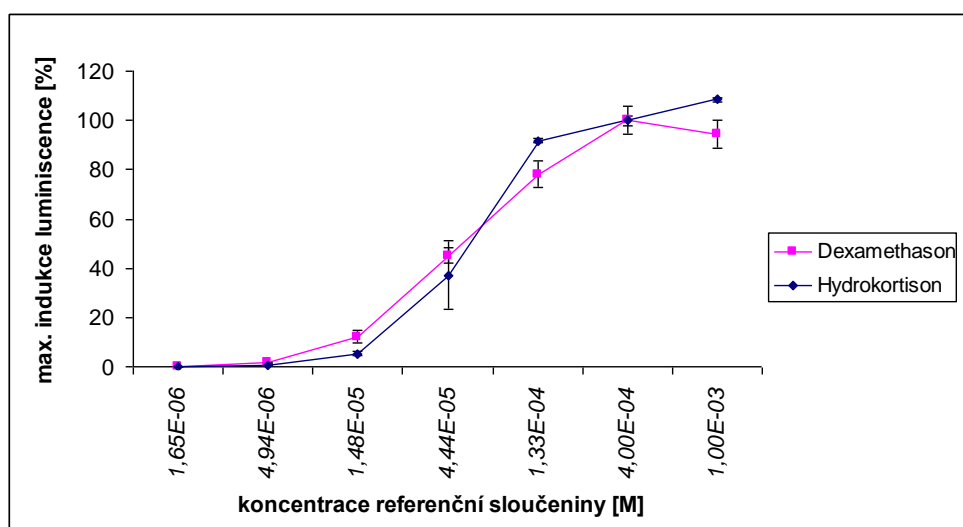
Koncentrace $1 \cdot 10^{-3}$ M byla nejvyšší možná koncentrace, při které se ještě podařilo obě modelové sloučeniny rozpustit, avšak při které již docházelo u dexamethasonu k poklesu bioluminiscence. Kalibrační křivka pro hydrokortison sice nadále mírně stoupala, ale vzhledem k problematické rozpustnosti nebylo možné určit koncentraci, na níž je dosaženo plato (graf 1).

Pro každou modelovou sloučeninu bylo prokázáno 7 křivek dávka-odpověď. Maximální odpověď byla dosažena pro dexamethason při koncentraci $4 \cdot 10^{-4}$ M. Maximální odpověď pro hydrokortison nebylo možné určit přesně vzhledem k problematické rozpustnosti.

Hodnoty EC25, EC50, EC75 byly spočítány jak pro dexamethason, tak i pro hydrokortison z lineární oblasti ležící v rozmezí koncentrací $1,48 \cdot 10^{-5}$ M až $1,33 \cdot 10^{-4}$ M (tabulka 3). Hodnota EC50 činila $5 \cdot 10^{-5}$ M pro dexamethason a $7,2 \cdot 10^{-5}$ M pro hydrokortison, přičemž nižší hodnoty vypočítaných směrodatných odchylek pro dexamethason prokázaly přesnější stanovení pro tento standard (tabulka 4). Hodnoty EC25, EC50, EC75 byly porovnatelné pro obě modelové látky, přičemž systematicky nižší hodnoty pro dexamethason mohou znamenat mírně větší citlivost kvasinkového modelu pro tento použitý standard (tabulka 4, graf 2).

Hodnoty LOEC byly pro oba standardy statisticky prokázány u koncentrace $4,94 \cdot 10^{-6}$ M. Hodnoty NOEC tedy odpovídají koncentraci $1,65 \cdot 10^{-6}$ M (tabulka 3). Výsledek zkoušky cytotoxicity pro koncentrace $1 \cdot 10^{-6}$ M, $1 \cdot 10^{-5}$ M, $1 \cdot 10^{-4}$ M byl u obou standardů negativní, tzn., že indukce luminiscence kmene *luc* pro methanol a 3 zmíněné testované koncentrace pro oba standardy se významně nelišila (graf 3).

