

VYUŽITÍ REPORTÉROVÝCH TESTŮ PŘI SLEDOVÁNÍ BUNĚČNÉHO STRESU A TOXICITY

DENISA ČÁKOVÁ, NIKOLA JELENOVÁ a JITKA VIKTOROVÁ

Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6, Česká republika
prokesoj@vscht.cz

Došlo 27.9.22, přijato 11.5.23.

Sledovat ovlivnění či průběh genové exprese je v mnoha studiích velmi důležitou součástí výzkumu. V současné době dochází k rozvoji mnoha metod usnadňujících sledování regulace genové exprese, jedním z takových příkladů je využití tzv. genových reportérových testů (z angl. gene reporter assays). Tyto systémy představují rozsáhlý soubor nástrojů ke studiu regulačních sekvencí promotorů, zesilovačů a transkripčních faktorů. Existuje celá řada testů využívajících reportérové buňky pro stanovení biologické aktivity studovaných sloučenin. Cílem tohoto přehledového článku je představit přípravu reportérových plasmidů, což je vždy prvním krokem u testů využívajících reportérové geny. Následně budou popsány nejčastější druhy reportérových testů a představeny příklady jejich použití v testování *in vitro*.

Klíčová slova: plasmid, regulace genové exprese, transfekce, luciferasa, *in vitro* test, reportér, genotoxicita, poškození DNA

Obsah

1. Úvod
2. Plasmid a jeho použití pro přenos genetické informace
3. Druhy reportérových testů
 - 3.1. Luciferasa (EC 1.13.12.7)
 - 3.2. Zelený fluorescenční protein
4. Příklady reportérových testů
 - 4.1. SOS chromotest/Umu test
 - 4.2. VITOTOX test
 - 4.3. Test ToxTracker
 - 4.4. Reportérové vektory pGL4
 - 4.5. Signal Finder Stress & Toxicity 10-pathway Reporter Array
5. Závěr

1. Úvod

Regulace genové exprese v eukaryotních buňkách je v rámci buněčné signalizace zajišťována prostřednictvím vazby transkripčních faktorů do tzv. promotorové oblasti genu, čímž dojde ke spuštění či potlačení exprese daného genu¹. Sledovat ovlivnění či průběh genové exprese je v mnoha studiích velmi důležitou součástí výzkumu. Jako nejjednodušší přístup se často volí kvantifikace semi-/finálního produktu genu (mRNA či proteinu) příslušnými technikami molekulární biologie (např. kvantitativní polymerasová reakce po reverzní transkripci mRNA, RT-qPCR či Western blot). Tento přístup má ovšem řadu limitací,

kupříkladu neschopnost sledování molekulárních mechanismů zapojených do procesu regulace genové exprese.

V současné době dochází k rozvoji mnoha metod usnadňujících sledování regulace genové exprese. Jedním z takových příkladů je využití tzv. genových reportérových testů (z angl. gene reporter assays). Jak již název napovídá, jedná se o systém, který informuje (reportuje) o genové expresi. Tyto systémy představují rozsáhlý soubor nástrojů ke studiu regulačních sekvencí promotorů, zesilovačů a transkripčních faktorů. Při přípravě bakteriálních i eukaryotních buněčných linií pro vznik reportérových testovacích systémů genotoxicity využíváme známé biomarkery, které díky toxicitě vzorku produkují snadno kvantifikovatelný signál. Reportérový gen je umístěn pod kontrolou promotoru cílového genu. Vizualizace specifických drah, aktivovaných buněčnou stresovou odezvou po reakci na poškození, poskytuje pohled na typ a rozsah indukovaného poškození buněk, a tedy na biologickou aktivitu sloučenin².

Bakterie jsou vhodnými akceptory reportérů díky svým rychlým reakcím, nízké ceně, jednoduchému uchování a snadné genetické manipulaci. K dispozici je však i spousta eukaryotních kmenů, příkladem může být rekombinantní kvasinkový kmen *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 s reportérovým plasmidem s genem pro zelený fluorescenční protein (GFP), řízeným promotorem ribonukleotid-difosfátoreduktasy (RNR3) reagujícím na poškození DNA (cit.³). V lidských buňkách hepatocelulárního karcinomu (linie HepG2) byly připraveny různé sublinie založené na vysoce výkonných luciferasových reportéro-

vých testech využívajících signální dráhy p53, Nrf2, RAD51C a cystatin A (cit.⁴).

Buněčné testy *in vitro* založené na reportérech získávají stále větší důležitost při hodnocení rizik chemických látek pro lidské zdraví. Jejich velkou výhodou je snadné využití při vysokokapacitním testování (HTS, z angl. high-throughput screening), kde poskytují rychlou a levnou primární informaci. V buněčných testovacích modelech *in vitro* je sledována specifická receptorová interakce mezi chemickou látkou a buněčným modelem nebo reakce buňky na stresový podnět (obr. 1). Po aktivaci příslušné signální dráhy či responsivního elementu dochází k odpovědi buňky expresí reportérového genu. Jedním z velmi univerzálních a často používaných responsivních elementů je ARE (z angl. antioxidant response element), který se přirozeně nachází v promotorové oblasti několika genů kódujících detoxikační enzymy a cytoprotektivní proteiny.

