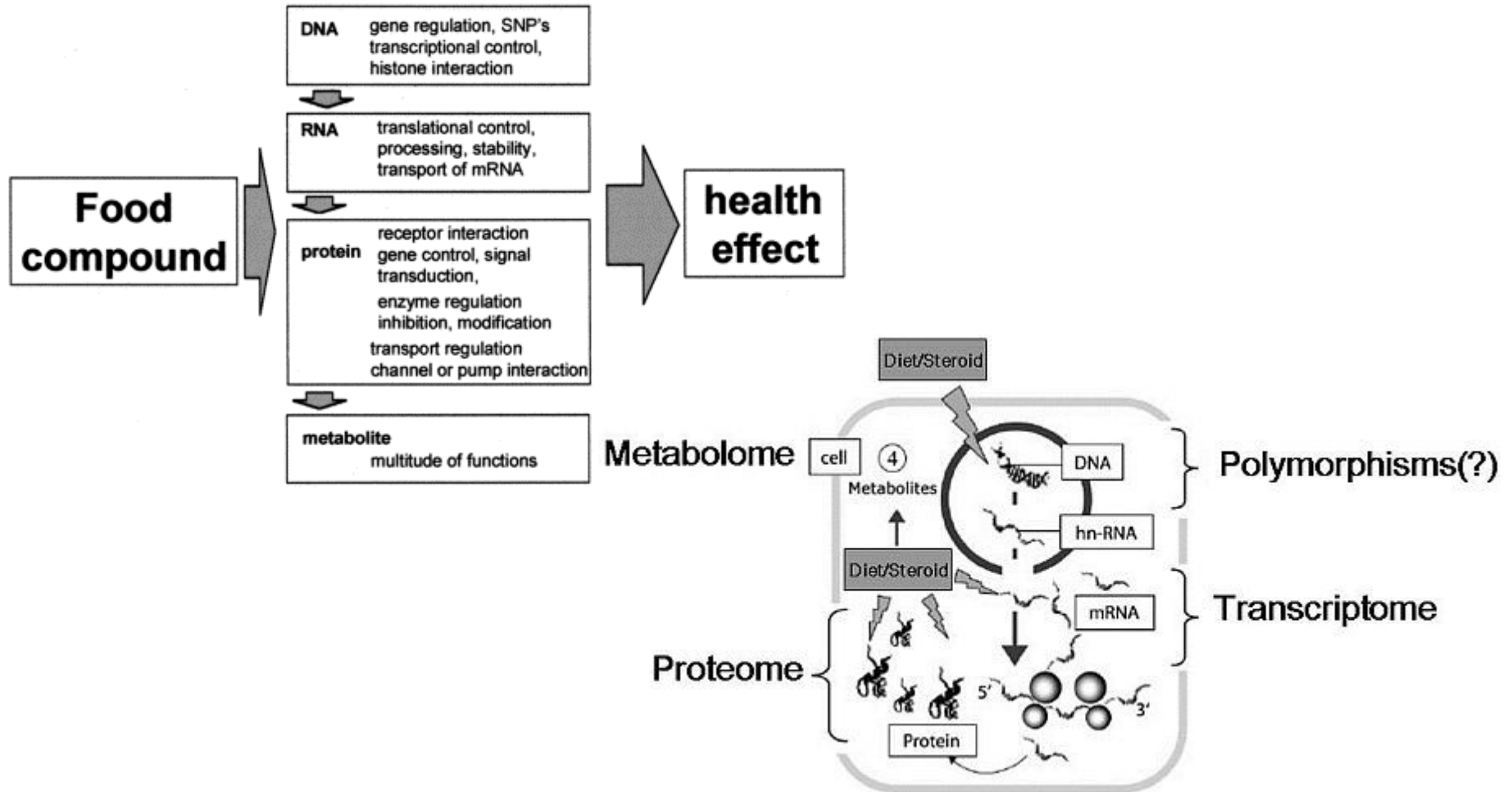


Nutrigenomika a nutrigenetika



Nutrigenomika a Nutrientika



Nutrigenomika a Nutrigenetika

- ✔ **Vychází z pěti základních předpokladů (Kaput, Rodriguez, 2006):**
- ✔ 1) Nutriční látky jsou schopny přímo nebo nepřímo působit na lidský genom, měnit jeho strukturu, expresi genů a tím průběhy metabolických drah.
- ✔ 2) Za určitých okolností může být dieta u určitých jedinců významným rizikovým faktorem vzniku chronického onemocnění.
- ✔ 3) Některé z cílových genů nutričních látek obsažených v potravě mohou hrát roli v nástupu, incidenci, průběhu a závažnosti některých chronických onemocnění.
- ✔ 4) Míra vlivu diety na rovnováhu mezi zdravím a nemocí může záviset na konkrétní genetické výbavě jedince.
- ✔ 5) Pokud budou známy konkrétní potřeby jedince, nutriční stav a genotyp, může být nutriční intervence cílena k prevenci, zmírnění nebo léčení chronických onemocnění

Molekulární metody

Nutrigenetika

- ✔ Odběr vzorků
- ✔ Izolace a extrakce DNA
- ✔ Amplifikace DNA – PCR
- ✔ Restrikční analýza
- ✔ Sekvenování

Nutrigenomika


- ✔ Odběr vzorků
- ✔ Izolace a extrakce DNA, RNA, proteinů a metabolitů
- ✔ Epigenom
- ✔ Transkriptom
- ✔ Proteom
- ✔ Metabolom

Molekulární metody

Čím lepší nástroje (metody), tím lepší obraz....

→

0.2	-0.7	-0.2	-0.7	1.2	
-0.9	-0.6	0	-0.4	-1.1	-0.8
-0.8	-0.6	0.1	-0.3	0.2	0
0.2	0.7	-0.3	-0.2		0.2
-0.6	-0.5				
-0.2	-0.1	-0.1	-0.5	-0.8	0
-0.1	0	-0.1	0	0	0.3
-0.1	-0.5	-0.1	0.1	-0.7	0.2
-0.4	-0.6	-0.5	-0.6	-1.5	-0.9
-0.7	-0.3	0.4	0.1	0.1	0.2
-1.1	-0.9	-0.3	-0.4		
-0.7	-0.6	-0.3	-0.3	-0.5	-0.5
-1.5	-0.7	0.3	-0.6		
-0.5	-0.9	0.3	-0.4	0.3	0.4
-0.2	-0.2	-0.1	-0.2	-0.9	-0.6
1	0.6	1.1	0.7	0.4	0.5
-0.1	-0.2	-0.3	-0.2	0.1	0.3
-0.5	-0.8	-0.1	0.2	0	0.6
-0.6	-1	0.3	-0.2	0	1.7
-0.5	-0.6	-0.7			1.3
-0.1	-0.8	-0.6	-0.7	-0.3	-0.8
0	-0.6	0.4	-0.8		1
-0.6	-0.9	-0.9			0.7
-0.5	-0.6	-0.7	-0.1	0.4	1.2
-0.9	-0.8	-0.6	-0.1	0.3	1.2
-0.6	-0.7	-0.9	-0.8	-0.7	0
-0.3	-0.6	-0.6	-0.5		0.5
-1.2	-0.9				0.5
-1	0.5				0.6
-0.1	0.6	0.1	0	1.3	2.9
0.2	0.2	0.3			0.6
-0.8	-0.8	-0.1	-0.3	-0.3	-0.5
-0.1	-0.1	-0.5	-0.7	-0.1	0
-0.4	-0.7				0.3
-0.1	1.2	0.6			0.5
-0.1	0.4	0.5	0.3	0.1	0.5
-0.8	0.5	-0.3	0.2	0.3	1
-0.4	-0.1	0	-0.4	-0.2	0.9
-0.1	-0.3	-0.6	-0.3	-0.3	0.1
-0.4	-0.7	-0.1	-0.1	-0.8	0.1
0	0.6	0.6	0.4	-0.1	0
-0.4	0.6	-0.7			0.3
0.5	0.3	0.4	0.1	-0.1	0.1
0.5	1.5	0.5	0.4	0.5	0.4
-0.6	0.3	-0.1	-0.3	-0.4	
-0.7	0.7				1
-0.7	-0.6	0.1			0.9
-0.6	-0.9	-0.6			0.5
0	-0.5	-0.7	-0.5	-0.9	-0.5
-0.5	-0.4				
		0.1			
-0.2	-0.5	0.2			
-0.3	-0.5	-0.2			
-0.5	-0.6	0	-0.2	-0.6	-0.5
-0.1	-0.2	0	-0.1	0	0.6
0.3	0.8	0.4	0.3	-0.1	
0	0.4	-0.1	-0.2	0	-0.5
-1.1	0.1	0	-0.4		-0.2
-0.3	-0.3	-0.4	-0.2		-0.1
-0.3	-0.4	-0.5	-0.7	-1.8	-0.5
0.8	0	-0.7	-0.6	-1.5	-0.7
-0.5	-0.3	-0.4			0.1
-0.9	-0.8	-0.2			1.6



COPIES

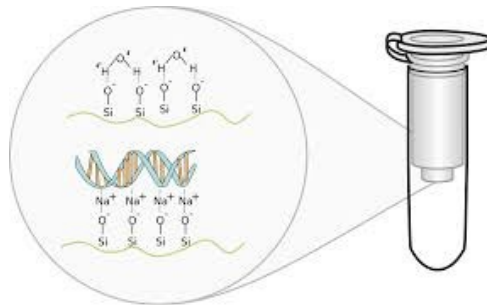
Experimenty

NUTRIGENETIKA

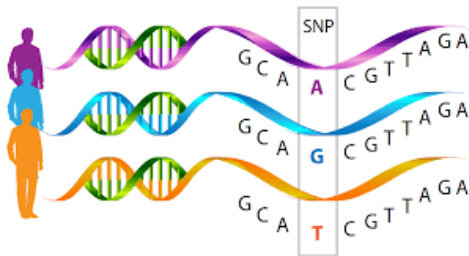
Metody molekulární biologie



Odběr biologického materiálu – bukální stěr, odběr periferní krve



Izolace a purifikace DNA – fenol-chloroformová extrakce, kolonky (adsorpce na silikagel)



Molekulární metody – PCR, gelová elektroforéza, RA, RT-PCR, sekvenování

PCR – Polymerázová řetězová reakce

- ✓ PCR – Karry Mullis 1983
- ✓ Esenciální molekulární metoda
- ✓ DNA replikace **in vivo** vyžaduje několik enzymů

X

- ✓ DNA replikace **in vitro** vyžaduje pouze jeden enzym – termostabilní DNA polymerázu (bakterie *Thermus aquaticus*)

FUNKCE OSTATNÍCH PROTEINŮ JE in vitro NAHRAZENA ZMĚNOU TEPLOT!

- ✓ **opakování cyklů pomocí změn teploty:**
 - denaturace (separace dsDNA)
 - navázání primerů (annealing)
 - elongace primerů
 - syntéza nového vlákna DNA

PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

Step 1 : denaturation

1 minut 94 °C

Step 2 : annealing

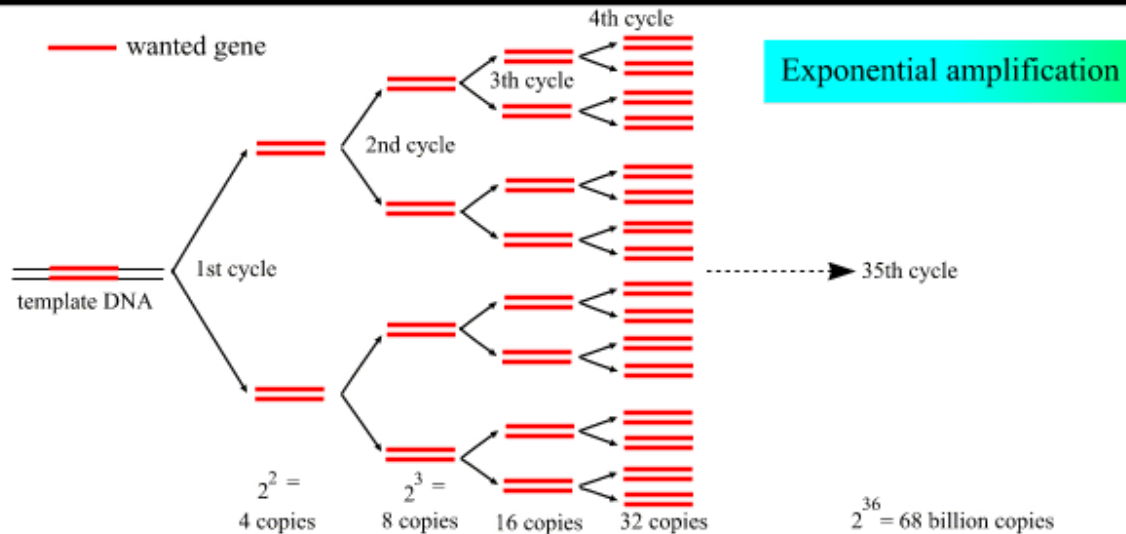
45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!