Koncentrace 4.10^{-4} M indukovala ve všech zásobních kulturách nejvyšší luminiscenci (vyjádřenou v jednotkách RLU), a to v rozmezí 2,35 – 8,76 pro dexamethason a 2,27 – 7,93 pro hydrokortison (graf č. 4 a 6). Nejvyšší indukce luminiscence byla u obou standardů zaznamenaná pro *GR 1* a byla zhruba 4x vyšší než nejnižší indukce luminiscence zaznamenaná pro *GR 3* (graf č. 4 a 6). Normalizací na maximální indukci však byla prokázána shodná odezva u všech testovaných kultur (graf č. 5 a 7).



Graf 1: Ukázková kalibrační křivka pro dexamethason a hydrokortison. Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku maximální indukce luminiscence.

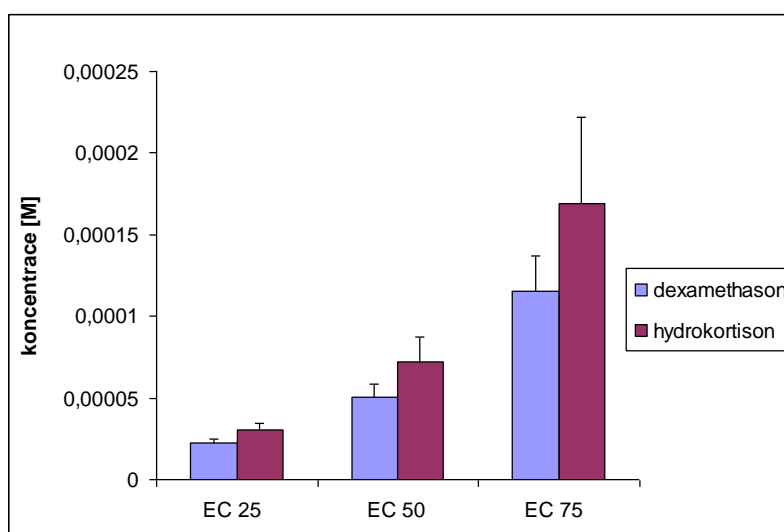
Tabulka 3: Charakterizace kalibrační křivky a obou použitých standardů

NOEC	$1,65.10^{-6}$ M
LOEC	$4,94.10^{-6}$ M
Koncentrace na níž je dosaženo plato (maximum odpovědi)	4.10^{-4} - 1.10^{-3} M
Rozsah lineární odpovědi	$1,48.10^{-5}$ - $1,33.10^{-4}$ M
Používaný standard	dexamethason a hydrokortison rozpuštěné v methanolu
Finální koncentrace rozpouštědla	1%
Rozmezí testovaných koncentrací	$1,66.10^{-6}$ - 1.10^{-3} M

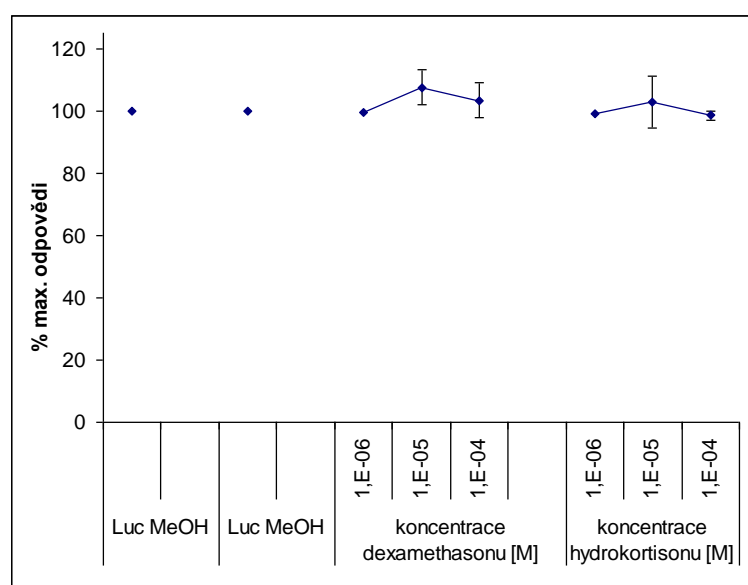
Tabulka 4: Průměrné hodnoty EC25, EC50, EC75 pro dexamethason a hydrokortison