Mezi nejčastější reportérové geny patří geny kódující luciferasu, fluorescenční proteiny (např. GFP nebo RFP, z angl. green/red fluorescent protein), β -laktamasu (β -laktamhydrolasa, EC 3.5.2.6) (cit.⁵) nebo sekretovanou embryonální alkalickou fosfatase (SEAP, z angl. secreted embryonic alkaline phosphatase, EC 3.1.3.1). Prvním krokem přípravy testů reportérového genu je konstrukce reportérového plasmidu a jeho následná, přechodná (transientní) nebo stabilní (trvalá) transfekce do hostitelské buňky. Tento přístup poskytuje hlubší a citlivější pohled na mechanismus toxického efektu chemické látky než standardní testy toxicity⁶.

2. Plasmid a jeho použití pro přenos genetické informace

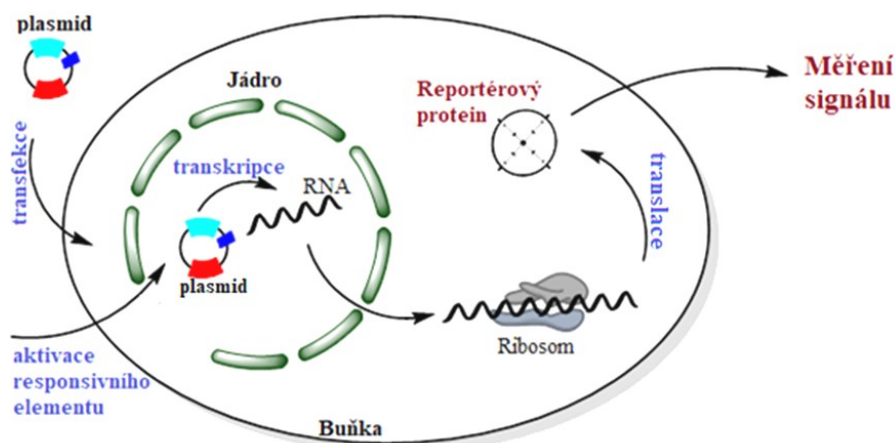
Plasmidy jsou doplňková genetická informace, která je tvořena dvouvláknovou molekulou DNA (dsDNA, z angl. double stranded) obsahující vlastní replikační počátek. Chovají se jako autonomní replikony nezávislé na chromosomu⁷. Přirozeně existují zejména v bakteriálních

buňkách a vyskytují se také v některých eukaryotech. V genomovém inženýrství se plasmidy používají jako vektory pro přenos genetické informace⁸ (obr. 2).

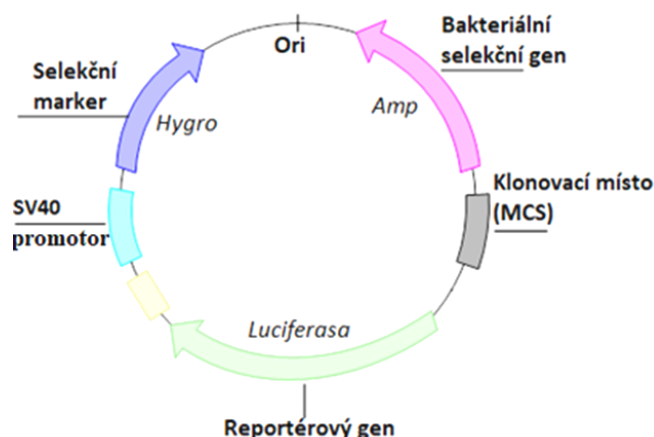
Obecně by tyto vektory měly být složeny z několika sekvencí, které je činí vhodnými pro transformaci/transfekci a selekci hostitelského organismu. První sekvencí je počátek replikace (*ori*), který je rozpoznán buněčným replikačním aparátem a také definuje počet kopií daného plasmidu v buňce⁹. Pro přípravu reportérového buněčného organismu se obvykle využívá plasmid se dvěma počátky replikace, první z nich umožní replikaci v bakteriální buňce (obvykle *oriC* z *Escherichia coli*), druhý z nich v eukaryotní buňce (obvykle *SV40* z angl. Simian virus 40). Další klíčovou složkou plasmidu je selekční marker, kterým může být jakýkoli gen poskytující selektivní výhodu pozitivním transformantům (nejčastěji rezistence k antibiotiku, např. gen pro hygromycinfosfotransferasu (ATP:hygromycin-B 4-*O*-fosfotransferasa, EC 2.7.1.163), neboli kinasa poskytující rezistenci k hygromycinu jeho inaktivací pomocí fosforylace)¹⁰.

Mezi další potřebné sekvence se řadí klonovací místo (MCS, z angl. multicloning site), usnadňující klonování požadované sekvence DNA a obsahující několik míst pro rozpoznání různými restrikčními enzymy¹¹. V reportérových vektorech je promotor cílového genu následován sekvencí genu reportérového proteinu, který může být fluorescenční¹², luminiscenční¹³ nebo se může jednat o enzym (např. β -D-galaktosidasa¹⁴, β -D-galaktosidgalaktohydrolasa, EC 3.2.1.23).