Step 3 : extension

2 minutes 72 °C
only dNTP's

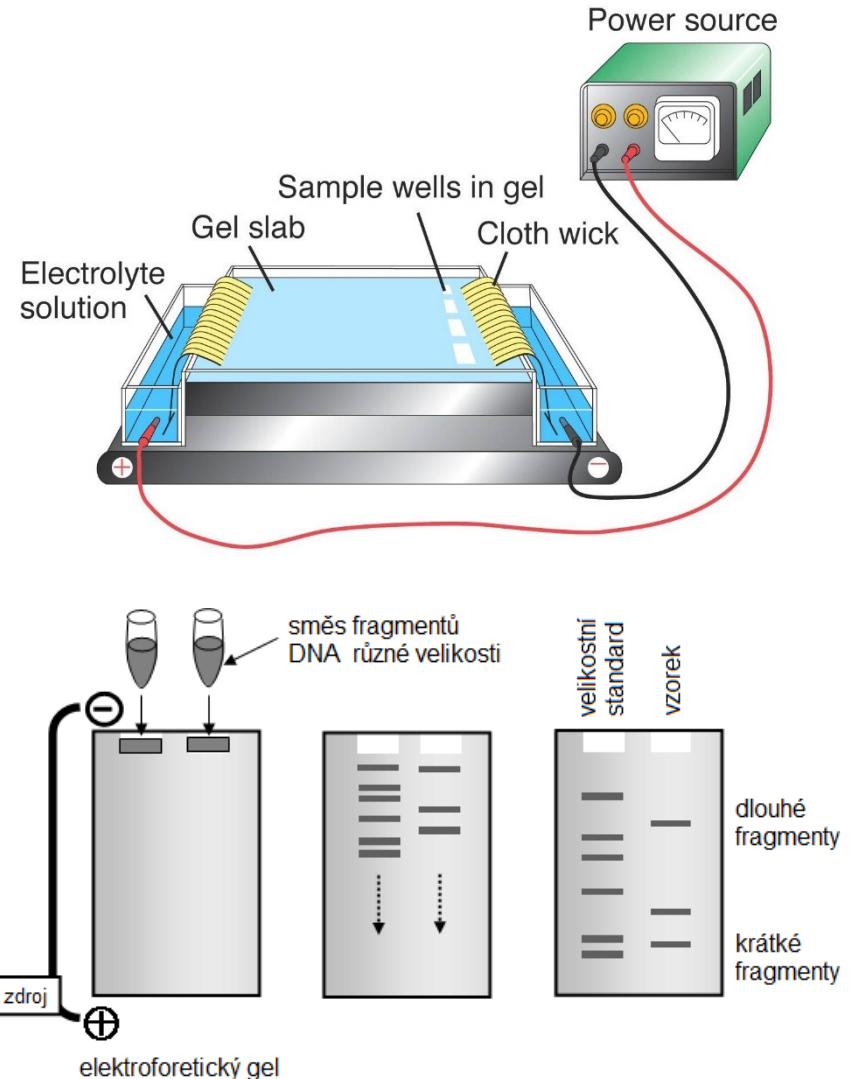
(Andy Vierstraete 1999)



(Andy Vierstraete 1999)

Elektroforéza- ELFO

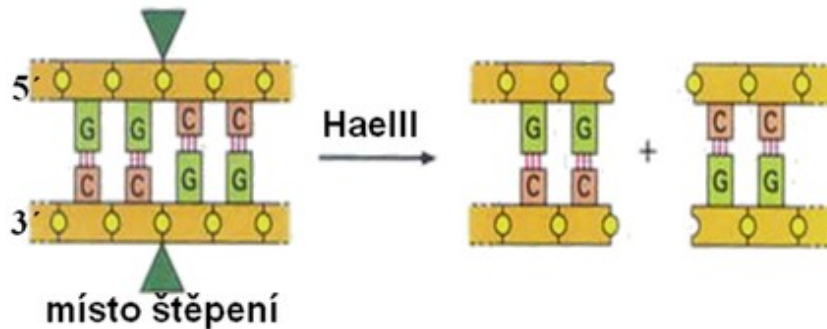
- ✔ Separční metoda využívající k dělení látek jejich odlišnou pohyblivost ve **stejnsměrném elektrickém poli** (separace molekul o rozdílné hmotnosti, popř. odlišném elektrickém náboji).
- ✔ Využívá **schopnosti nabitých částic** pohybovat se v elektrickém poli, přičemž rychlost pohybu částic je závislá na velikosti celkového povrchového náboje, velikosti a tvaru molekuly a její koncentraci v roztoku.
- ✔ Molekuly, které v zásaditém prostředí nesou **záporný náboj** (DNA, RNA)
- ✔ Při dělení v gelu budou všechny molekuly (fragменты stejné délky) putovat stejnou rychlostí a po obarvení a zobrazení uvidíme jen jeden pruh, jehož molekulová hmotnost odpovídá při srovnání se standardem předpokládané délce molekuly.
- ✔ Gely tvoří hustou síť, kterou větší molekuly procházejí pomaleji než menší molekuly –technika **molekulového síta**.
- ✔ **Agarosa** je polysacharid tvořený D-galaktosou a anhydro-L-galaktosou, který produkují některé mořské řasy (agar).
- ✔ Do agarosového gelu se většinou přímo přidává ethidiumbromid, který po vazbě na DNA pod UV emituje oranžové světlo.



1) RFLP – Restrikční analýza

Restriction Fragment Length Polymorphism (polymorfismus délky štěpných fragmentů)

- ✓ enzymatické štěpení molekul DNA ve specifickém štěpném (restrikčním) místě bakteriálním enzymem - restrikční endonukleáza (RE)
- ✓ Každý typ restrikční endonukleázy štěpí cílovou DNA v různých místech (palindrom), v závislosti na sekvenci DNA.
- ✓ SNP, inserce, delece – změna štěpného místa (získání nebo ztráta)
- ✓ Po rozdělení vzniklých fragmentů pomocí gelové elektroforézy lze na základě velikosti a počtu fragmentů sledovat rozdíly ve studovaných sekvencích, tzv. polymorfizmy.



Obr.: Příklad restrikční endonukleázy HaeIII a jejího štěpného místa

Restrikční enzymy

Some restriction enzymes

Enzyme	Source organism	Restriction recognition site in double-stranded DNA	Structure of the cleaved products
(a)	EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	
	PstI	<i>Providencia stuartii</i>	
SmaI	<i>Serratia marcescens</i>		
(b)	HaeIII	<i>Haemophilus aegyptius</i>	
HpaII	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>		

JAK?

1. Vizualizace restričních fragmentů po štěpení TaqI (Agarózový gel) – TTGA vs TCGA

1. Neštěpená TT

249bp

C

2. Štěpená CC

135bp

114bp

TaqI

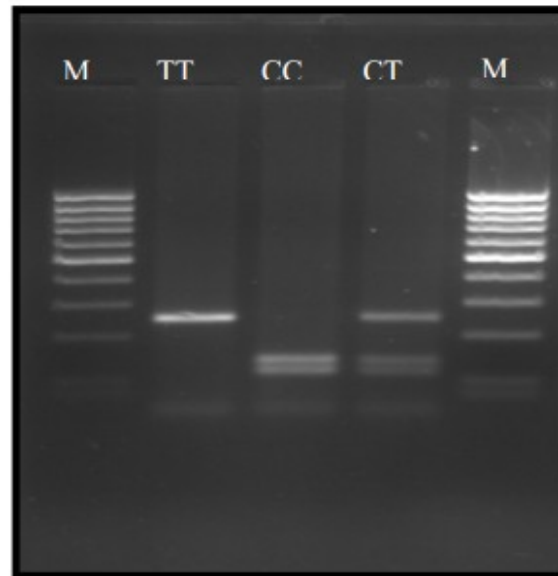
5'... T^vC G A ... 3'
3'... A G C_vT ... 5'

3. Heterozygot CT – 3 pruhy

4. M – Marker po 100 bp

249 bp →

vizualizace DNA fragmentů
po restriční analýze



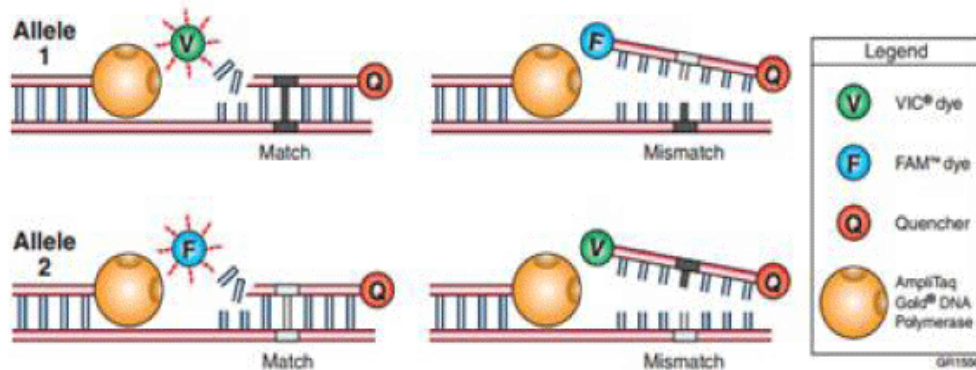
2) Real-Time PCR

- **Založena na principu klasické PCR**
- **Umožňuje sledování amplifikace v reálném čase na základě fluorescence (detekce: CCD kamera)**
- **Genotypizace pomocí dvou rozdílně značených sond (např. VIC, FAM), kdy každá odpovídá jiné alele**

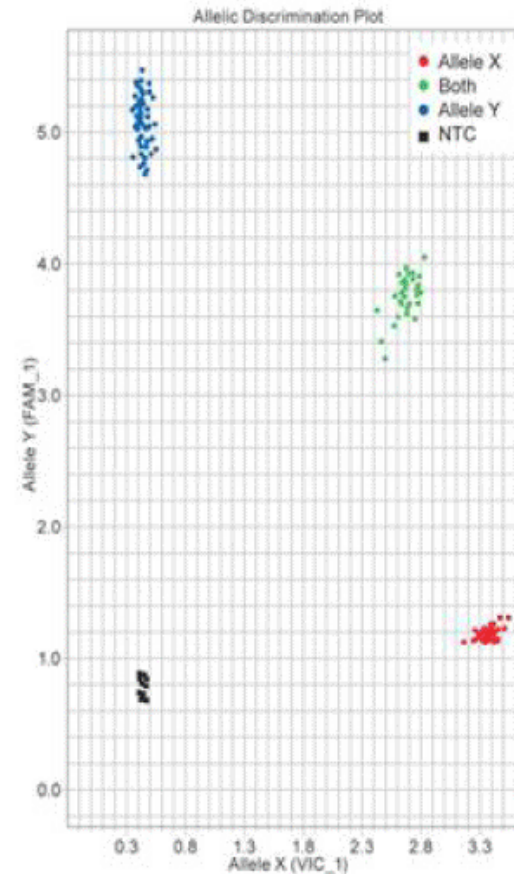
TaqMan próby

- ✓ sekvence o velikosti primeru komplementární k specifickému místu templátu
- ✓ kovalentně vázaný fluorofor na 5' konci próby - různé fluofory
- ✓ kovalentně vázaný **zhášec (quencher)** na 3' konci próby
- ✓ princip založen na využití 5'-3' exonukleasové aktivity Taq DNA polymerázy
- ✓ množství detekované fluorescence je přímo úměrné množství fluoroforu uvolněného z DNA přítomné v PCR reakci
- ✓ vysoká specifita detekce

RT-PCR

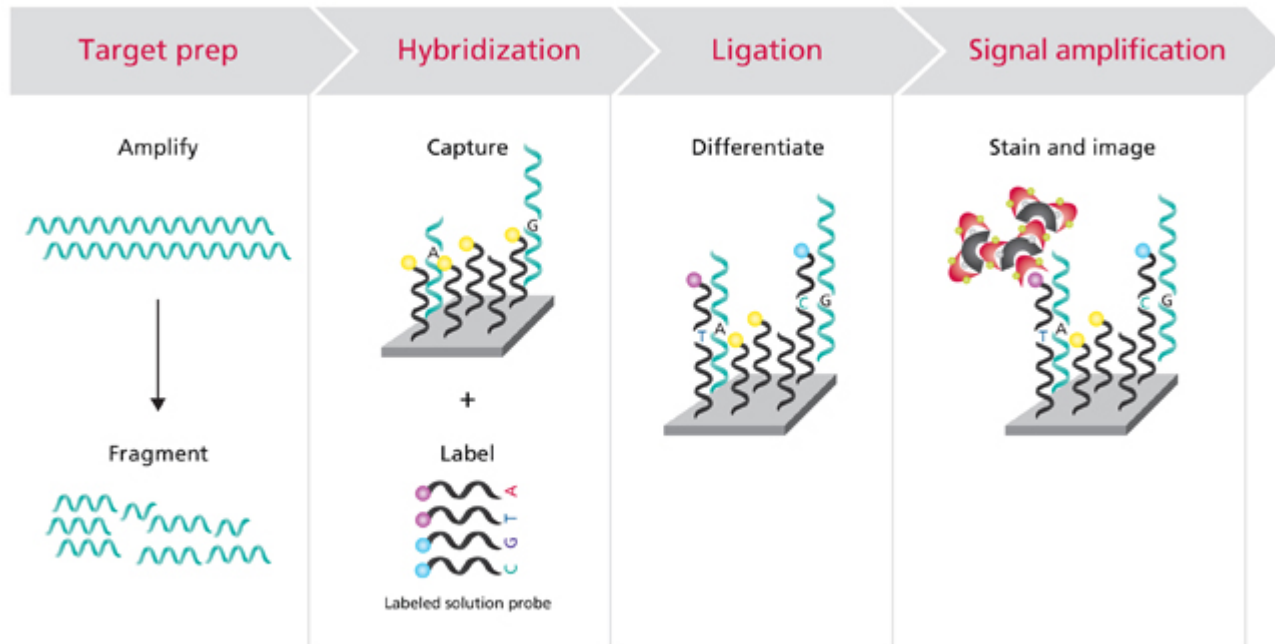


A substantial increase in...	Indicates...
VIC [®] dye fluorescence only	Homozygosity for allele 1
FAM [™] dye fluorescence only	Homozygosity for allele 2
Both fluorescence signals	Heterozygosity for allele 1 and allele 2



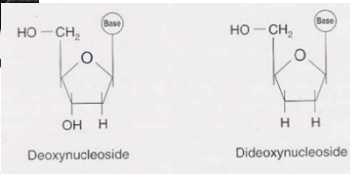
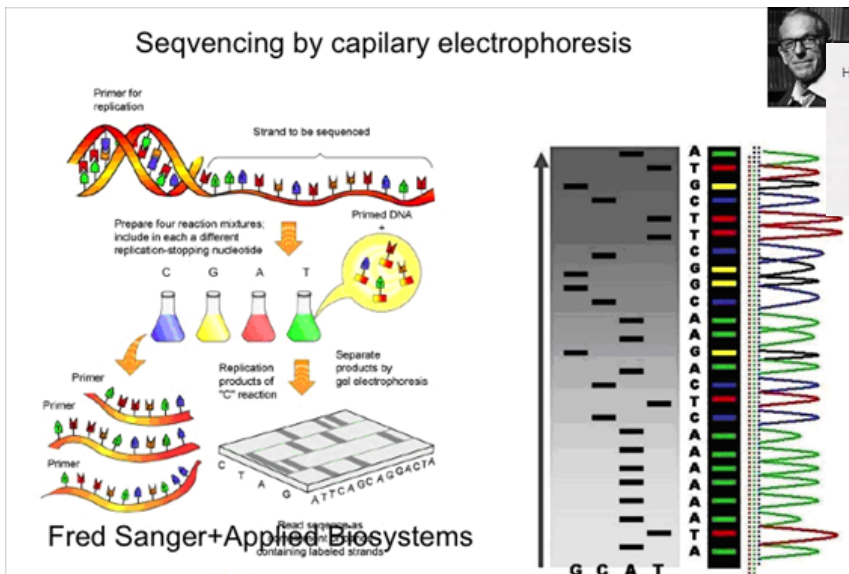
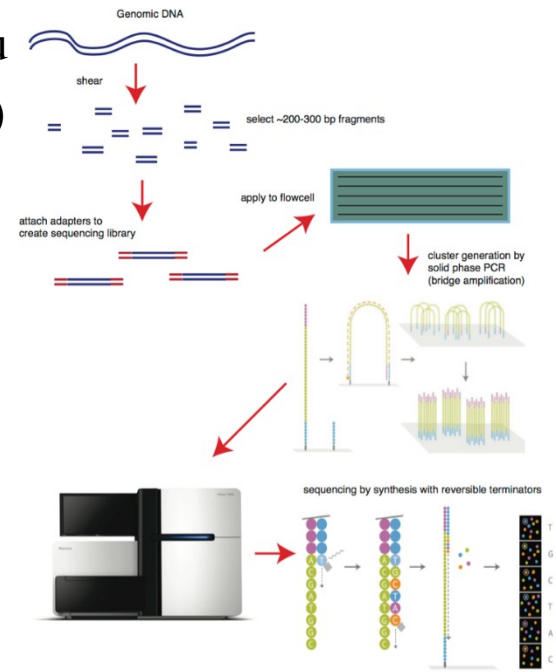
3) DNA SNP chip

- ✓ **tisíce SNP najednou (Illumina, Affymetrix)**
- ✓ **Illumina chip cca 13 tis SNP – 99 USD**
- ✓ **Čip Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 obsahuje**
 - které pokrývají přes 906 600 SNP, 946 000 sond pro CNV (copy number variations) – 1,8 genetických variací
 - Cena 300 USD
- ✓ **Genomové asociační studie (GWAS) !!!**



4) Sekvenování DNA

- ✓ Zjištění skutečné sekvence (pořadí nukleotidů) DNA
- ✓ Kompletní informace o nukleotidovém složení daného fragmentu
- ✓ Sangerova metoda – pomocí značených dideoxy nukleotidů
- ✓ Nové metody – Next generation sequencing (e.g. Illumina)
- ✓ Přesnost Sanger (99%), Illumina (98%)



Celogenomové sekvenování

- ✔ Projekt HUGO 2003 – cena 3 mld. USD
- ✔ Nové metody sekvenování – cíl dostat se pod 1000 USD
- ✔ Veritas project 2015
 - cena 1000 USD Beta verze!!! screeningové, ne diagnostické využití
 - Prodej „direct to customer“
 - zisk ne z prodeje celogenomového sekvenování, ale s dodatečných konzultací výsledků?
- ✔ Potenciální náhrada za všechny dosavadní genetické testy?