	Dexamethason [M]		
	EC 25	EC 50	EC 75
Průměr (ze 7 měření)	$2,2E-05$	$5,0E-05$	$1,2E-04$
Směrodatná odchylka	$3,0E-06$	$8,0E-06$	$2,2E-05$

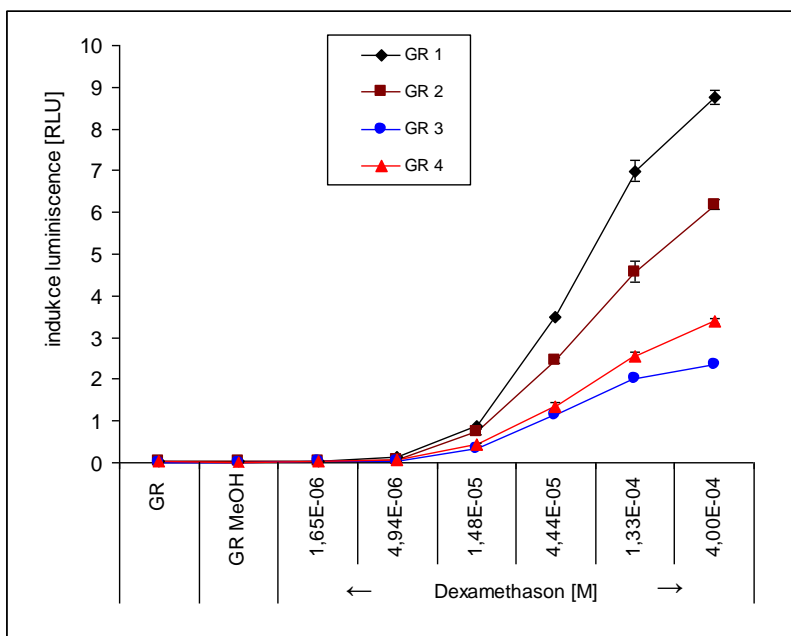
Hydrokortison [M]			
	EC 25	EC 50	EC 75
Průměr (ze 7 měření)	3,0817E-05	7,2E-05	1,7E-04
Směrodatná odchylka	3,6974E-06	1,6E-05	5,3E-05



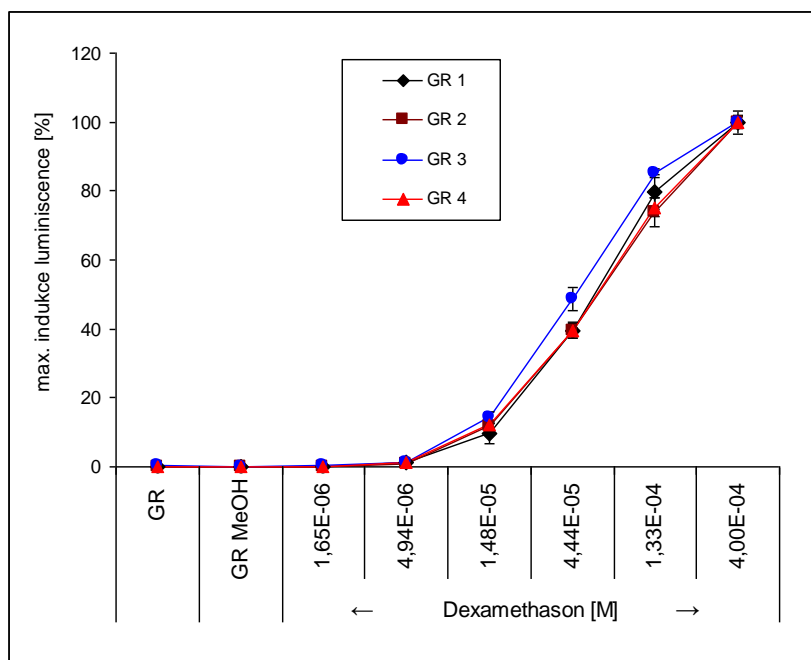
Graf 2: Grafické srovnání hodnot EC25, EC50, EC75 pro dexamethason a hydrokortison.