Připravený reportérový plasmid je následně vložen do bakteriální buňky za účelem pomnožení. Plasmid se do bakteriální buňky vkládá různými technikami, např. teplotním šokem, elektroporací nebo pomocí lipofekčních činidel¹⁵. Následně musí dojít k přechodné (transientní) nebo stabilní transfekci vektoru do vhodné buněčné linie. Tyto reportérové vektory umožňují analýzu kinetiky genové exprese *in vivo* v průběhu růstu organismu, což umožňuje sofistikované studie i na úrovni jednotlivých buněk¹⁶.



Obr. 1. Schéma principu měření pomocí reportérového testu. Nakresleno v ChemDraw Professional 16.0.



Obr. 2. Základní sekvence reportérového plasmidu (vektoru pro přenos genetické informace). Plasmid obvykle obsahuje počátek replikace (ori) a počátek replikace pro savčí buňky (žlutá barva), gen pro selekci v bakteriích (růžová barva), klonovací místo (šedá barva), reportérový gen cílového proteinu např.: luciferasa (zelená barva), polyadenylační místo (žlutá barva), SV40 promotor (světle modrá) a selekční marker pro eukaryotní buňky (tmavě modrá). Hygro = hygromycinfosfotransferasa (EC 2.7.1.163), MCS = multiklonovací místo, Amp = rezistence k ampicilinu (gen kódující β -laktamasu, EC 3.5.2.6). Nakresleno v ChemDraw Professional 16.0.

3. Druhy reportérových testů

Existuje celá řada testů využívajících reportérové buňky pro stanovení biologické aktivity studovaných sloučenin. Tyto testy mohou stanovit schopnost sloučenin indukovat buněčnou proliferaci, apoptózu, expresi cytokinů nebo působit cytotoxičticky¹⁷, a tím nahradit některé těžkopádné tradiční testy¹⁸.

Reportérové genové testy využívají aktivaci nebo inaktivaci signální dráhy, která ovlivňuje expresi stabilně transfekovaných reportérových genů pod kontrolou příslušných regulačních prvků¹⁹. Jeden z dosud nejlépe charakterizovaných bioluminiscenčních proteinů je luciferasa, která katalyzuje oxidaci substrátu, což vede k reakci produkující světlo¹⁸. Vazba ligandu na transmembránový receptor za normálních podmínek vede k aktivaci intracelulární signální dráhy, která zahrnuje modifikaci signálních molekul (např. fosforylaci), translokaci do jádra, expresi specifických proteinů (např. cytokinů) a výsledně fenotypové změny (např. proliferaci, apoptózu aj.). Když je však aktivována signální dráha u reportérové buňky, transkripční faktor se naváže na regulační oblasti ve stabilně transfekovaných buňkách a výsledkem je exprese reportéru, např. genu pro luciferasu. Míra signálu je pak přímo úměrná schopnosti testované sloučeniny ovlivňovat předmětnou signální dráhu nebo receptor²⁰.

3.1. Luciferasa (EC 1.13.12.7)

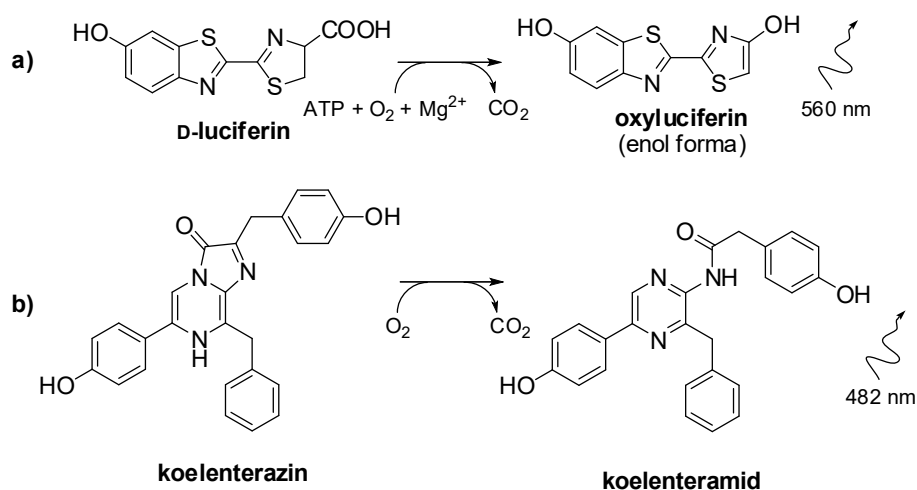
Reportérové testy využívající gen pro luciferasu jsou jedněmi z nejpoužívanějších kvůli své vysoké citlivosti a snadné manipulaci. Reportérový plasmid obsahuje promotorovou oblast požadovaného genu následovanou luciferasovým genem. Když je konstrukt transfekován do buň-

ky, luciferasa je produkována v množství, které je úměrné aktivitě promotoru. Luciferasu (a tedy promotorovou aktivitu) lze poté kvantifikovat měřením luminiscence produkované po přidání enzymového substrátu²¹. Luciferasa (D-firefly luciferin:kyslík-4-oxidoreduktasa (dekarboxylující, ATP-hydrolyzující), EC 1.13.12.7.) ze světlušky *Photinus pyralis* (FLuc) je nejrozšířenější luciferasa využívaná pro bioluminiscenční testy. FLuc vyžaduje přítomnost O_2 , Mg^{2+} a ATP, v jejichž přítomnosti katalyzuje oxidaci D-luciferinu na oxyluciferin se současnou emisí fotonu. Existují však možné inhibitory FLuc, obvykle se jedná o nízkomolekulární sloučeniny s planárními strukturami^{22,23} soutěžící o vazebné místo se substrátem (D-luciferinem nebo ATP). Další nevýhodou je rychlost reakce a tím nutné vybavení detektoru injektorem. Zejména tyto důvody vedou k vývoji nových systémů s luciferasami z nových zdrojů.