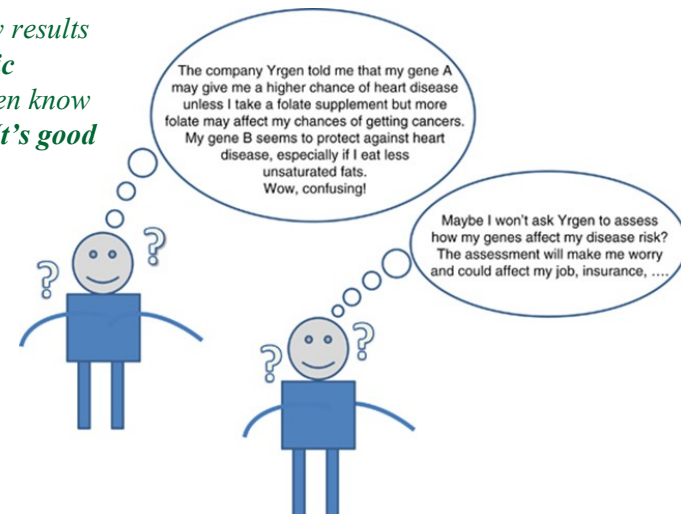
Celogenomové sekvenování – možná úskalí

- ✔ „Sebenaplnující se proroctví“ – pozitivní vs. negativní stimul
- ✔ Socio-ekonomický aspekt (dostupnost pro všechny, exkluzivní záležitost)
- ✔ Etický problém (záměrné preference určitých genotypů, výběr partnera, GATTACA – dokonalí lidé)
- ✔ Zneužití informací (např. pojišťovny)
- ✔ Zpracování a správná interpretace dat !!!

*„I bought my husband a test, and was very impressed. I then took one for myself, and shared my results with him. **It's great that I can check trait probabilities, make sure we don't pass terrible genetic conditions along to our children, and find out exciting things about ourselves that we didn't even know were genetic. I recommend this test wholeheartedly to all those considering having children. It's good to be prepared**“*

*„I decided to have a DNA test due to being unwell for so many years **and it has now helped to push the doctors in the right direction – hopefully**“*

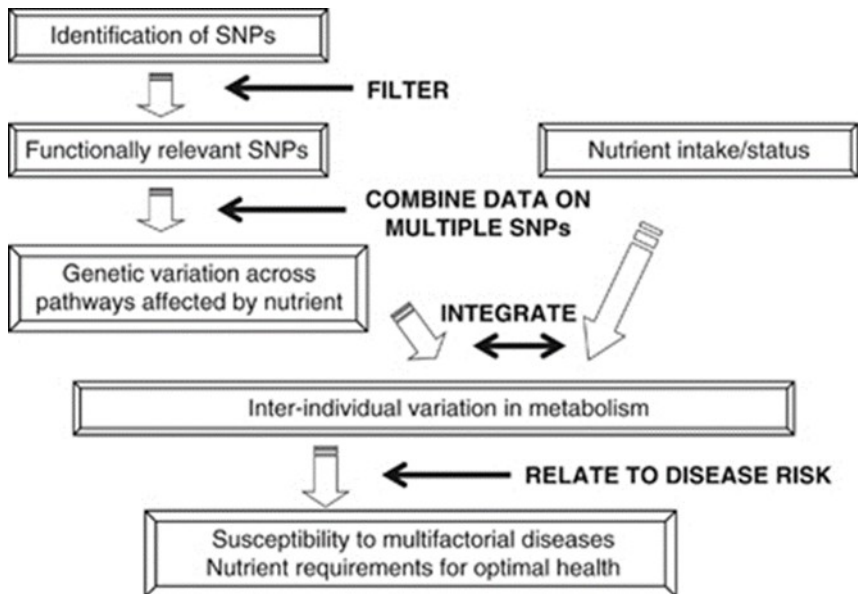
23andMe Health Testing review by a DNA Testing Choice user



Nutrigenetika - definice

- ✔ **Nutrigenetika zkoumá účinek genetických variací na interakci mezi stravou a onemocněním nebo nutričními požadavky. Genetika má zásadní úlohu pro identifikaci individuálního rizika (predispozice) rozvoje určitého onemocnění.“ Muller M & Kersten S. (2003) Nature Reviews Genetics 4:315-322.**
- ✔ **Nutrigenetika představuje vědu zabývající se identifikací a charakterizací genových variant souvisejících s různou odpovědí na různé nutrienty a zaměřuje se na hledání souvislostí mezi těmito variacemi a stavem onemocnění.” Mutch D, et al. (2005) FASEB Journal 19:1602-1616.**

Nutrigenetika



Diet & genes (nutrigenetic effects)



Genetic polymorphisms alter response to dietary components by influencing absorption, metabolism, or site of action

Genetika a výživa

- ✓ jasná nutriční doporučení pro monogenní enzymopatie
- ✓ Fenyلكetonurie
 - AR, 1:6000
 - Mutace v genu pro fenylalaninhydroxylazu (přeměna fenylalaninu na tyrosin)
 - Test se dělá po porodu
 - Terapie : **trvalém podávání diety s nízkým obsahem fenylalaninu** (eliminace potravin bohatých na proteiny, jako je hovězí a vepřové maso, drůbež, vajíčka, sýr, mléko..)
 - Při včasné nasazení diety se jedinec vyvíjí zcela normálně.
- Homocystinurie
 - AR, 1:83000 (1:15000)
 - Nejčastěji způsobena poruchou aktivity cystathion beta-syntázy (CBS deficit) – přeměna methioninu na cystein
 - V organismu nemocných dětí se **hromadí kromě aminokyseliny methionin i velmi toxický homocystein**.
 - Terapie: velké dávky **vitamínu B6 (pyridoxinu)**, které však musí dosahovat až několika set miligramů za den vedou u 50% s CBS deficitem ke snížení homocysteinu a methioninu , U pacientů, kteří neodpovídají na pyridoxin, musí být zahájena a po celý život dodržována nízkobílkovinná dieta se sníženým obsahem methioninu
- ✓ Galaktosémie
 - AR, 1: 50000 (35000)
 - chybění galaktóza-1-fosfát-uridylyltransferázy, která metabolizuje galaktóza-1-fosfát na UDP-galaktózu
 - Terapie: celoživotní **bezlaktózová strava**, galaktóza prochází placentou – v těhotenství dodržovat bezlaktózovou dietu

Nutrigentické testy

- ✔ Obrovský tržní potenciál: předpověď pro rok 2020 – obrat 20 mld.USD v U.S.A
- ✔ The **Government Accountability Office (GAO)** (2006)

GAO

United States Government Accountability Office

Testimony

Before the Special Committee on Aging,
U.S. Senate

For Release on Delivery
Expected at 10:00 a.m. EST
Thursday, July 27, 2006

NUTRIGENETIC TESTING

Tests Purchased from Four
Web Sites Mislead
Consumers

Statement of Gregory Kutz, Managing Director
Forensic Audits and Special Investigations

Nutrigentické testy - komerční

Figure 8: Lifestyle Descriptions Directly Linked to Diet and Health Recommendations







Submitted DNA	Fictitious profile	Submitted lifestyle information	Lifestyle recommendations
 Male DNA	 Kit from: Web site 1 Gender: Male Age: 32 Height: 5'9" Weight: 150	Little or no exercise Former smoker Diet low in food containing Omega-3 fatty acids and calcium Moderate caffeine intake	Increase exercise Continue to avoid smoking Increase intake of Omega-3 fatty acids Increase calcium intake Decrease caffeine consumption
 Female DNA	 Kit from: Web site 2 Gender: Male Age: 40 Height: 5'8" Weight: 140	Regular exercise Never smoked Diet high in cruciferous vegetables (broccoli, cauliflower, turnips) Diet high in fried foods	Continue to exercise Continue to avoid smoking Continue consumption of cruciferous vegetables Decrease total fat intake
 Female DNA	 Kit from: Web site 3 Gender: Female Age: 71 Height: 5'7" Weight: 183	No exercise Smoker Diet high in carbohydrates Diet high in fats	Increase exercise Stop smoking Reduce intake of refined carbohydrates Reduce saturated fats

Table 2: Statements Promising Recommendations Based on Consumers' Unique Genetic Information

Tests purchased from	Product Claims
Web site 1	<ul style="list-style-type: none"> "Recommendations are based on your own DNA." By "adjusting your diet and lifestyle to your genetic profile, you can make sure that your body functions at an optimum level."
Web site 2	<ul style="list-style-type: none"> "Recommendations are based on the unique combination of your genetic makeup" because it is important to "make lifestyle choices" that match your genes.
Web site 3	<ul style="list-style-type: none"> "Recommendations are based on your own DNA." Recommendations will "focus on gene variations, the potential of which may be offset by eating certain foods, increasing the intake of specific micronutrients, or making lifestyle changes."

Source: GAO.

Figure 7: Comparison of Recommended Supplement from Web Site 1 with Generic Multivitamin



Source: GAO.

Nutrigenetické testy

OMICS A Journal of Integrative Biology
Volume 19, Number 9, 2015
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/omi.2015.0109

Original Articles

Meta-Analysis of Genes in Commercially Available Nutrigenomic Tests Denotes Lack of Association with Dietary Intake and Nutrient-Related Pathologies

Cristiana Pavlidis,¹ Zoi Lanara,^{1,2} Angeliki Balasopoulou,¹ Jean-Christophe Nebel,³
Theodora Katsila,¹ and George P. Patrinos¹

- ✔ Metanalýza týkající se 38 genů běžně používaných v komerčně dostupných nutrigenetických testech
- ✔ Hodnocení prognostického potenciálu
- ✔ 524,592 jednotlivců (361,153 případů and 163,439 kontrol) z 1170 studií

Nutrigenetické testy

- ✔ Základní otázkou je, jestli jsou dosavadní vědecké poznatky dostačující pro nutrigenetické testování s následnými nutričními doporučeními?
- ✔ Problém prodeje komerčních testů „direct to customer“ – bez interakce s odpovídajícími specialisty (lékař, nutriční terapeut, genetik)



- ✔ U multifaktoriálních chorob (kardiovaskulární onemocnění, obezita, diabetes 2. typu, hypertenze) jsou nutriční doporučení na základě genetických variací prozatím diskutabilní a nejednoznačné
- ✔ v současné době nelze doporučit komerčně dostupné nutrigenetické testy

ALE velký příslib do budoucna – potřeba více klinických studií, funkční interakce genotyp – nutrient, interakce gen – gen, zvířecí modely (knock-out)

Výstupy z komerčních testů – „direct to customer“

Disease Risks (100) ?

↑ Elevated Risks

	Your Risk	Average Risk
Gallstones new	11.1%	7.0%
Restless Legs Syndrome	2.5%	2.0%

[more »](#)

↓ Decreased Risks

	Your Risk	Average Risk
Prostate Cancer ♂	12.7%	17.8%
Alzheimer's Disease new	4.9%	7.2%
Colorectal Cancer	4.2%	5.6%

[more »](#)

[See all 100 risk reports...](#)

Carrier Status (24) ?

Hemochromatosis	Variant Present
Alpha-1 Antitrypsin Deficiency	Variant Absent
Bloom's Syndrome	Variant Absent
BRCA Cancer Mutations (Selected)	Variant Absent
Canavan Disease	Variant Absent
Cystic Fibrosis	Variant Absent
Familial Dysautonomia	Variant Absent
Factor XI Deficiency	Variant Absent

[See all 24 carrier status...](#)

Traits (50) ?

Alcohol Flush Reaction	Does Not Flush
Bitter Taste Perception	Can Taste
Earwax Type	Wet
Eye Color	Likely Brown
Hair Curl 🌀	Slightly Curlier Hair on Average

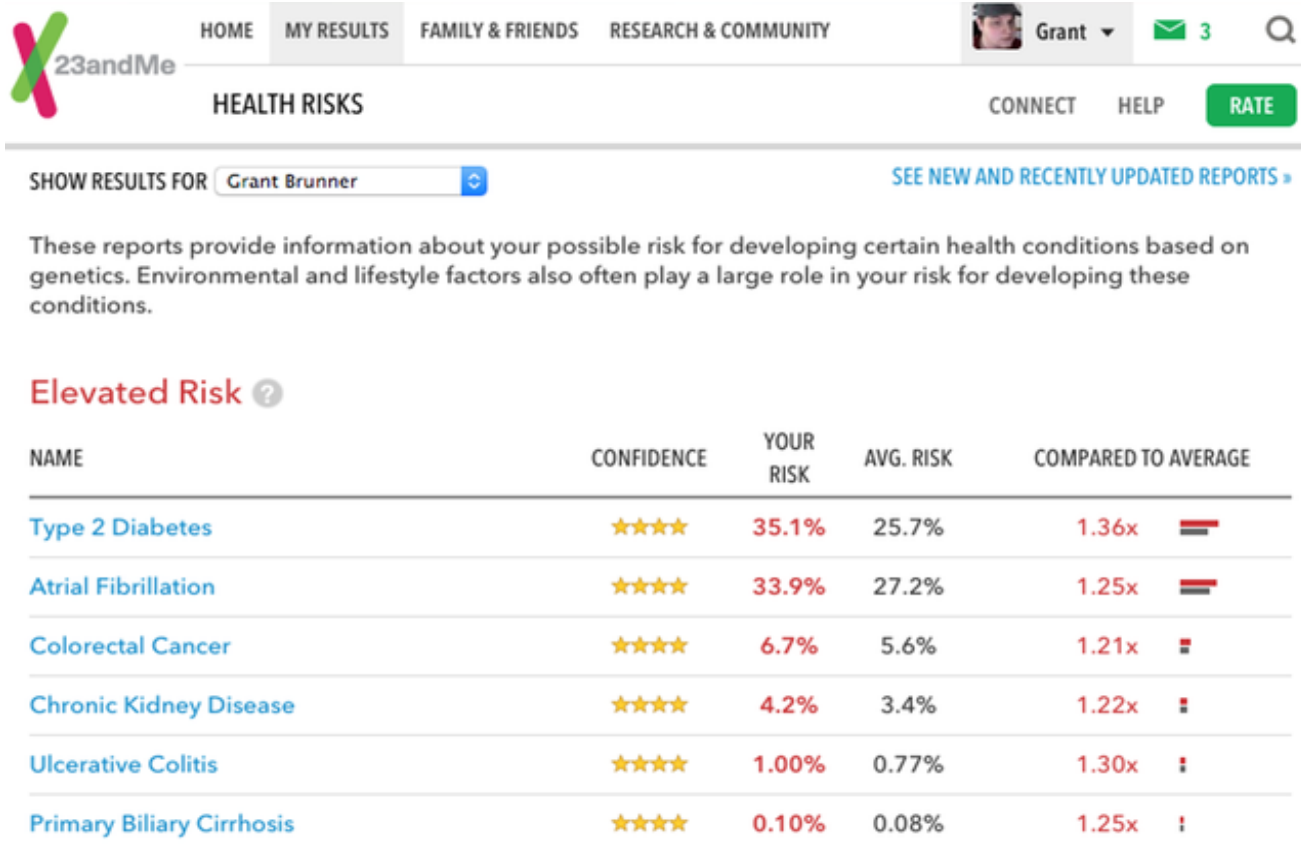
[See all 50 traits...](#)

Drug Response (19) ?