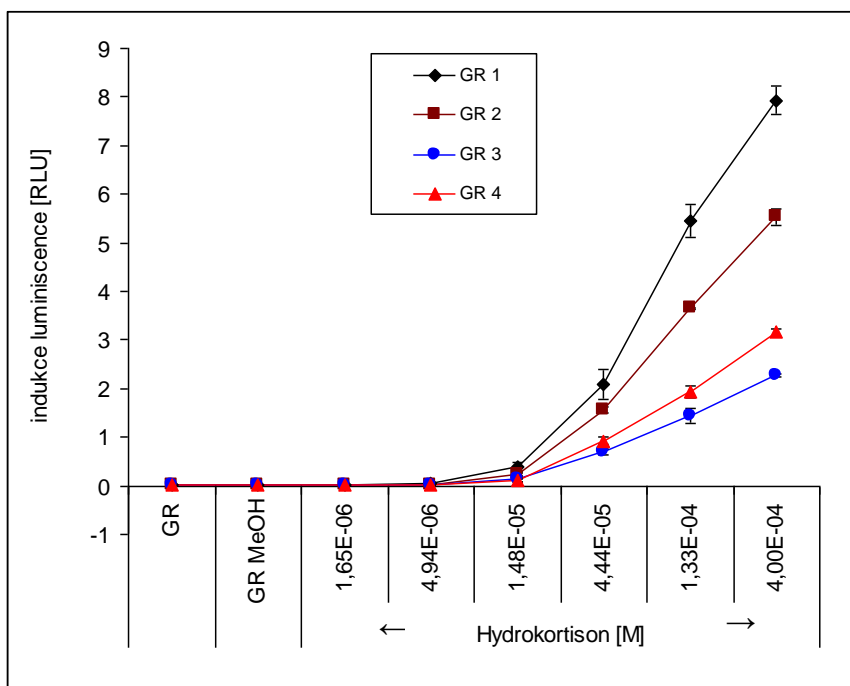
Graf 3: Zkouška cytotoxicity kontrolního kmene *luc* pro 3 testované koncentrace obou referenčních sloučenin ($1 \cdot 10^{-6}$ M, $1 \cdot 10^{-5}$ M, $1 \cdot 10^{-4}$ M) ve srovnání s rozpouštědlovou kontrolou. Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku.



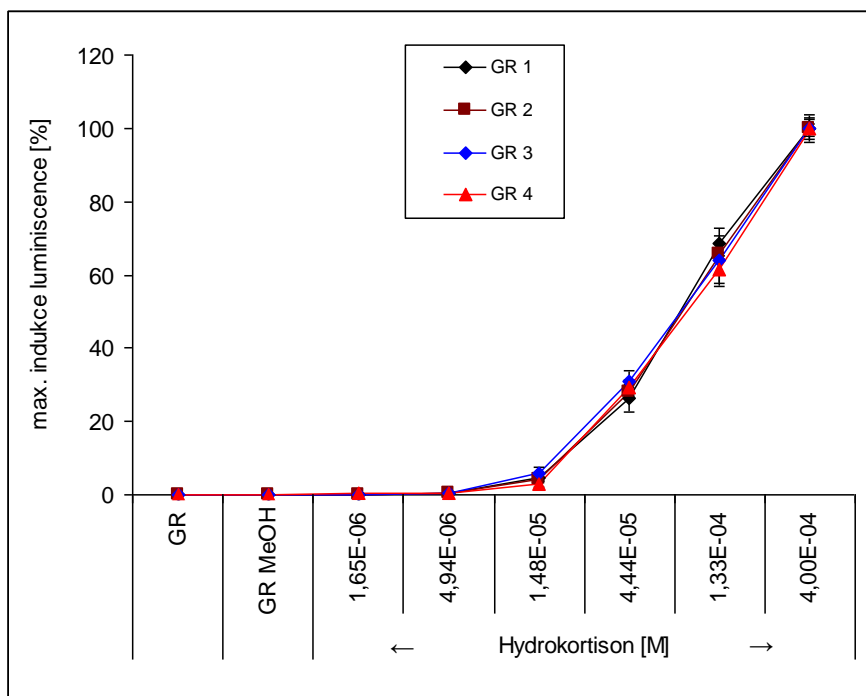
Graf č. 4: Srovnání odpovědi kvasinkových kultur na expozici dexamethasonem. Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku.