Další používaná luciferasa (koelenterazin:kyslík-2-oxidoreduktasa (dekarboxylující), EC 1.13.12.5) je původem z mořské sasanky *Renilla reniformis* (RLuc) a často se kombinuje s FLuc např. při stanovení cytotoxicity^{5,24,25}. RLuc katalyzuje podobnou reakci jako FLuc, dochází k oxidaci substrátu, a to koelenterazinu za vzniku světelné emise. Každá z těchto dvou zmíněných luciferas generuje světelnou emisi v různých vlnových délkách²⁶ (obr. 3).

3.2. Zelený fluorescenční protein

Zelený fluorescenční protein (GFP) je další v biologických systémech velmi používaný reportérový gen. Původní sekvence genu GFP byla klonována z medúzy *Aequorea victoria*, produkt tohoto genu je nejvíce studovaným zeleně fluoreskujícím proteinem²⁷. Je odolný vůči pH indukovaným konformačním změnám



Obr. 3. Biochemická reakce katalyzovaná luciferasou ze světlušky *Photinus pyralis* (FLuc) a mořské sasanky *Renilla reniformis* (RLuc). Nakresleno v ChemDraw Professional 16.0

a denuraci. Expresí genu pro GFP je druhově nezávislá a nevyžaduje žádné další kofaktory, substráty nebo jiné genové produkty z medúzy. Intenzita fluorescence GFP je přímým měřením transkripční aktivity promotoru, který řídí expresi genu a odpovídající produkci proteinu. Komerčně dostupné plasmidy obvykle umožňují klonování genu zájmu buď před a nebo za sekvenci fluorescenčního proteinu, čímž umožňují N- či C-terminální fúzi vznikajícího proteinu. Tyto plasmidy umožňují řízenou expresi v různých buňkách a organismech, včetně bakterií, kvasinek a savčích buněk. V současné době je snaha o zavedení vylepšených variant GFP, které by zlepšily fluorescenční vlastnosti a stabilizovaly expresi v savčích buňkách¹⁹. Dostupnost spektrálně odlišných fluorescenčních proteinů může také otevřít nové cesty pro zobrazování interakcí protein-protein v *in vitro* a *in vivo* diagnostice.

4. Příklady reportérových testů

Pokud si nechceme připravovat reportérový plasmid sami, je možné využít sbírku komerčních reportérových plasmidů, které jsou připraveny pro transfekci lidských buněk, či dokonce i připravené bakteriální nebo savčí buněčné reportérové linie. O nejčastěji používaných reportérových buňkách a plasmidech pojednávají následující kapitoly.

4.1. SOS chromotest/Umu test

SOS chromotest a Umu test jsou dvě rychlé kolorimetrické mikrobiální metody založené na produkci β-galaktosidasy (β-gal) jako odpovědi na poškození DNA. Poškozením DNA se aktivují geny tzv. SOS opravné

dráhy (cit.²⁸). Fúze genu *lacZ* s SOS opravným genem (*sfiA*) v genomu *E. coli* K12 je komerčně dostupná prostřednictvím bakteriálního kmene *E. coli* K12 PQ37. Po vystavení mutagení látce a poškození DNA je spuštěn opravný systém, který indukuje produkci enzymu β-gal. Zvýšená syntéza enzymu způsobí konverzi bezbarvého substrátu 5-brom-4-chlor-2-indolyl-β-D-galaktopyranosidu (X-gal) na modrý produkt, jehož intenzita je měřena spektrofotometricky. Test je možné provést jako zkumavkový nebo v modifikované verzi na mikrotitrační destičce²⁸.

Umu operon je zodpovědný za ochranu před chemickou a radiční mutagenezí. Princip je založen na schopnosti látek poškozujících DNA, z nichž většina může být potenciálními karcinogeny, indukovat expresi *umu* operonu. Produkty genů indukovaných poškozením – *recA* a *lexA*, dále regulují expresi genů, jejichž produkty jsou zodpovědné za opravné mechanismy buňky indukci *umu* operonu. Látka poškozující DNA tedy indukuje dráhu produkující enzym β-gal, který štěpí substrát *o*-nitrofenyl-β-D-galaktosid (ONPG) na žlutý produkt *o*-nitrofenyl (ONP). Plasmid byl původně vyvinut pro použití v bakterií *Salmonella typhimurium* TA1535 a později modifikován pro *E. coli*^{28–30}. Test je z 90 % srovnatelný s Amesovým testem, avšak má praktické výhody. Buněčná toxicita v této metodě není problém a buňky nemusí přežít, test je také časově méně náročný³¹. Nevýhodou je skutečnost, že některé látky nemusí vykazovat mutagení vlastnosti i přes jejich známou karcinogenitu, nebo je vykazují pouze u jednoho z testů. Ne všechny látky indukují poškození *Umu* operonu a také SOS odpověď nemusí být spuštěna pouze chemickými sloučeninami, ale vysokou teplotou nebo účinkem DMSO (cit.³²).