Warfarin (Coumadin®) Sensitivity	Increased
Abacavir Hypersensitivity	Typical
Alcohol Consumption, Smoking and Risk of Esophageal Cancer	Typical
Clopidogrel (Plavix®) Efficacy	Typical
Fluorouracil Toxicity	Typical

[See all 19 drug response...](#)






Výstupy z komerčních testů – „direct to customer“




The screenshot shows the 23andMe website interface. At the top, there is a navigation bar with the 23andMe logo on the left and links for HOME, MY RESULTS, FAMILY & FRIENDS, and RESEARCH & COMMUNITY. On the right, there is a user profile for Grant, a notification icon with the number 3, and a search icon. Below the navigation bar, the page title is "HEALTH RISKS". There are buttons for CONNECT, HELP, and RATE. A dropdown menu shows "SHOW RESULTS FOR Grant Brunner" with a blue arrow icon. To the right of this dropdown is a link "SEE NEW AND RECENTLY UPDATED REPORTS". Below this, there is a paragraph of text: "These reports provide information about your possible risk for developing certain health conditions based on genetics. Environmental and lifestyle factors also often play a large role in your risk for developing these conditions." Below the text is a section titled "Elevated Risk" with a question mark icon. Underneath is a table with five columns: NAME, CONFIDENCE, YOUR RISK, AVG. RISK, and COMPARED TO AVERAGE. The table lists six health conditions with their respective risk levels and confidence scores.

NAME	CONFIDENCE	YOUR RISK	AVG. RISK	COMPARED TO AVERAGE
Type 2 Diabetes	★★★★★	35.1%	25.7%	1.36x 
Atrial Fibrillation	★★★★★	33.9%	27.2%	1.25x 
Colorectal Cancer	★★★★★	6.7%	5.6%	1.21x 
Chronic Kidney Disease	★★★★★	4.2%	3.4%	1.22x 
Ulcerative Colitis	★★★★★	1.00%	0.77%	1.30x 
Primary Biliary Cirrhosis	★★★★★	0.10%	0.08%	1.25x 

Interpretate dat!!!

THE INFLUENCE OF DIET ON BODY WEIGHT		
Analysis	Your result	Summary
Risk for being overweight	 LOWER RISK	Your risk is 35% lower than average, which still doesn't mean that you can't put on weight. We advise you to follow detailed report of the analyses.
Response to saturated fats	 NORMAL	The intake of saturated fats is not additionally unfavourable for you. Despite that, your daily intake should not exceed 10% of caloric intake.
Response to monounsaturated fats	 NORMAL	Your daily intake of monounsaturated fats should be 10% of caloric intake. We recommend you to prefer olive oil when preparing the food.
Response to polyunsaturated fats	 NORMAL	Polyunsaturated fats should represent 7% of your daily caloric intake. You will find sufficient amounts of them in hazelnuts, almonds, mackerels, etc.
Response to carbohydrates	 UNFAVOURABLE	Due to your unfavourable response to carbohydrates, we recommend you to lower their daily intake. Restrict it to 50% of daily caloric intake.

*„At the end of this section, I was told that I needed a **‘balanced diet with a controlled intake of carbohydrates’**. Tables were provided to show the food groups I should include in my diet, my optimal daily calorie intake.“*

FACTORS INFLUENCING METABOLISM		
Analysis	Your result	Summary
HDL (good) cholesterol	 AVERAGE LEVEL	Your genes determine an average HDL cholesterol level, meaning that your condition can be improved. Try to be physically active every day.
LDL (bad) cholesterol	 AVERAGE LEVEL	Your genes determine an average level of LDL cholesterol. Great measure is to limit intake of trans fats (margarine, mayonnaise, fried foods, etc.).
Triglycerides	 AVERAGE LEVEL	Your genes determine an average level of triglycerides. Improve the condition further by considering recommendations regarding saturated fats.
Blood sugar	 AVERAGE LEVEL	Limiting intake of foods sweetened with regular white sugar (coffee, donuts, cookies), can have big influence on lowering blood sugar level.

„I was really happy with these results – as long as I don't have a more unfavourable response than average, I see no reason to worry about these analyses!“

Přelomová doporučení!!!

- ✔ Don't Smoke
- ✔ Maintain an Ideal Weight
- ✔ Eat a Balanced Diet
- ✔ Get Regular Exercise
- ✔ Reduce Stress.

Příklady SNP v kom. NT

GLUTATHION-S-TRANSFERÁZA, BROKOLICE A RIZIKO KARCINOMU PLIC

- ✓ Glutathion- S-transferáza M1 (GSTM1) je enzym, který detoxifikuje zplodiny (např. z cigaretového kouře)
- ✓ Delece GSTM1 genu (nulová alela), není produkován tento enzym:
 - riziko karcinomu plic
- ✓ Zelená brukvovitá zelenina typu brokolice je bohatá na izothiokyanáty.
- ✓ Case-control studie: 2141 pacientů (karcinom plic), 2168 controls
- ✓ Vysoká konzumace - alespoň jednou týdně:)
- ✓ Null GSTM1: OR = 0.67 (0.49-0.91) (p = 0.0092)
- ✓ Bez protektivního efektu u pacientů bez delece GSTM1



(especially if you have null GSTM1!)

Příklady SNP v kom. NT

- ✓ MTHFR (methyltetrahydrofolátreduktasa)
- ✓ Enzym zapojený do metabolismu vitamínu B6, B12 a kys.listové
- ✓ DNA syntéza a metylace
- ✓ Klíčová úloha při přeměně aminokyseliny homocysteinu na methionin.
- ✓ MTHFR 2 SNP - C677T a A1298C
- ✓ Rizikové alely - 677T a 1298C --> snížená aktivita enzymu --> hromadění homocysteinu v krevní plazmě --> poruchy srážlivosti krve
- ✓ Doporučení: Zvýšit příjem B6 a B12

X

„Don't order MTHFR genetic testing for the risk assessment of hereditary thrombophilia.

The common MTHFR gene variants, 677C>T and 1298A>G, are prevalent in the general population. Recent meta-analyses have disproven an association between the presence of these variants and venous thromboembolism“

American college of medical genetics and genomics (2015)

Příklady SNP v kom. NT

- ✓ cytochrom P450 – izoforma CYP1A2
- ✓ Enzym I. fáze biotransformace chemických látek
- ✓ Významný pro svůj podíl na metabolismu řady karcinogenních a prokarcinogenních látek, které může CYP1A2 bioaktivovat na genotoxické produkty
- ✓ CYP1A2*1F -163C>A
- ✓ CYP1A2*1F AA – „rychlý“ metabolismus, CC – „pomalý“ metabolismus kofeinu
- ✓ Aktivace prokarcinogenů - Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) obsažené např. v grilovaném mase v kouři
- ✓ Doporučení pro rychlého metabolizátora AA: omezit příjem grilovaného masa a nekouřit ☺

X

Who	Genotype	What It Means
DK, Greg Mendel (Dad)	AA	Fast caffeine metabolizer: drinking coffee didn't increase subjects' heart attack risk
Lilly Mendel (Mom)	AC	Slow caffeine metabolizer: drinking coffee increased subjects' heart attack risk.
	CC	Slow caffeine metabolizer: drinking coffee increased subjects' heart attack risk.

Příklady SNP v kom. NT

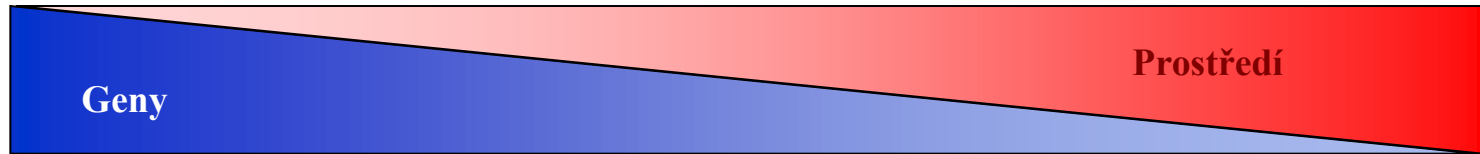
AMYLÁZA1 A RIZIKO OBEZITY

- ✓ Rozdíl v CNV (šimpanz: 2 kopie, člověk 6 – 16 kopií)
- ✓ Čím víc kopií → tím víc enzymu ve slinách → lepší trávení škrobu → zvýšená glykémie - > zvýšený příjem kalorií
- ✓ Množství a aktivita AMY1 ve slinách – ovlivnění také stresem, hydratace
- ✓ DOPORUČENÍ: regulovat příjem sacharidů v potravě

X

- ✓ Falchi et al, 2015 – negativní asociace mezi počtem kopií a BMI (OR pro narůst o jednu kopii 1,19)

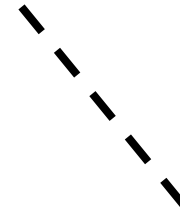
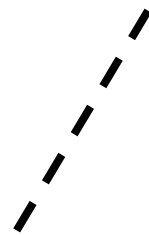
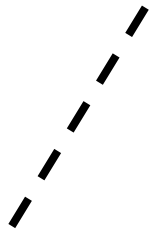
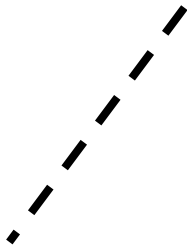
Genetika obezity



**Monogenní
(vysoká penetrance)**

**Monogenní
(nízká penetrance)**

Polygenní



- Vzácné případy
- Syndromy

- Populační studie
- Epidemiologie

- Klinické studie
- “omic studie”

Například: analýza tukové tkáně

Syndromické formy obezity

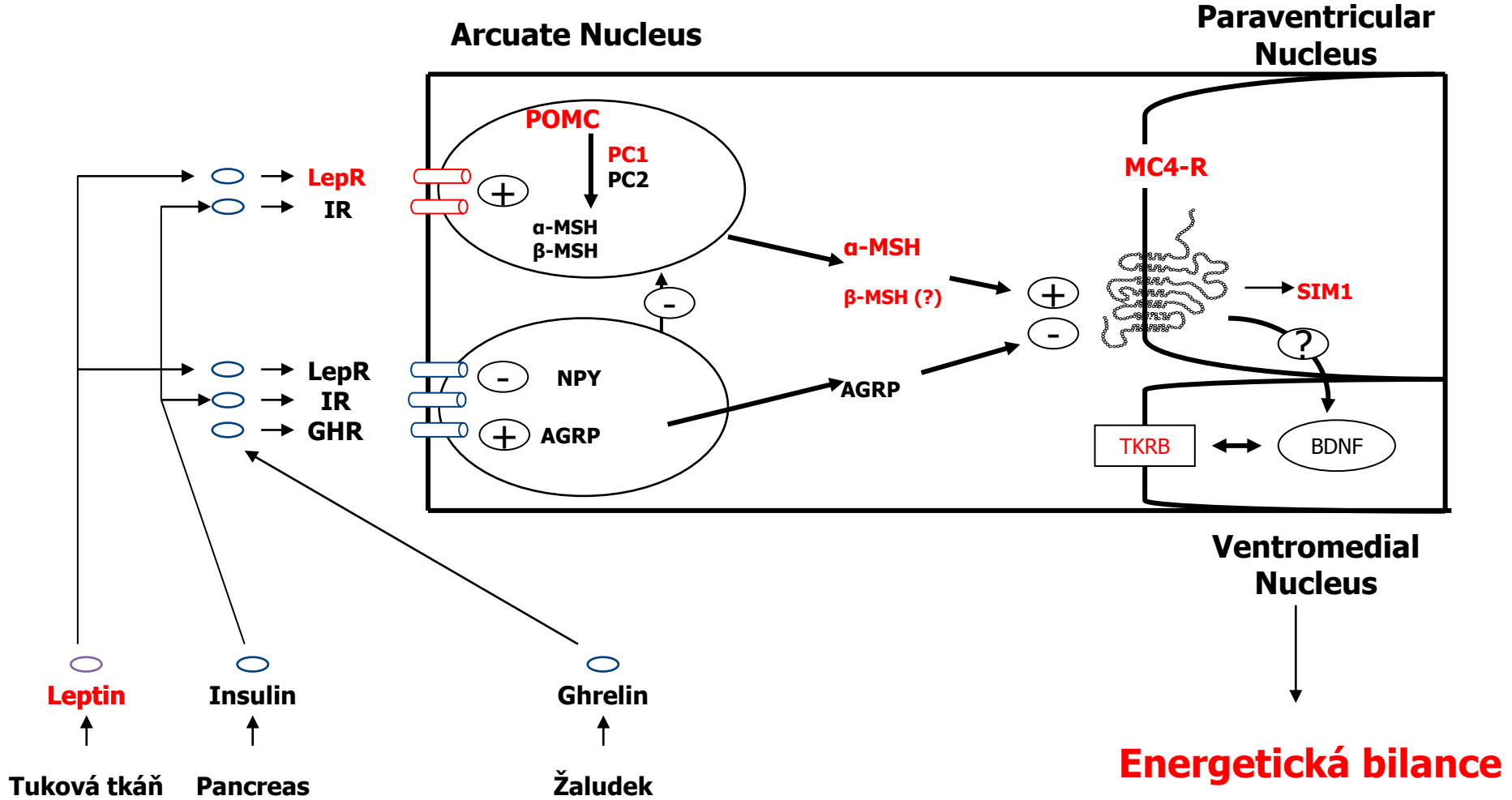
- Pleiotropní syndromy: cca 30 syndromů, u nichž obezita představuje konstatní syndromologickou komponentu a jež jsou způsobeny alteracemi známých oblastí