Graf č. 5: Srovnání odpovědi kvasinkových kultur na expozici dexamethasonem s normalizací na maximální indukci luminescence. Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku.



Graf č. 6: Srovnání odpovědi kvasinkových kultur na expozici hydrokortisonem. Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku.



Graf č. 7: Srovnání odpovědí kvasinkových kultur na expozici hydrokortisonem s normalizací na maximální indukci luminescence. Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku.

Shrnutí a závěr

Kvasinky jakožto mikroskopické eukaryotické organismy objevené v 17. století Antony van Leeuwenhoekem se řadí do říše Fungi, v rámci které tvoří taxonomicky nejednotnou skupinu. Ačkoli kvasinky patří k nejnižším Eukaryotům, uchovaly si mnoho genů a proteinů, které sdílejí společně s vyššími Eukaryoty [4], a představují tak do jisté míry relevantní druhy v souvislosti s možnými extrapolacemi na živočichy. Na druhé straně narozdíl od jiných Eukaryot u nich nebyla prokázána skupinová translokace [1], ani přítomnost aromatasý [6] a mitóza na rozdíl od Eukaryot probíhá uzavřeně stejně jako u ostatních hub [3]. Od živočišných Eukaryot se dále odlišují přítomností buněčné stěny dominantně tvořené mannanem a β -(1,3)(1,6)-glukany a vakuol, které však zastávají funkci živočišných lysozomů. Cytologie kvasinkových buněk se však až na přítomnost buněčné stěny výrazným způsobem neliší od vnitrobuněčného uspořádání vyšších Eukaryot. Biologie kvasinek, především morfologie buňky, délka buněčného cyklu a rozmnožování je u kvasinek do značné míry závislá na charakteru vnějších podmínek (popř. kultivačních podmínek).

V ekotoxikologii se kvasinky uplatňují především v oblasti stanovování genotoxicity látek a specifických mechanismů toxicity závislých na aktivaci nukleárních receptorů, s paralelním prováděním kontrolních testů cytotoxicity, které slouží ke stanovení hodnoty EC50 testovaných sloučenin a pro odhalení toxicity pro buňku, která by mohla ovlivnit výsledky pozorovaných specifických účinků. Kromě výše uvedených testů existuje i snaha využít kvasinky pro studium stárnutí eukaryotických buněk a pro analýzu transkriptomu metodou microarray.

Na rozdíl od testu genotoxicity, kde se jako jediný reportérový gen dosud používá gen pro GFP protein, je ve specifických testech toxicity závislých na aktivaci nukleárních receptorů na výběr kromě genu pro GFP také nejdéle používaný gen pro β -galaktosidázu a gen pro luciferázu.

I přes všechna vylepšení, úpravy designu experimentu a velkou citlivost zůstává velkou nevýhodou β -galaktosidázového testu jeho doba trvání. Oproti tomu bioluminiscenční test se zdá být z uvedeného výběru testů nejrychlejší, avšak za cenu přídatku drahého luciferinu do média. Ze srovnávací studie provedené na kvasinkovém modelu transfekovaném estrogenním receptorem a jednotlivými reportérovými geny vyplývá z hodnot EC50 vypočítaných z jednotlivých křivek dávka-odpověď pro 17β -estradiol stejná citlivost β -galaktosidázového a bioluminiscenčního testu. Fluorescenční test oproti tomu vykazoval nižší citlivost pro 17β -estradiol [30].

V souvislosti s používanými transfekcemi nukleárních receptorů do kvasinkových buněk je bezesporu nejvíce informací ohledně specifických testů toxicity závislé na aktivaci estrogenního a androgenního receptoru, méně informací pak existuje o aktivaci progesteronového a thyroidního receptoru. V souvislosti s kvasinkovým modelem transfekovaným glukokortikoidním receptorem žádné informace nejsou známy nebo dosud nebyly publikovány.