4.2. VITOTOX test

VITOTOX test (vyvinutý Vlámským institutem pro technologický výzkum, z angl. Flemish Institute for Technological Research, Mol, Belgie) je vysoce účinný bakteriální genotoxický test, který je založen na bioluminiscenci a umožňuje snadnou, velmi rychlou a levnou detekci genotoxických sloučenin. Je přinejmenším stejně citlivý jako Amesův test a SOS chromotest³³. V tomto testu jsou použity dva geneticky upravené bakteriální kmeny, nejčastěji *Salmonella typhimurium*, někdy i *E. coli*, které obsahují luciferasový operon *lux* (*luxCDABE*) z *Vibrio fischeri* pod transkripční kontrolou *recN* promotoru, který je součástí SOS opravného systému DNA. Součástí testu je také kmen TA104 *prl*, který konstitutivně exprimuje *lux* operon a slouží jako kontrola toxicity. Po inkubaci bakterií v přítomnosti genotoxické sloučeniny se *recN* promotor dereprimuje, což vede k indukci *lux* operonu. Expresse vede k produkci světla v závislosti na genotoxicitě.

Test je užitečný pro rychlé testování velkého počtu chemikálií s malým množstvím spotřebovaného materiálu, měření probíhá automaticky a sběr a zpracování dat může být také zcela automatizováno, což snižuje náklady na pracovní sílu³⁴.

4.3. Test ToxTracker

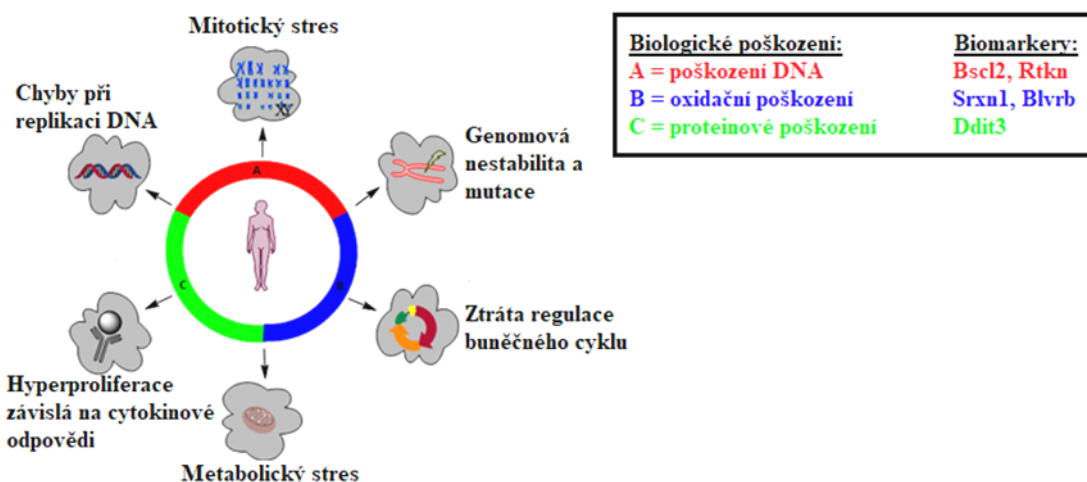
Reportérový systém ToxTracker (komerčně dostupný od firmy Toxys, spin-off založený roku 2014 Lékařským centrem Leidenské univerzity, Nizozemí) je založený na biomarkerech fúzovaných s genem kódujícím GFP. Systém je založen na šesti různých biomarkerových genech, které byly zavedeny transfekcí do myších embryonálních kmenových linií (obr. 4).

Test využívá rozdílnou citlivost různých buněčných linií a umožňuje predikci primárních vlastností známých i neznámých chemikálií. Expresse vybraných genů specificky reflektuje poškození DNA, oxidativní stres či poškození proteinů. Expresse reportérů GFP je stanovena průtokovou cytometrií².

Genotoxicita je detegovaná reportérem *Bscl2-GFP*, který je aktivován promutagenními lézemi DNA a replikačním stresem, a jeho indukce v reakci na poškození je spojena s aktivací ATR/CHK1 signální dráhy. ATR (ataxie teleangiectasie a Rad3 příbuzné proteiny) spolu s kinasou CHK1 aktivují mnoho mechanismů opravy DNA a slouží jako kontrolní bod replikace³⁵. Reportér *Rtkn-GFP* je aktivován vznikem dvouvláknových zlomů DNA. Reportér *Srxn1-GFP* je aktivován při zvýšené úrovni oxidačního stresu a je součástí antioxidační dráhy s transkripčním faktorem Nrf2, obdobně jako reportér *Blvrb-GFP*. *Btg2-GFP* reportérový systém je založen na p53-responzivním elementu *Btg2* genu a je aktivován širokým spektrem toxických sloučenin. *Ddit3-GFP* je přímo spojen s buněčnou odpovědí na špatně sbalené proteiny².