Syndrome Name (reference)	Clinical heterogeneity	Trans- mission	Loci / Genes
Prader-Willi	Muscular Hypotony Mental retardation Hyperphagia Hypogonadism Short stature	Autosomal dominant imprinting	15q11 SRNPN Micro deletion Maternal Disomy
Bardet-Biedel <i>Mykytyn Nature Genet 2002</i>	Hypogonadism Pigmentary retinopathy Polydactyly Mental retardation	Autosomal recessive	BBS (1-12) chaperonin Protein MKKS (Chr 20) Ciliary cells proteins
Alström <i>Hearn Nature Genet 2002</i> <i>Collin Nature Genet 2002</i>	Myocardopathy Sensory deficit (retinopathy, deafness) Dyslipidemia, diabetes	Autosomique recessive	2p14 ALMS1
Börjson-Forssman-Lehman <i>Lower Nature genet 2002</i>	Morbid obesity, epilepsy Hypogonadism, facial dysmorpby		Xq26.3 / Plant homeodomain like finger gene

Monogenní obezita – vliv na dráhu leptin/melanokortin

MUTACE

HYPOTHALAMUS



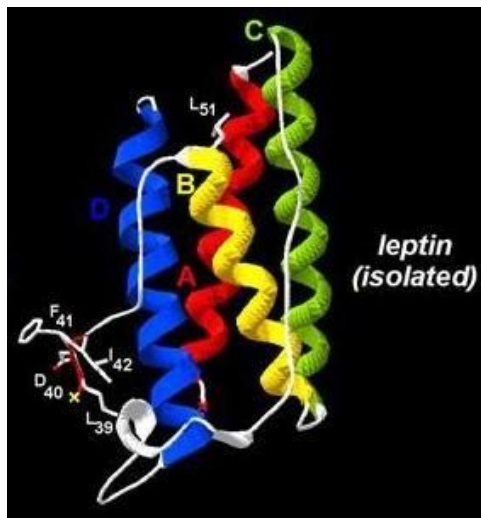
Mutch & Clement, 2006

Leptinová deficiencie

Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans

**Carl T. Montague^{*†}, I. Sadaf Farooqi^{*††},
Jonathan P. Whitehead^{*†}, Maria A. Soos^{*†}, Harald Rau^{*†},
Nicholas J. Wareham[§], Ciaran P. Sewter^{*†},
Janet E. Digby^{*†}, Shehla N. Mohammed^{||}, Jane A. Hurst[†],
Christopher H. Cheetham[#], Alison R. Earley[#],
Anthony H. Barnett[☆], Johannes B. Prins^{*†}
& Stephen O'Rahilly^{*†}**

**Nature, 387, pp 903-908
June 26, 1997**



Genetika polygenní obezity

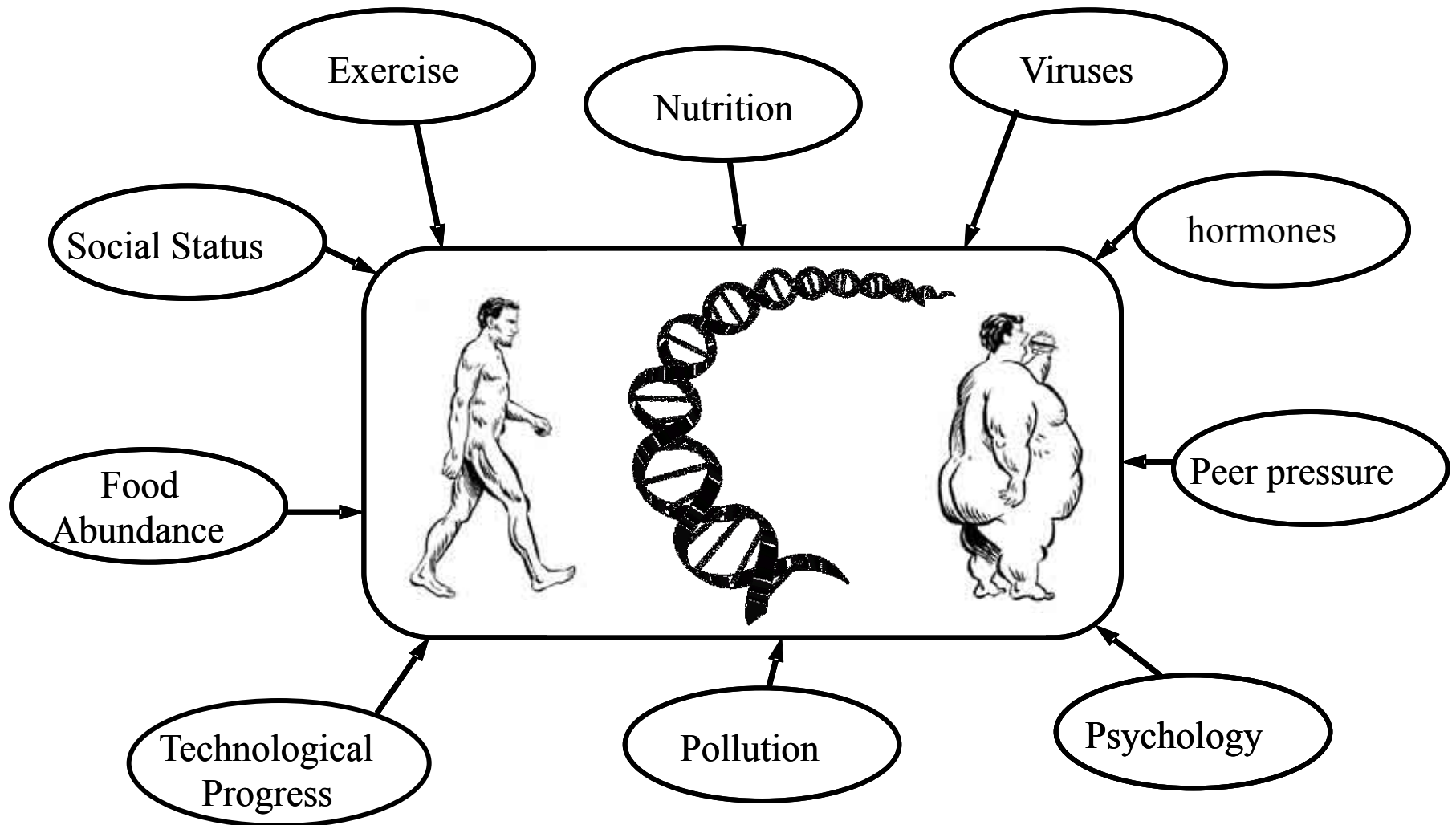
- ✓ Familiární agregace
- ✓ Studie na dvojčatech (větší konkordance výskytu obezity u MZ dvojčat než u DZ)
- ✓ Velké rodinné studie (množství „statistických modelů“ konzistentních s genetickými vlivy)

HERITABILITA OBEZITY

Rodinné studie	30-50%
Adopční studie	10-30%
Studie na dvojčatech	50-90%

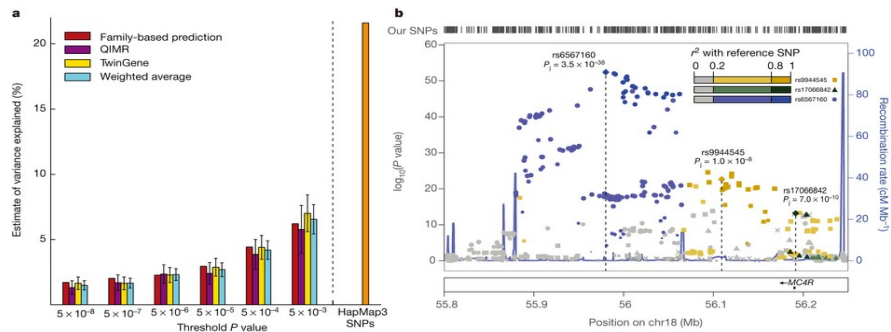
- ✓ multifaktoriální, polygenní
- ✓ roli hrají kombinace určitých genů a určitých faktorů zevního prostředí

Genetika polygenní obezity

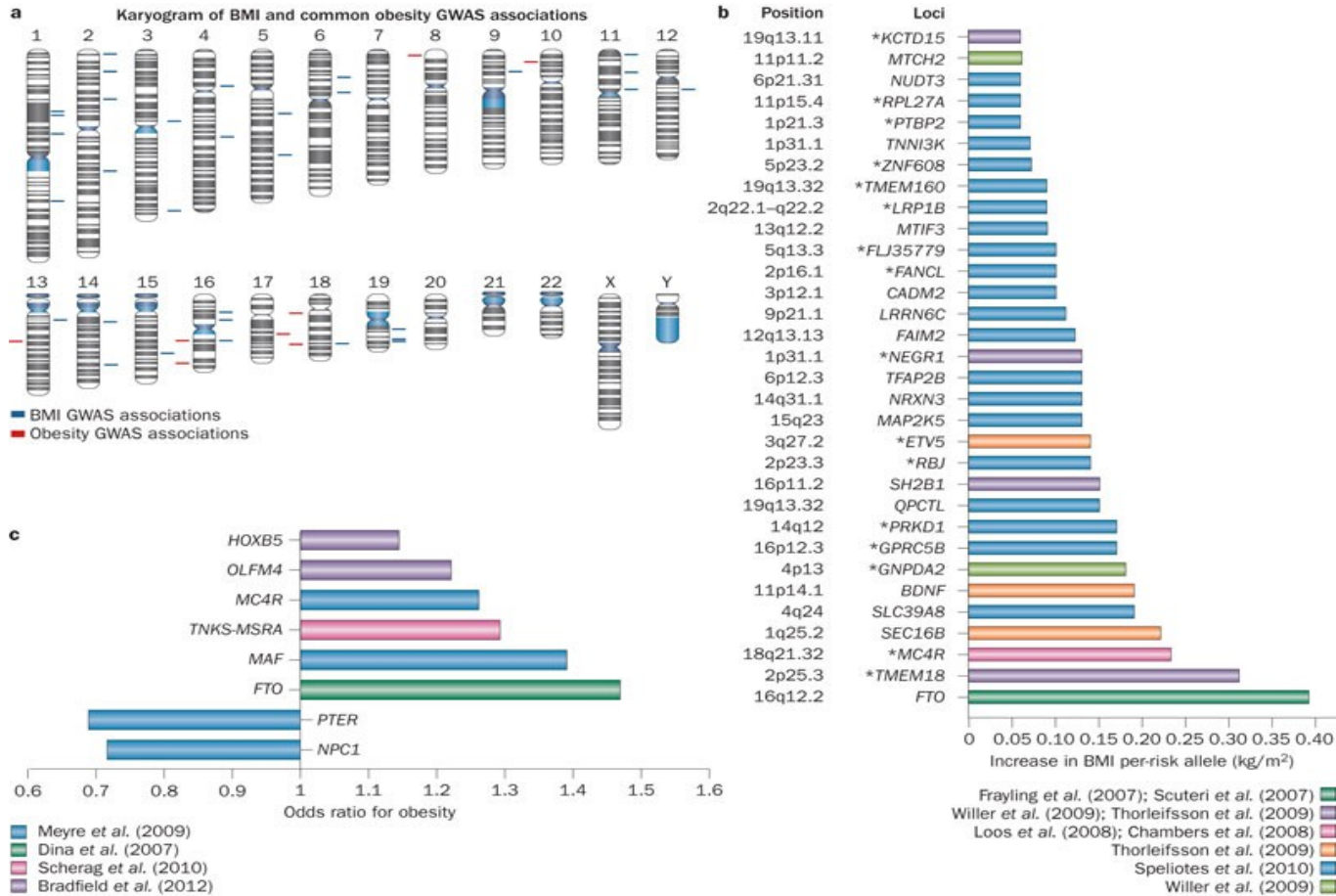


The GIANT study

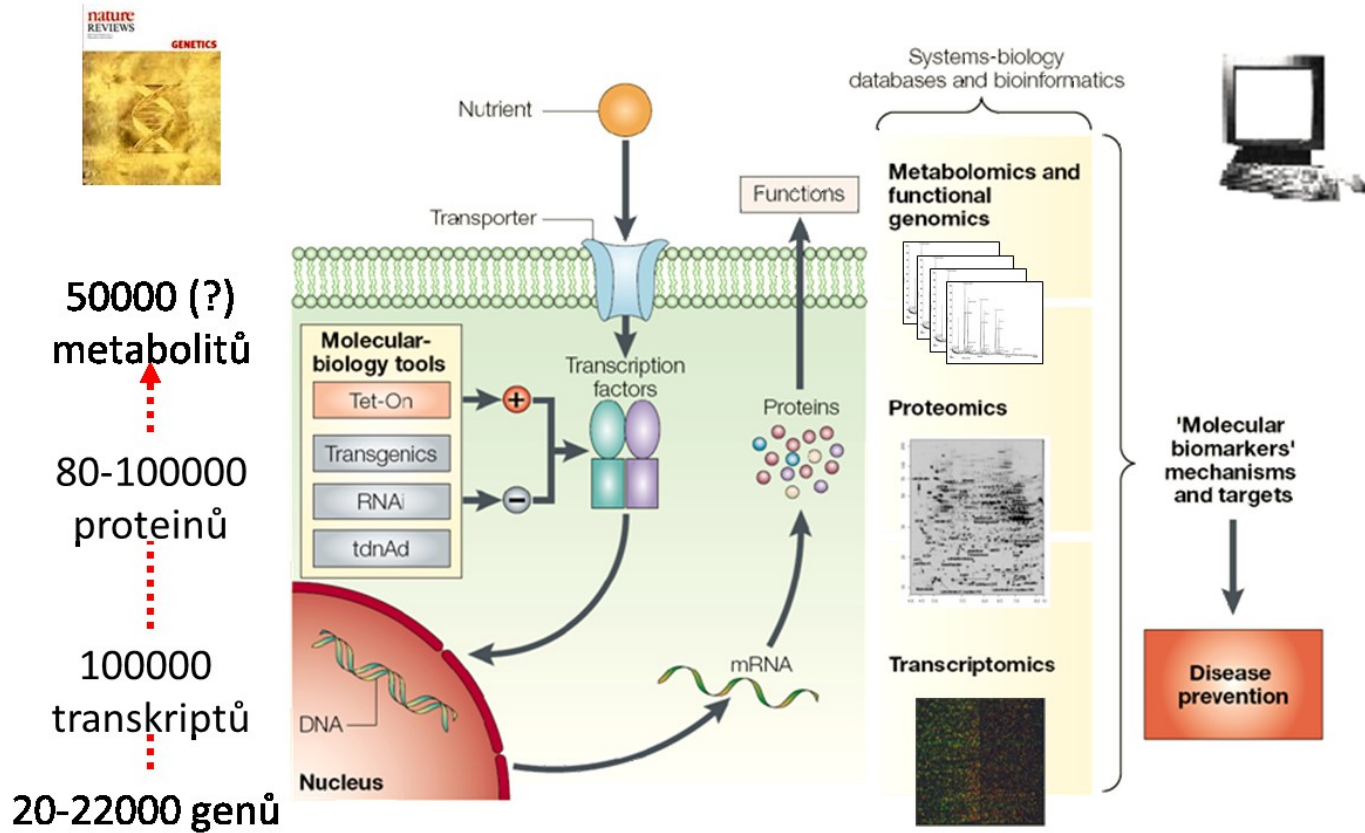
- Genetic Investigation of ANthropometric Traits
- Locke et, 2015
- Metaanalýza 340,000 jedinců
- Identifikace 97 GWS lokusů asociovaných s BMI, z toho 56 lokusů nových !!!
- 97 lokusů vysvětluje ~ 2,7% BMI variace
- GWAS odhady - běžné polymorfismy mohou odpovídat za více než 20% BMI variace
- Gen FTO:
 - 0,5 % variace (2 – 3 kg)