Výsledky prezentované v praktické části této bakalářské práce, jejímž cílem bylo charakterizovat kvasinkový model transfekovaný GR, zahrnují jednak prokázané křivky dávka-odpověď pro oba standardy (dexamethason a hydrokortison), jednak srovnání 4 vybraných kvasinkových kultur. Srovnáním 4 použitých kultur bylo zjištěno, že i když se luminiscence indukovaná standardy pro jednotlivé kultury lišila, normalizace na maximální indukci luminiscence prokázala shodnou odezvu u všech použitých kultur a tím i dobrou porovnatelnost výsledků. Vyhodnocením získaných křivek dávka-odpověď bylo dále zjištěno, že citlivost kvasinek na glukokortikoidní hormony leží řádově v rozmezí 10^{-6} – 10^{-3} M, což je několikanásobně více než citlivost kvasinek transfekovaných receptory komunikujícími s pohlavními hormony.

Ze srovnání kvasinek a savčích buněk jako modelových organismů používaných pro specifické testy toxicity závislé na aktivaci steroidních receptorů jednoznačně nevyplývá, který z modelových organismů je pro tento typ testu vhodnější. Oba modelové organismy mají své specifické výhody, ale i nevýhody, které je nutné zohlednit při interpretaci výsledků uvedených testů pro jednotlivé typy testovaných sloučenin či komplexních směsí.

Anotace

Kvasinky jsou mikroskopické organismy s eukaryotickou stavbou buněk, které v rámci říše *Fungi* tvoří nejednotnou taxonomickou skupinu a jejichž biologie je do značné míry závislá na charakteru vnějších podmínek. Představují důležitý modelový organismus při studiu biologie eukaryotických buněk díky dobře prostudovanému genomu a snadné kultivaci. V oblasti ekotoxikologie se kvasinky především používají v *in vitro* testech pro stanovení genotoxicity a specifických mechanismů toxicity závislých na aktivaci nukleárních receptorů pomocí transfekovaných reportérových genů. Oproti testům genotoxicity pracujícím na stejném principu s bakteriemi představují jako zástupci Eukaryot více relevantní organismy. V případě testů interakce testovaných sloučenin s nukleárními receptory je jejich velkou předností oproti obdobně prováděným testům na buňkách savčích linií jejich receptorová specifita a snadná kultivace navíc na médiu neobsahujícím steroidní látky. V rámci praktické části bakalářské práce byl v bioluminiscenčním testu poprvé charakterizován kvasinkový model transfekovaný GR prokázáním křivky dávka-odpověď pro standardní sloučeniny dexamethason a hydrokortison.

Anotation

Yeasts are eucaryotic microscopic organisms, which don't form united taxonomic group in the kingdom of *Fungi*. The biology of these organisms is mostly dependent on the character of external conditions. Yeasts are important model organisms which are used for studying biology of eukaryotic cells especially because of their easy cultivation and well-known genom. In the area of ecotoxicology yeasts are used primarily in *in vitro* assays for detection of genotoxicity and in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assays. In assays assessing genotoxic potential of tested compounds yeasts as representatives of Eucaryotes are more relevant organisms than bacteria which are used in assays in a similar way. Ease of cultivation, use of medium lacking steroids and receptor's specificity are important advantages of yeast models in steroid hormone receptor gene transcription assays in comparison with similar *in vitro* assays using mammalian cells as model organisms. In practical part of this bachelor thesis the yeast model transfected by GR was characterized in yeast bioluminescent assay. The dose-response curves were demonstrated on two standards, dexamethason and hydrocortisone.

Použitá literatura:

1. Janderová, B., Bendová, O.: Úvod do biologie kvasinek. Praha: Nakladatelství Karolinum, 1999.
2. Misaki, K., Kawami, H., Tanaka, T., Handa, Y., Nakamura, M., Matsui, S., Matsuda, T., 2007. Aryl hydrocarbon receptor ligand activity of polycyclic aromatic ketones and polycyclic aromatic quinones. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 26 (7), 1370-1379.
3. Kalina, T., Váňa, J.: Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2005.
4. Eung, J.Y., Yeun, K.J., Hyun, S.K., Eun, S.C. and Sang, D.P., 2002. Development of a new xenoestrogen screening system using fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecules and cells*. 13 (1), 148-153.
5. Fujita, K., Nagaoka, M., Komatu, Y. and Iwahashi, H., 2003. Yeast pheromone signaling pathway as a bioassay to assess the effects of chemicals on mammalian peptide hormones. *Ecotoxicology and environmental safety*. 56, 358-366.
6. Andersen, H.R. et al., 1999. Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environmental health perspectives*. 107 (1), 89-108.
7. Šilhánková, L.: Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Praha: Nakladatelství Academia, 2002.
8. Kocková-Kratochvílová, A.: Yeasts and yeast-like Organisms. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1990.
9. McKane, L., Kandel, J.: Microbiology. Essentials and applications. United States of America: McGraw-Hill, Inc., 1996.
10. Rosypal, S. a kol.: Nový přehled biologie. Praha: pedagogické nakladatelství Scientia, 2003.
11. Momose, Y., Iwahashi, H., 2001. Bioassay of cadmium using DNA microarray: genome-wide expression patterns of *Saccharomyces cerevisiae* response to cadmium. *Environmental toxicology and chemistry*, 20 (10), 2353-2360.
12. Schmitt, M., Gellert, G., Ludwig, J., Lichtenberg-Fraté, H., 2004. Phenotypic yeast growth analysis for chronic toxicity testing. *Ecotoxicology and environmental safety*. 59, 142-150.

13. Routledge, E.J., Sumpter, J.P., 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental toxicology and chemistry*. 15 (3), 241-248.
14. Iwahashi, H., Ishidou, E., Kitagawa, E., Momose, Y., 2007. Combined cadmium and thiuram show synergistic toxicity and induce mitochondrial petite mutants. *Environmental Science & Technology*. 41,7941-7946.
15. Schmitt, M., Gellert, G., Ludwig, J., Lichtenberg-Fraté, H., 2005. Assessment of cyto- and genotoxic effects of a variety of chemicals using *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta hydrochim. Hydrobiol.* 33 (1), 56-63.
16. Afanassiev, V., Sefton, M., Anantachaiyong, T., Barker, G., Walmsley, R., Wöfl, S., 2000. Application of yeast cells transformed with GFP expression constructs containing the RAD54 or RNR2 promoter as a test for genotoxic potential of chemical substances. *Mutation Research*. 464, 297-308.
17. Lichtenberg-Fraté, H., Schmitt, M., Gellert, G., Ludwig, J., 2003. A yeast-based Method for the detection of cyto and genotoxicity. *Toxicology in vitro*. 17, 709-716.
18. Schmitt, M., Gellert, G., Lichtenberg-Fraté, H., 2005. The toxic potential of an industrial effluent determined with the *Saccharomyces cerevisiae*-based assay. *Water research*. 39, 3211-3218.
19. Shiraishi, F., Okumura, T., Nomachi, M., Serizawa, S., Nishikawa, J., Edmonds, J.S., Shiraishi, H., Morita, M., 2003. Estrogenic and thyroid hormone activity of a series of hydroxyl-polychlorinated biphenyls. *Chemosphere*. 52, 33-42.
20. Iwahashi, H., Fujita, K., Takahashi, Y., 2000. Bioassay for chemical toxicity using yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Water science and technology*. 42 (7-8), 269-276.
21. Nuwaysir, E.F., Bittner, M., Trent, J., Barrett, J.C., Afshari, C. A., 1999. Microarrays and toxicology: The advent of toxicogenomics. 24, 153-159.
22. Sirisattha, S., Momose, Y., Kitagawa, E., Iwahashi, H., 2004. Toxicity of anionic detergents determined by *Saccharomyces cerevisiae* microarray analysis. *Water Research* 38, 61-67.
23. Piper, W.P., 2006. Long-lived yeast as a model for ageing research. *Yeast*. 23, 215-226.
24. MacLean, M., Harris N., Piper, P.W., 2001. Chronological lifespan of stationary phase yeast cells; a model for investigating the factors that might influence the ageing of postmitotic tissues in higher organisms. *Yeast*. 18, 499-509.
25. Fabrizio, P., Longo, V.D., 2003. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell*. 2, 73-81.