V porovnání s předchozími metodami vykazuje tento systém vysokou senzitivitu i specifitu a poskytuje výkonný nástroj pro hodnocení rizika nových chemikálií při současném zjištění genotoxických a/nebo oxidačních vlastností sloučeniny.

Po rané mezilaboratorní validační studii byla v roce 2017 zahájena oficiální validační studie OECD (Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, z angl. Organisation for Economic Co-operation and Development). V této validační studii testuje 7 laboratoří z různých průmyslových odvětví (farmakochemie, chemie a CRO) výběr 64 genotoxických a negenotoxických sloučenin. Studie se provádí podle pokynů OECD, a pokud



Obr. 4. Přehled hlavních typů biologického poškození a příslušné spojení s biomarkery. Nakresleno v ChemDraw Professional

dobře dopadne, mohlo by se jednat o oficiálním přijetí a zařazení testu do standardní regulační strategie bezpečnostních testů.

4.4. Reportérové vektory pGL4

Luciferasové reportérové vektory pGL4, komerčně dostupné od firmy Promega Corporation (Madison, Wisconsin, USA), jsou další generací reportérových genových vektorů určených pro expresi v savčích buňkách. K dispozici je řada konfigurací vektorů pGL4, včetně těch se syntetickými geny *luc2* (*Photinus pyralis*) a *hRluc* (*Renilla reniformis*), které byly kodonově uzpůsobeny pro účinnější expresi v savčích buňkách. Proteiny kódované těmito geny reagují rychleji a ve větší míře na změny v transkripční aktivitě než jejich předchůdci. Kromě toho byly reportérové geny i vektorová kostra, včetně genu bakteriální rezistence (β -laktamasa), a savčí selektovatelné geny (rezistence pro hygromycin, neomycin nebo puromycin), navrženy tak, aby se snížil počet vazebných míst pro transkripční faktory a riziko anomální transkripce.

Signální dráhy, jejichž aktivace je sledována pomocí pGL4 reportérových plasmidů, zahrnují signální dráhu MAPK/JNK, ve které je responsivní element pro aktivací protein 1 indukovatelný např. forbol-12-myristát-13-acetátem (PMA). PMA je známý jako aktivátor proteinových kinas. Další signální dráha souvisí se zánětem, responsivní element pro jaderný faktor NF- κ B je zde aktivován např. tumor nekrotizujícím faktorem – TNF α . Signální dráha oxidativního stresu je reprezentována responsivním elementem pro faktor Nrf2 aktivovaný např. *tert*-butylhydrochinonem. Poškození DNA je sledováno aktivací responsivního elementu pro protein p53, např. doxorubicinem. Stres endoplasmatického retikula je stanoven pomocí responsivního elementu pro aktivací transkripční faktor 6, který je aktivován např. tunikamycinem, inhibitory syntézy glykoproteinů. Stres způsobený těžkými kovy je sledován aktivací responsivního elementu pro responsivní transkripční faktor 1 reagující na kovy (např. ZnSO₄). Tepelný šok souvisí s aktivací responsivního elementu pro faktor 1 tepelného šoku pomocí např. 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycinu, který je inhibitory proteinu p90 tepelného šoku. Hypoxie se stanovuje aktivací responsivního elementu pro faktor 1 α indukovaného hypoxií (aktivován např. fenantrolinem). Stres vyvolaný xenobiotiky je sledován aktivací responsivního elementu pro arylhydrokarbonový receptor, např. prostřednictvím 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxinu – persistentního organického polutantu.

4.5. Signal Finder Stress & Toxicity 10-Pathway Reporter Array

Vektory pGL4 od firmy Promega jsou k dostání jako jednotlivé plasmidy, které si uživatel může cíleně vybrat a následně s nimi pracovat. O krok dál je řešení firmy Qiagen (Hilden, Německo), které nabízí set deseti vektorů pro sledování stresu a toxicity chemických sloučenin akti-

vací signálních drah. Sledované signální dráhy se neliší od řešení firmy Promega, pouze jsou doplněny o vektor s glukokortikoidním responsivním elementem. Gen pro glukokortikoidní receptor je exprimován téměř v každé buňce v těle a jeho signální dráha reguluje expresi genů řídících vývoj, metabolismus a imunitní odpověď. Některá xenobiotika, všudypřítomná v prostředí, se mohou vázat na glukokortikoidní receptor a jsou tak schopná modulovat následné účinky, které zahrnují reakce na zánětlivé, alergické, metabolické, neoplastické a autoimunitní procesy. Mnohá xenobiotika mohou mít prostřednictvím interakce s glukokortikoidním receptorem škodlivé toxické účinky s potenciálně smrtelnými následky³⁶.