Obezita – kandidátní geny



Nutrigenomika



Nutrigenomika - definice

- ✔ **Nutrigenomika** – výzkum se zaměřuje na to, jakým způsobem živiny nebo složky stravy obecně mění genovou expresi, koncentrace proteinů a metabolitů a na to, jakým způsobem tyto složky ovlivňují metabolismus, zdravotní stav a riziko onemocnění.
- ✔ působení nutrientů na úrovni buňky lze definovat jako takzvané **„dietní podpisy“** či **„dietní otisky“ (dietary signatures)**
- ✔ Alternativně se nutrigenomický výzkum může zaměřit na stanovení **interakce jednoho či více genů s živinami a na význam konkrétního genu v patofyziologii sledovaného onemocnění.**

Nutrigenomika

✓ Nevýhody:

- Potrava – heterogenní směs bioaktivních látek (kontrast s farmakogenomikou – známá koncentrace látky, mechanismus účinku a cílové struktury)
- Nutrigenomické studie (vliv určitého typu diety na expresi genů) často pomíjejí vliv genetické variability uvnitř zkoumané kohorty
- Nepřesné extrapolace výsledků z in vitro studií

NUTRIGENOMIKA

Metody molekulární biologie

Odběr biologického materiálu – odběr periferní krve (mononukleáry), biopsie (např. tenké sřevo, žaludek, srdce), tkáňové kultury



Epigenom, Transkriptom, Proteom, Metabolom



Molekulární metody – 2D elektroforéza, qRT-PCR, ELISA, sekvenování, DNA , RNA chip, Western blot, hmotnostní spektrometrie (MS), nukleární magnetická rezonance

1) Epigenom – metylace DNA

Stanovení metylace CpG ostrůvků:

- ✓ **1) PCR specifická pro detekci methylace**
 - ošetření DNA bisulfitem sodným – přeměna nemetylovaných cytosinů na uracil
 - Specifické primery pro metylovanou a nemetylovanou část – vznikají fragmenty různé délky

- ✓ **2) HELP assay** (angl. „HpaII tiny fragment Enrichment by Ligation-mediated PCR”)
 - 2 RE HpaII a MspI
 - Oba štěpí 5'-CCGG-3', ale HpaII ne v případě metylace
 - množství MspI a HpaII fragmentů vyhodnoceno pomocí čipu

- ✓ **3) Sekvenování**
 - ošetření DNA bisulfitem sodným
 - sekvenace modifikované DNA

1) Epigenom - methylace

A. Unmethylated DNA sequence



Unmethylated
cytosines modified



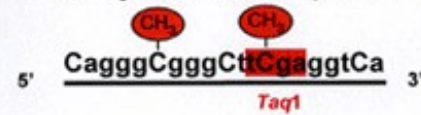
Sodium bisulphite
treatment



PCR + analysis



Methylated DNA sequence

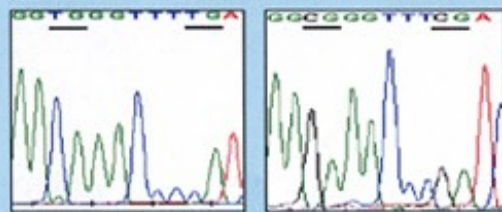


Methylated cytosines
unchanged



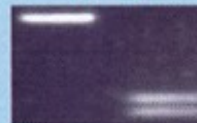
B.

(i) Bisulphite sequencing



(ii) COBRA

Taq1 digest



Unmeth
DNA Meth
DNA

(iii) MSP

Specific PCR primers

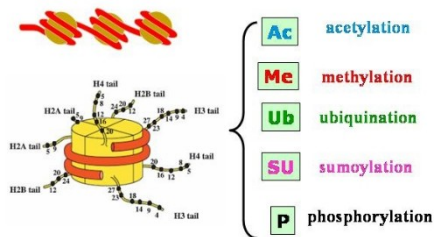
M U M U



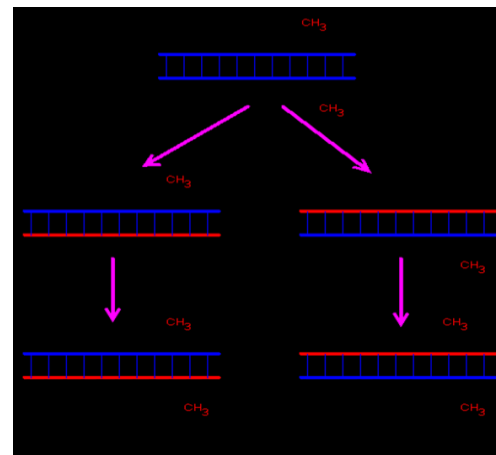
Unmeth
DNA Meth
DNA

Epigenetika

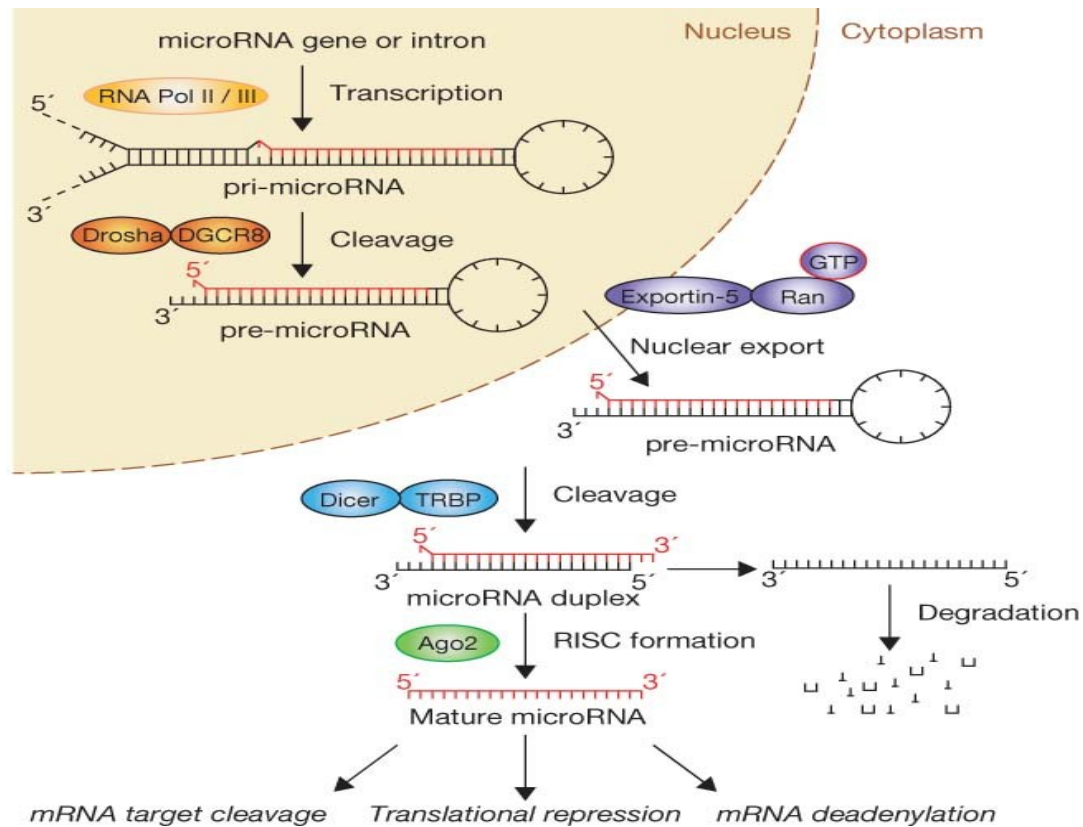
- ✓ Epigenetika = věda o stabilních (reverzibilních) genetických modifikacích, které vedou ke změně exprese a funkce genů beze změny sekvence DNA
- ✓ Methylace DNA, modifikace histonů, miRNA
- ✓ Parentální imprinting, inaktivace transpozonů
- ✓ 2 vlny demetylací u savců: v zárodečných buňkách a před implantací embrya
- ✓ Transkripce cca 50% mikroRNA regulována metylací CpG ostrůvků
- ✓ 1 miRNA = regulace (většinou downregulace) 100 – 200 mRNA
- ✓ Zapínání, korigování výkonu či úplné vypínání genů - jsou vrcholem genetického řízení.
- ✓ Epigenetické změny jsou ovlivnitelné, dědičné a v mnoha případech vratné.



The figure illustrates nucleosome models and major posttranslational modifications which play essential roles in gene expression regulation and disease processes



MikroRNA – mechanismus účinku



Důležité enzymy zapojené do epigenetických modifikací

Enzyme	Type of modification	Effect on gene expression
DNMT1, DNMT3L, DNMT3A, DNMT3B	Maintenance and de novo DNA methylation	Gene expression suppression
TET family	DNA demethylation	Induction of gene expression
IDH family	DNA demethylation	Induction of gene expression
HMTs	Methylation of lysine in histone protein	H3K4me3 → transcription activation; H3K9me or H3K27me → transcription repression
HDMs	Demethylation of lysine in histone protein	Transcription activation or repression based on the lysine residue
HATs	Histone acetylation	Transcription activation
HDACs classes I-IV	Histone deacetylation	Transcription repression
SIRT1-7	Histone deacetylation	Transcription repression
MSK1 (RPS6KA5)	Histone phosphorylation	Transcription activation

DNMT, DNA methyltransferase; TET, ten eleven translocation; IDH, isocitrate dehydrogenase; HMT, histone methyltransferase; HDM, histone demethylase; HAT, histone acetyltransferase; HDAC, histone deacetylase; SIRT, sirtuin; MSK1, mitogen- and stress-activated protein kinase-1; RPS6KA5, ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5.

Epigeneticky aktivní sloučeniny - fyto-sloučeniny

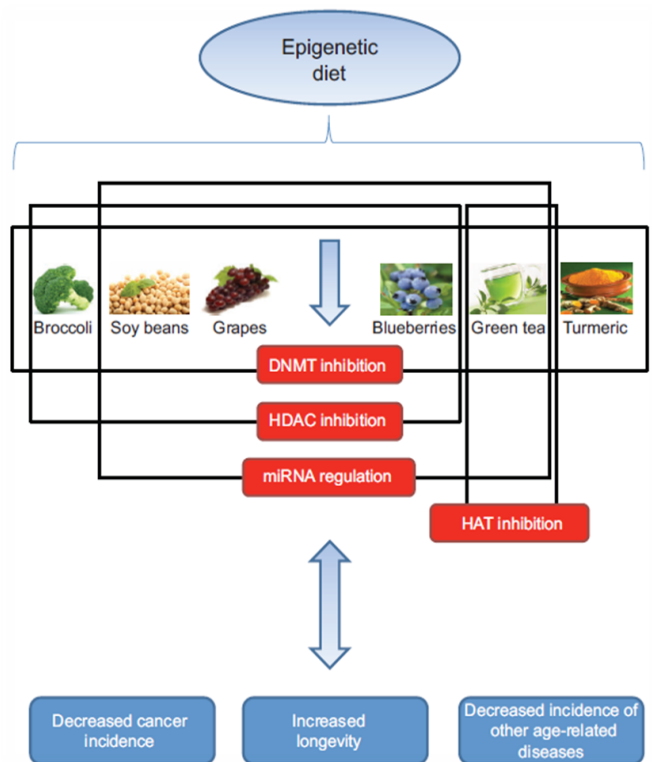


Table 1. Bioactive dietary compounds and their epigenetic functions

Dietary compound	Structure	Food source	Epigenetic function(s)
Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)		Green tea	DNMT inhibitor, HAT inhibitor, miRNA regulator
Sulforaphane (SFN)		Cruciferous vegetables (broccoli, kale, cabbage, Brussels sprouts)	HDAC inhibitor, DNMT inhibitor
Genistein		Soy and fava beans	DNMT and HDAC inhibitor, miRNA regulator
Curcumin		Turmeric (curry)	DNMT inhibitor
Resveratrol		Grapes, peanuts, mulberry, cocoa	DNMT and HDAC inhibitor, miRNA regulator

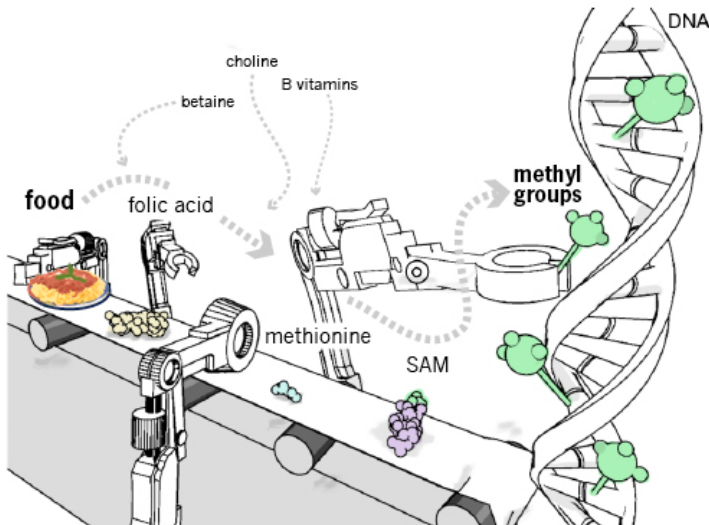
DNMT, DNA methyltransferase; HDAC, histone deacetylase; HAT, histone acetyltransferase

gen agouti – myš model

- ✓ Epigenetické modelování v průběhu těhotenství
- ✓ Geneticky identické potomstvo – různý fenotyp
- ✓ Demetylovaný gen -> žlutá barva: potomci náchylnější k obezitě, diabetu a nádorovému bujení
- ✓ Podání stravy ovlivňující metylaci DNA - vitamín B12, kyselina listová, cholin a betain



- ✓ Metylace agouti genu – tmaví hubení potomci se



These Two Mice are Genetically Identical and the Same Age



While pregnant, both of their mothers were fed Bisphenol A (BPA) but **DIFFERENT DIETS**:

The mother of this mouse received a **normal mouse diet**

The mother of this mouse received a diet **supplemented** with choline, folic acid, betaine and vitamin B12

SAM – S-Adenosyl -methionin

- koenzym mnoha methylačních enzymů (např. při methylaci bází v DNA nebo methylaci při tvorbě tzv. čepičky mRNA).