26. Gaido, K.W., Leopard, L.S., Lovell, S., Gould, J.C., Babai, D., Portier, Ch.J., McDonnell, D.P., 1997. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicology and applied pharmacology*. 143, 205-212.
27. Bovee, T.F.H., Helsdingen, R.J.R., Rietjens, I.M.C.M., Keijer, J., Hoogenboom, R.L.A.P., 2004. Rapid yeast estrogen bioassays stably expressing human estrogen receptors α and β , and green fluorescent protein: a comparison of different compounds with both receptor types. *Journal of steroid biochemistry & molecular biology*. 91, 99-109.
28. Colborn, T., vom Saal, F.S., Soto, A.M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental health perspectives*. 101 (5), 378-384.
29. Arnold, S.F., Robinson, M.K., Notides, A.C., Guillette, Jr, L.J., McLachlan, J.A., 1996. A yeast estrogen screen for examining the relative exposure of cells to natural and xenoestrogens. *Environmental health perspectives*. 104, 544-548.
30. Bovee, T.F.H., Helsdingen, R.J.R., Koks, P.D., Kuiper, H.A., Hoogenboom, R.L.A.P., Keijer, J., 2004. Development of a rapid yeast estrogen bioassay, based on the expression of green fluorescent protein. *Gene* 325, 187-200.
31. Wang, J., Xie, P., Kettrup, A., Schramm, K.-W., 2005. Evaluation of soot particles of biomass fuels with endocrine-modulating activity in yeast-based bioassay. *Analytical & bioanalytical chemistry*. 381,1609-1618.
32. Conner, K., Howell, I., Chen, I., Liu, H., Berhane, K., Sciarretta, C., Safe, S and Zacharewski, T., 1995. Failure of chloro-S-triazine-derived compounds to induce estrogen receptor-mediated response *in vivo* and *in vitro*. *Fundamental and applied toxicology*. 30, 93-101.
33. Zacharewski, T.R., Meek, M.D., Clemons, J.H., Wu, Z.F., Fielden, M.R and Matthews, J.B., 1998. Examination of the *in vitro* and *in vivo* estrogenic activities of eight commercial phthalate esters. *Toxicological science*. 46, 282-293.
34. De Boever, P., Demaré, W., Vanderperren, E., Cooreman, K., Bossier, P., Verstraete, W., 2001. Optimization of a yeast estrogen screen and its applicability to study the release of estrogenic isoflavones from a soygerm powder. *Environmental Health Perspectives*. 109 (7), 691-697.
35. Michelini, E., Leskinen, P., Virta, M., Karp, M., Roda, A., 2005. A new recombinant cell-based bioluminescent assay for sensitive androgen-like compounds detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 20, 2261-2267.

36. Leskinen, P., Michelini, E., Picard, D., Karp, M., Virta, M., 2005. Bioluminescent yeast assay for detecting estrogenic and androgenic activity in different matrices. *Chemosphere*. 61, 259-266.
37. Leskinen, P., Virta, M., Karp, M., 2003. One-step measurement of firefly luciferase activity in yeast. *Yeast*. 20, 1109-1113.
38. Bovee, T.F.H., Helsdingen R.J.R., Hamers, A.R.M., van Duursen, M.B.M., Nielen, M.W.F., Hoogenboom, R.L.A.P., 2007. A new highly specific and robust yeast androgen bioassay for the detection of agonists and antagonists. *Analytical & bioanalytical chemistry*. 389, 1549-1558.
39. Leskinen, P., Hilscherova, K., Sidlova, T., Kiviranta, H., Pessala, P., Salo, S., Virta, M., Virta, M., 2008. Detecting AhR ligand in sediments using bioluminescent reporter yeast. *Biosensors and bioelectronics*. 23, 1850-1855.
40. Mandal, P.K., 2005. Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *Journal of comparative physiology B: biochemical, systemic, and environmental physiology*. 175, 221-230.
41. Alnafisi, A., Hughes, J., Wang, G., Miller, Ch.A., 2007. Evaluating polycyclic aromatic hydrocarbon using a yeast bioassay. *Environmental chemistry*. 26 (7), 1333-1339.