Pathway Reporter Array je připravena ve formátu 96-jamkové destičky, kdy každý sloupec obsahuje jeden reportérový vektor a poslední dva sloupce obsahují vektor pro pozitivní a negativní kontrolu. Pathway Reporter Array je navržen jako duální test obsahující vždy dva vektory – vektor s genem pro luciferasu ze světlušky pod kontrolou responsivního elementu a vektor s genem pro luciferasu ze sasanky pod kontrolou konstitutivního promotoru CMV (promotor lidského cytomegaloviru). Toto duální uspořádání umožňuje normalizaci detegovaného signálu na počet pozitivně transfekovaných buněk.

5. Závěry

Oblast toxikologie v současné době prochází posunem od tradičních studií expozice zvířat směrem k vysoce výkonným přístupům využívajícím výpočetní modely, alternativní zvířecí modely a *in vitro* modelové systémy založené na buňkách. Testy *in vitro* pro predikci toxických a genotoxických vlastností látek (Amesův test, *hprt* test, kometový test aj.) se primárně zaměřují na hodnocení genotoxického potenciálu a obecně neberou v úvahu alternativní typy biologického poškození a selhávají v integraci různých metabolických dějů, které mohou být důležité pro predikci nebezpečí³⁷. Relativně vysoká specifita Amesova testu využívajícího bakteriální buňky a nízká specifita (časté falešně pozitivní výsledky) zavedených testů na savčích buňkách často vedou k mnoha potížím. Nejedná se tedy o žádoucí vlastnosti účinného přístupu v predikci toxicity a mutagenity, neboť včetně promarněného času dochází k finančním ztrátám, a pokud je vyžadováno i testování *in vivo*, k nadměrnému využití laboratorních zvířat.

Potenciální toxické vlastnosti chemikálií lze snadněji posoudit sledováním aktivace specifických buněčných signálních drah. K aktivaci těchto drah může dojít při nižších koncentracích a kratších expozičních časech než u jiných koncových bodů, jako je např. sledování buněčné smrti, což z nich dělá dobré nástroje pro predikci následné toxicity. Kromě toho může testování aktivace drah stresové reakce poskytnout informace o způsobu působení sloučeniny a tyto dráhy lze studovat v různých typech buněk, což umožní získání informací o tkáňově specifických reakcích na chemickou expozici. Reportérové testy nám nabízejí

široké detekční spektrum a vysokou citlivost. Ovšem vzhledem k tomu, že většina navrhovaných testů využívajících reportérové geny dosud nebyla validována ve velkých srovnávacích studiích se standardními metodami, ani nebyly provedeny mezilaboratorní testy a stanovena jejich reprodukovatelnost, měly by se využívat spolu s dosud zavedenými metodami k lepší interpretaci výsledků³⁸.

Autoři děkují Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy za poskytnutí finančních prostředků prostřednictvím projektu INTER-COST (LTC20015). Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu – projekt č. A2_FPBT_2022_055.

Seznam zkratk

Amp	ampicilin
ATB	antibiotika
β-gal	β-galaktosidasa
CMV	lidský cytomegalovirus
DMSO	dimethylsulfoxid
dsDNA	double stranded DNA, dvouvláknová DNA
FLuc	luciferasa ze světlušky <i>Photinus pyralis</i>
GFP	green fluorescent protein, zelený fluorescenční protein
HepG2	lidský hepatocelulární karcinom
HTS	high-throughput screening
<i>Hprt</i>	hypoxanthine phosphoribosyltransferase
Hygro	hygromycin
<i>lacZ</i>	gen kódující enzym β-galaktosidasu
MCS	multicloning site, multiklonovací místo
mRNA	messenger RNA,
NF-κβ	nukleární faktor kappa B
OECD	z angl. Organisation for Economic Co-operation and Development
ONPG	<i>o</i> -nitrofenyl-β-D-galaktosid
ONP	<i>o</i> -nitrofenyl
ori	počátek replikace
PMA	forbol-12-myristát-13-acetát
RFP	red fluorescent protein, červeně fluoreskující protein
RLuc	luciferasa z mořské sasanky <i>Renilla reniformis</i>
RT-qPCR	Real-time polymerase chain reaction
SEAP	secreted embryonic alkaline phosphatase
<i>sfiA</i>	SOS reparační gen
SV 40	Simian virus 40
TNFα	tumor nekrotizující faktor α
<i>Umu</i>	operon zodpovědný za ochranu před chemickou a radiační mutagenezí
X-gal	5-brom-4-chlor-2-indolyl-β-D-galaktopyranosid