Sloučenina	Potraviny, které je obsahují	Epigenetické účinky
Methionin	Sezam, špenát, ryby, paraořechy, pepř	SAM syntéza
Kyselina listová	Slunečnicová semena, listová zelenina, játra, droždí	Syntéza methioninu
Vitamin B12	Maso, játra, ryby	Syntéza methioninu
Vitamin B6	Maso, celozrnné výrobky, zelenina, ořechy	Syntéza methioninu
SAM-e (s-adenosyl-methionin)	Doplňek stravy, v potravinách nestabilní	primární dárce methylové skupiny v různých reakcích v těle včetně přenosu na DNA
Cholin	Žloutky, játra, sója, vařené hovězí maso, kuřecí, telecí a krůtí	Dárce methylových skupin SAM
Betaine	Pšenice, špenát, mořské plody a cukrová řepa	Snižujete množství toxických látek prostřednictvím SAM

Epigenetika - karcinogeneze

✓ Hypermetylace a inaktivace genů zapojených do:

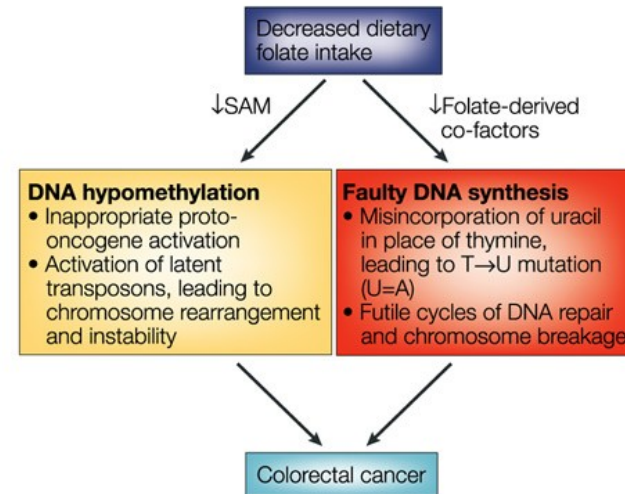
- Regulace buněčného cyklu: p16, p53
- DNA opravných mechanismů:
BRCA1 (breast cancer 1)
MGMT (methylguanin methyltransferase)
- angiogeneze: (např. THBS1)

✓ Hypometylace a aktivace imprintovaných protonkogenů

✓ Micro RNA: let – 7, miR 17, 21, 221 abnormální exprese → karcinogeneze

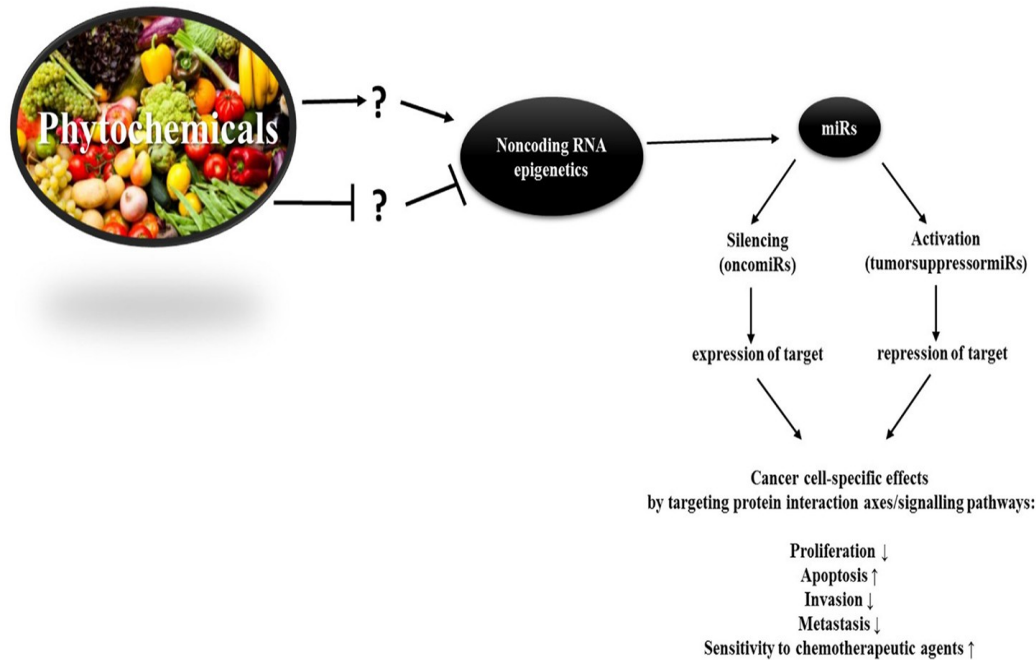
✓ Modifikace histonů:

- ztráta metylace a acetylace
- H4K20me3 – trimetylace
- Pacienti s nízkými hladinami of H3K4ac a vysokými of H3K27me3 – progresse nádoru (Chen et al., 2013)

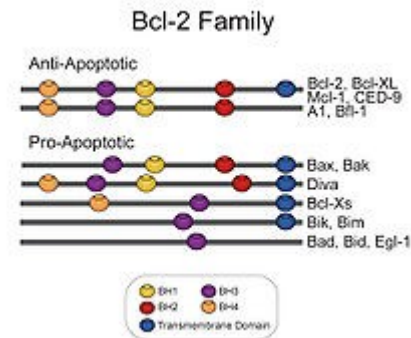
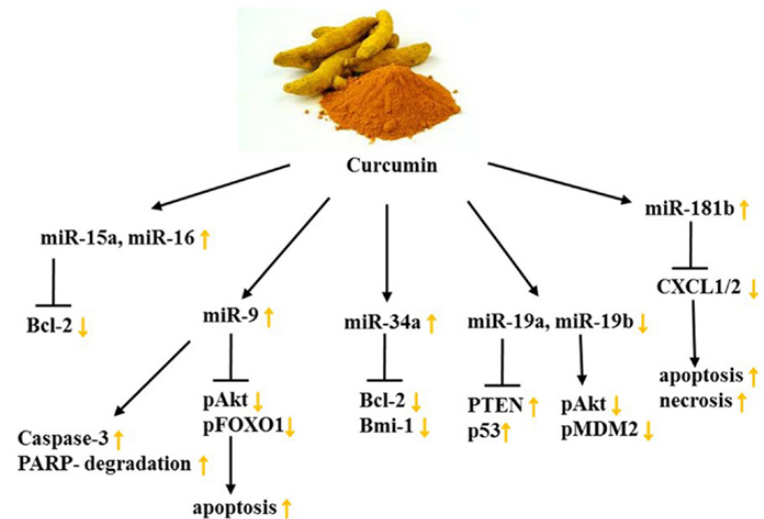
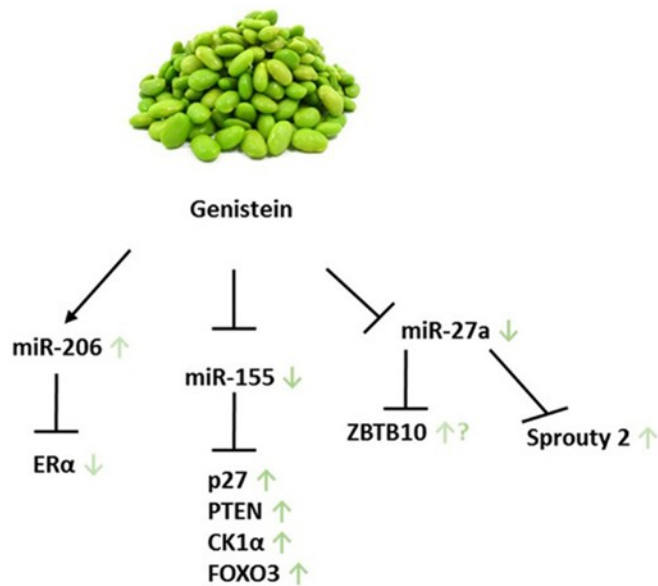


MiRNA – antikarcinogenní účinky fytochemikálií

Sulforafan, kurkumin, genistein, revestratol...



MiRNA – antikarcinogenní účinky fytochemikálií



2) Transkriptom

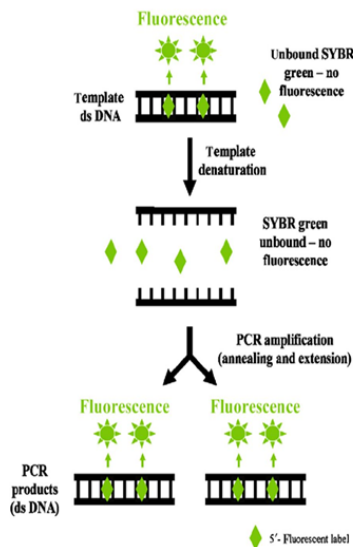
Transkriptom = kompletní sada mRNA přítomných v daném okamžiku v buňce, nebo tkáni, odráží míru transkripce genů, alt. sestřih a stabilitu transkriptů

✓ 1. Kvantitativní PCR v reálném čase – qRT-PCR

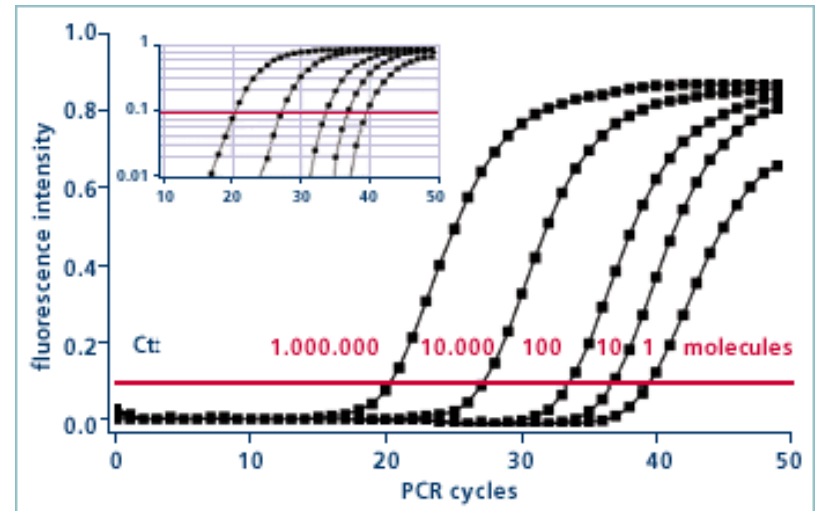
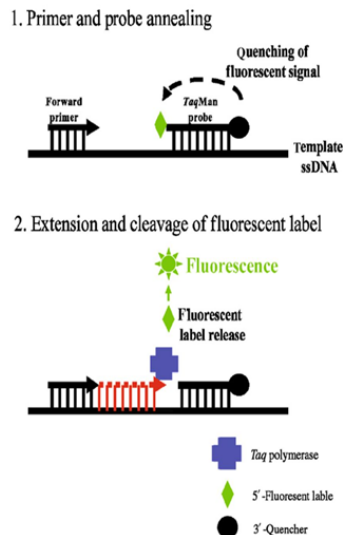
- mRNA je nutné přepsat do stabilnější cDNA
- Detekce produktu pomocí nespecifických interkalačních barviv (SYBR GREEN) nebo specifických sond (Taqman)
- V průběhu PCR tak dochází k uvolňování dalších a dalších molekul fluorescenčního barviva -----> **roste fluorescence reakční směsi.**
- Nárůst fluorescence odpovídá množství produktu, který v reakci vzniká.
- **Porovnáváme mezi sebou Ct (cycle treshold) – počet cyklů nutných k dosažení určité míry fluorescence**
- **Detekce mRNA, mikroRNA**

qRT - PCR

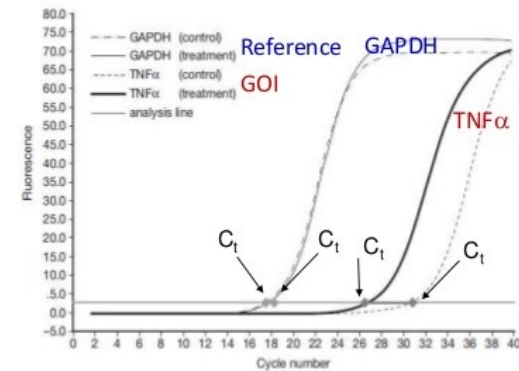
(a) SYBR green assays



(b) TaqMan (5' nuclease) assays



Data and analysis: $\Delta\Delta Ct$ method - amplification plots



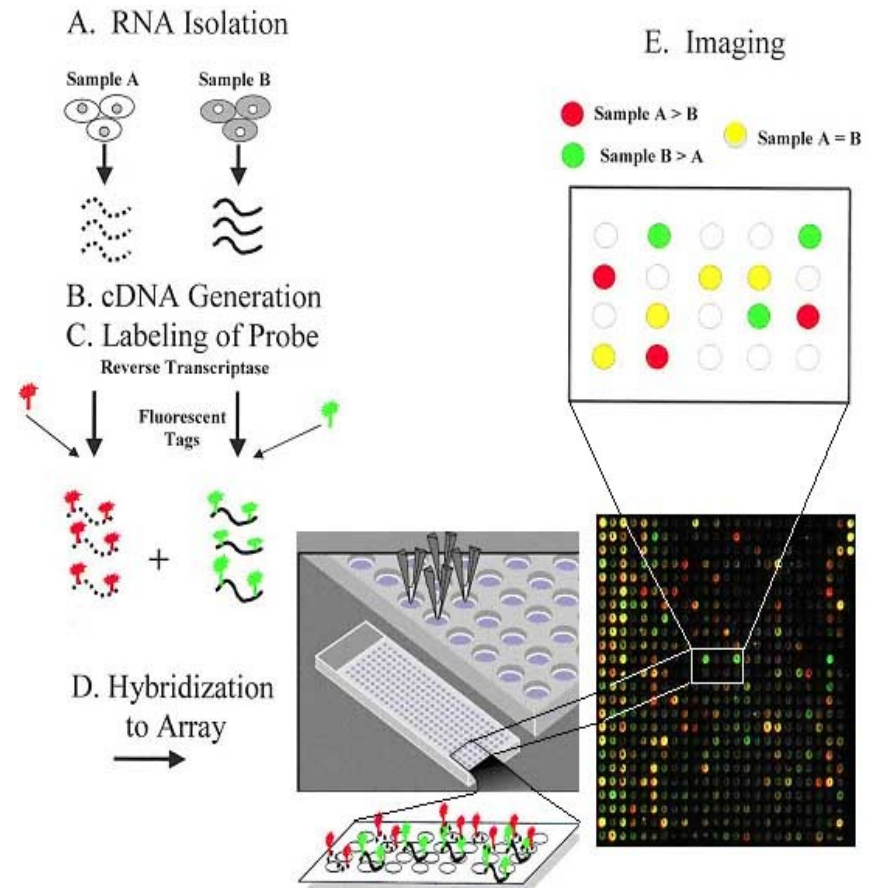
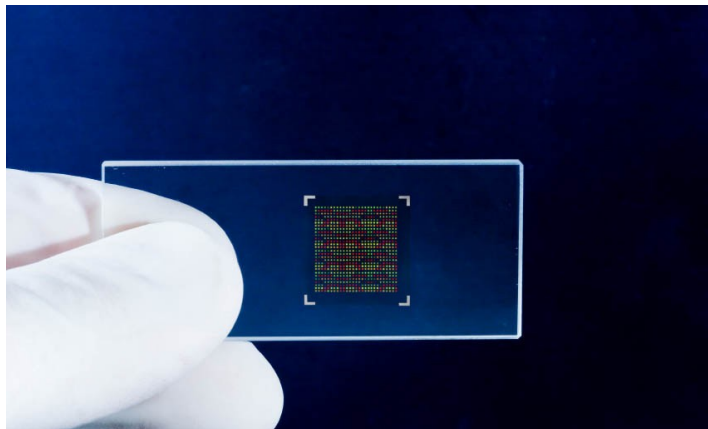
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (TNF\alpha_{treated} - GAPDH_{treated}) - \Delta Ct (TNF\alpha_{control} - GAPDH_{control})$$