LITERATURA

- van Gaal E. V. B., Hennink W. E., Crommelin D. J. A., Mastrobattista E.: *Pharm. Res.* 23, 1053 (2006).
- Hendriks G., Atallah M., Morolli B., Calléja F., Ras-Verloop N., Huijskens I., Raamsman M., van de Water B., Vrieling H.: *Toxicol. Sci.* 125, 285 (2012).
- Suzuki H., Sakabe T., Hirose Y., Eki T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 659 (2017).
- Westerink W. M. A., Stevenson J. C. R., Horbach G. J., Schoonen W. G. E. J.: *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 696, 21 (2010).
- Miraglia L. J., King F. J., Damoiseaux R.: *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 14, 648 (2011).
- Fischer F. C., Abele C., Henneberger L., Kluven N., König M., Muhlenbrink M., Schlichting R., Escher B. I.: *Chem. Res. Toxicol.* 33, 1770 (2020).
- Frost L. S., Koraimann G.: *Future Microbiol.* 5, 1057 (2010).
- Komatsu Y., Tomonaga K.: *Curr. Opin. Virol.* 44, 42 (2020).
- Durland R. H., Toukdarian A., Fang F., Helinski D. R.: *J. Bacteriol.* 172, 3859 (1990).
- Gnügge R., Rudolf F.: *Yeast* 34, 205 (2017).
- Yue Y., Duan D.: *Biotechniques* 33, 672 (2002).
- Shaner N. C., Steinbach P. A., Tsien R. Y.: *Nat. Methods* 2, 905 (2005).
- Winson M. K., Swift S., Hill P. J., Sims C. M., Griesmayr G., Bycroft B. W., Williams P., Stewart G. S. A. B.: *FEMS Microbiol. Lett.* 163, 193 (1998).
- Juers D. H., Matthews B. W., Huber R. E.: *Protein Sci.* 21, 1792 (2012).
- Kim T. K., Eberwine J. H.: *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 3173 (2010).
- Nora L. C., Westmann C. A., Martins-Santana L., Alves L. D., Monteiro L. M. O., Guazzaroni M. E., Silva-Rocha R.: *Microb. Biotechnol.* 12, 125 (2019).
- Rieder N., Gazzano-Santoro H., Schenerman M., Strause R., Fuchs C., Mire-Sluis A., McLeod L.: *BioProcess Int.* 8, 33 (2010).
- Svobodová K., Cajthaml T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 839 (2010).
- Jiang T., Xing B., Rao J.: *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 25, 41 (2008).
- de Wet J. R., Wood K. V., DeLuca M., Helinski D. R., Subramani S.: *Mol. Cell. Biol.* 7, 725 (1987).
- Wang L., Yu C., Wang J.: *Biotechnol. Adv.* 39, 107466 (2020).
- Thorne N., Shen M., Lea W. A., Simeonov A., Lovell S., Auld D. S., Inglese J.: *Chem. Biol.* 19, 1060 (2012).
- Auld D. S., Southall N. T., Jadhav A., Johnson R. L., Diller D. J., Simeonov A., Austin C. P., Inglese J.: *J. Med. Chem.* 51, 2372 (2008).
- Kenda M., Vegelj J., Herlah B., Perdih A., Mladěnka P., Sollner Dolenc M.: *Int. J. Mol. Sci.* 22, 6927 (2021).
- Barriscale K. A., O'Sullivan S. A., McCarthy T. V.: *Anal. Biochem.* 453, 44 (2014).
- Marcos-Vadillo E., García-Sánchez A.: *Methods Mol. Biol.* 1434, 199 (2016).
- Soboleski M. R., Oaks J., Halford W. P.: *FASEB J.* 19, 440 (2005).

28. McDaniels A. E., Reyes A. L., Wymer L. J., Rankin C. C., Stelma G. N. J.: *Environ. Mol. Mutagen.* 16, 204 (1990).
29. Whong W. Z., Wen Y. F., Stewart J., Ong T. M.: *Mutat. Res.* 175, 139 (1986).
30. Oda Y., Nakamura S., Oki I., Kato T., Shinagawa H.: *Mutat. Res.* 147, 219 (1985).
31. Reifferscheid G., Heil J.: *Mutat. Res.* 369, 129 (1996).
32. Yasunaga K., Kiyonari A., Oikawa T., Abe N., Yoshikawa K.: *Environ. Mol. Mutagen.* 44, 329 (2004).
33. van der Lelie D., Regniers L., Borremans B., Provoost A., Verschaeve L.: *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 389, 279 (1997).
34. Verschaeve L., Van Gompel J., Thilemans L., Regniers L., Vanparys P., van der Lelie D.: *Environ. Mol. Mutagen.* 33, 240 (1999).
35. Smith J., Mun Tho L., Xu N., Gillespie D. A.: *Adv. Cancer Res.* 108, 73 (2010).
36. Gulliver L. S. M.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 319, 69 (2017).
37. Hendriks G., Derr R. S., Misovic B., Morolli B., Calléja F. M. G. R., Vrieling H.: *Toxicol. Sci.* 150, 190 (2016).
38. Elad T., Belkin S.: *Adv. Biochem. Eng. / Biotechnol.* 157, 135 (2017).

D. Čáková, N. Jelenová, and J. Viktorová
(*Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic*): **Use of Reporter Assays in Monitoring Cellular Stress and Toxicity**

Monitoring the influence or process of gene expression is a very important part of research in many studies. Currently, many methods are being developed to facilitate the monitoring of gene expression regulation, the use of gene reporter assays being one of the examples. These systems represent an extensive set of tools to study the regulatory sequences of promoters, enhancers, and transcription factors. There are several assays using reporter cells to determine the biological activity of the compounds studied. The aim of this review article is to present the preparation of reporter plasmids, which is always the first step in assays using reporter genes. Subsequently, the most common types of reporter test are described, and examples of their use in *in vitro* testing are presented.

Keywords: plasmid, regulation of gene expression, transfection, luciferase, *in vitro* assay, reporter, genotoxicity, DNA damage