$$\text{Fold change} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

2) Traskriptom

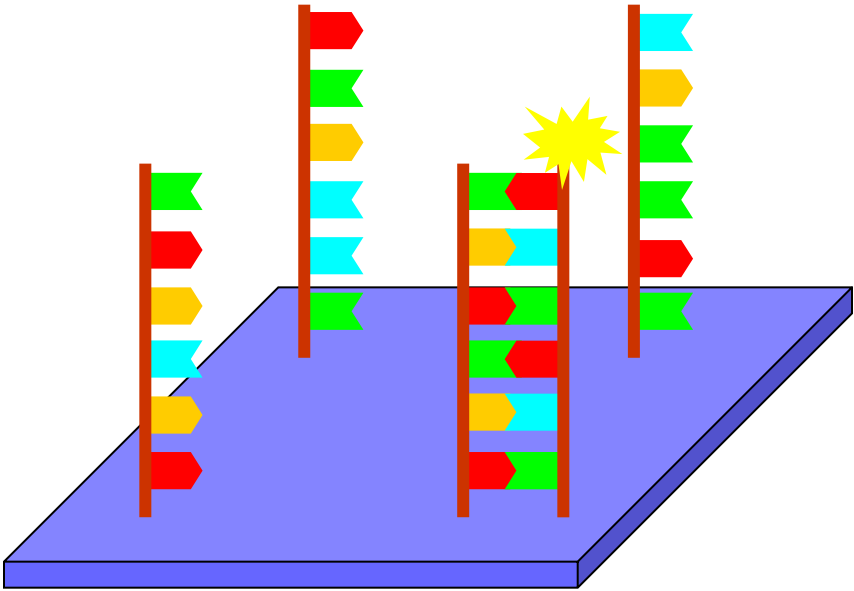
✓ 2. Expresní DNA microarray, čip

- Stanovení stovky – tisíce mRNA
- Vytvoření DNA čipu
- Příprava vzorku
- Hybridizace vzorku s čipem
- Omytí čipu
- Skenování čipu (po excitaci laserem)
- Zpracování výsledků – digitální zpracování obrazu





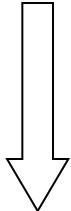
Hybridizace



Array, Čip
(imobilizovaná sonda)

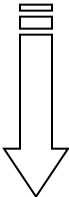
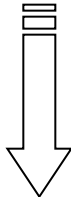
Fluorescenční signál

Fluorescenčně značené analyty
(mobilní fáze)



Pozice

Síla signálu



Identita

Množství

Transkriptom

- Transkripční faktory (TF) jsou proteiny, které se spolupodílejí na **iniciaci transkripce**
- Váží se na jednotlivé elementy promotoru, čímž **usnadňují vazbu příslušné RNA-polymerázy**.
- Prokaryotická RNA-polymeráza ke své činnosti TF nevyžaduje, transkripce u eukaryot je na přítomnosti **TF závislá**.

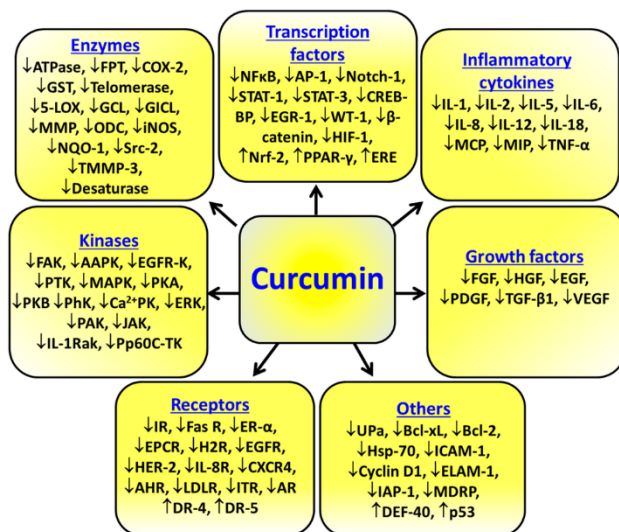
Table 1 | **Transcription-factor pathways mediating nutrient-gene interactions**

Nutrient	Compound	Transcription factor
Macronutrients		
Fats	Fatty acids Cholesterol	PPARs, SREBPs, LXR, HNF4, ChREBP SREBPs, LXRs, FXR
Carbohydrates	Glucose	USFs, SREBPs, ChREBP
Proteins	Amino acids	C/EBPs
Micronutrients		
Vitamins	Vitamin A Vitamin D Vitamin E	RAR, RXR VDR PXR
Minerals	Calcium Iron Zinc	Calcineurin/NF-ATs IRP1, IRP2 MTF1
Other food components		
	Flavonoids Xenobiotics	ER, NFκB, AP1 CAR, PXR

AP1, activating protein1; CAR, constitutively active receptor; C/EBP, CAAT/enhancer binding protein; ChREBP, carbohydrate responsive element binding protein; ER, oestrogen receptor; FXR, farnesoid X receptor; HNF, hepatocyte nuclear factor; IRP, iron regulatory protein; LXR, liver X receptor; MTF1, metal-responsive transcription factors; NFκB, nuclear factor κB; NF-AT, nuclear factor of activated T cells; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PXR, pregnane X receptor; RAR, retinoic acid receptor; RXR, retinoid X receptor; SREBP, sterol-responsive-element binding protein; USF, upstream stimulatory factor; VDR, vitamin D receptor.

Transkriptom - příklady

- ✓ kurkumin Snižuje expresi řady genů, jež potencují zánět se vztahem k rozvoji k např. Alzheimerovy choroby, karcinomu a ischemické choroby srdeční.
- ✓ Indie má nejnižší incidenci Alzheimerovy choroby na světě



Bidostupnost, účinnost?

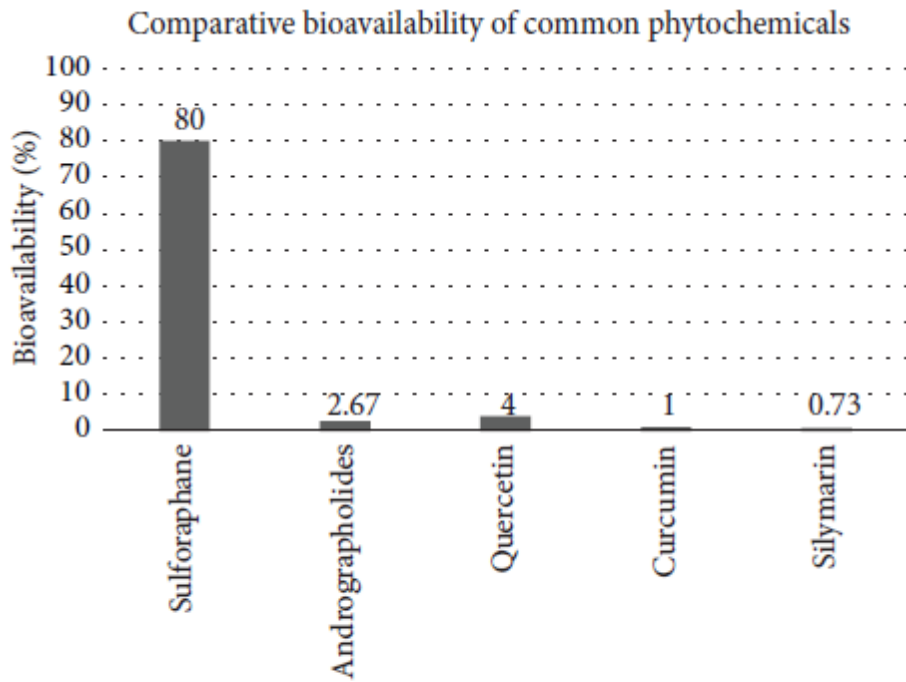


FIGURE 3: Comparative bioavailability of phytochemicals commonly used in supplements [90, 124, 127–129, 153].

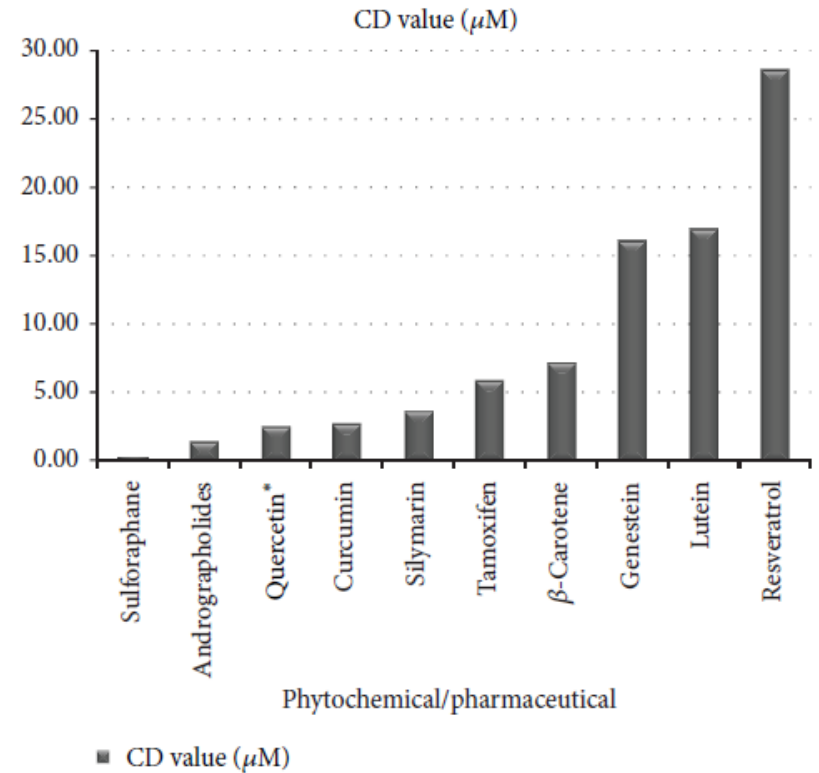


FIGURE 2: CD values of popular phytochemicals used as supplements and a commonly prescribed pharmaceutical. CD values refer to the concentration of a compound required to double the activity of the Phase II detoxification enzyme, quinone reductase [83, 87–89, 91].

3) Proteom

PROTEOM = Kompletní sada bílkovin přítomných v daném okamžiku v buňce, nebo tkáni, zahrnující veškeré jejich modifikace, vzájemné interakce, lokalizaci a metabolický obrat.

1. Western blot (imunoblot)

- Detekce specifického proteinu
- Rozdělení proteinu na gelu (např. SDS-PAGE) podle velikosti
- Přenesení proteinu z gelu na membránu (např. nitrocelulósovou) pomocí el.proudu
- Detekce pomocí protilátek
- Vizualizace : kolorimetrický nebo chemiluminiscenční způsob
- Semikvantitavní stanovení

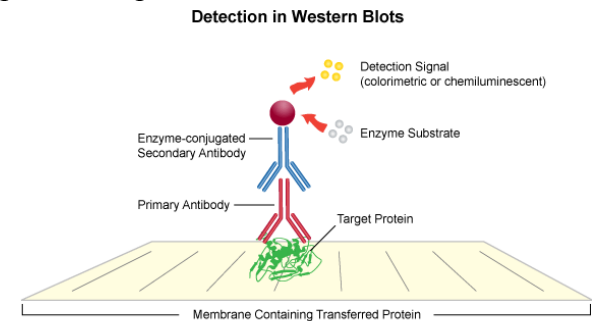
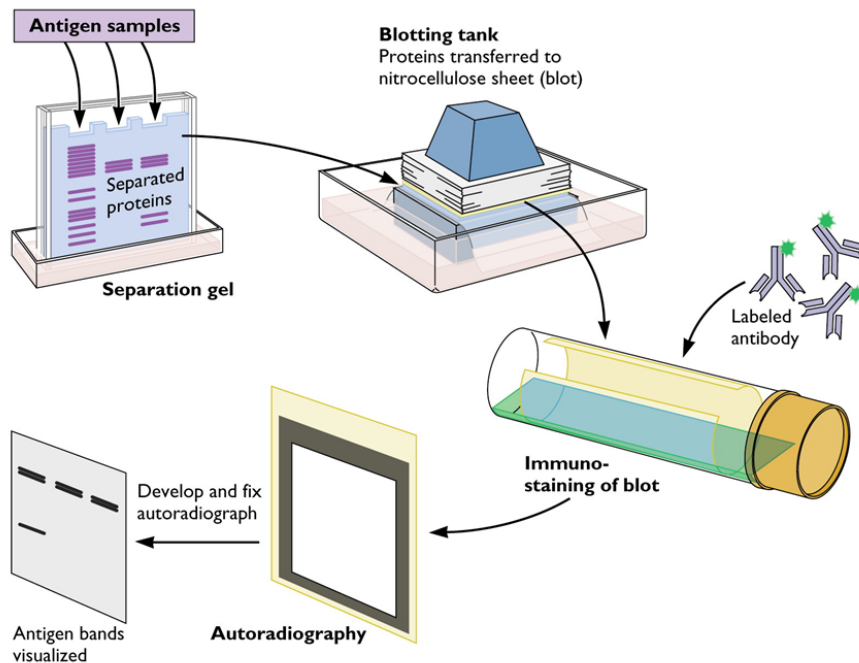
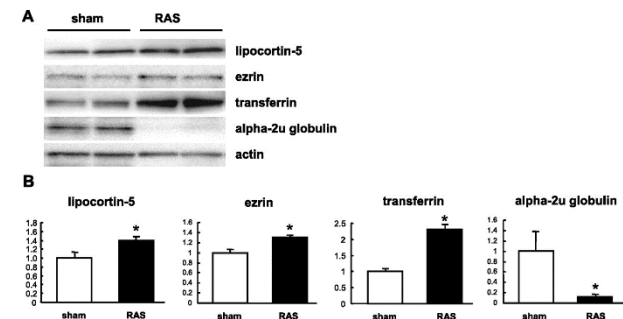


Diagram 2: Illustration of detection in Western Blots.



3) Proteom

2. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

- Kvantitativní stanovení proteinů
- Interakce protilátka - antigen
- Několik modifikací – přímá (antigen), nepřímá (protilátka), sendvičová

Antigen

- detekovaný v testovaném vzorku
- známý, komerčně připravovaný

Protilátka

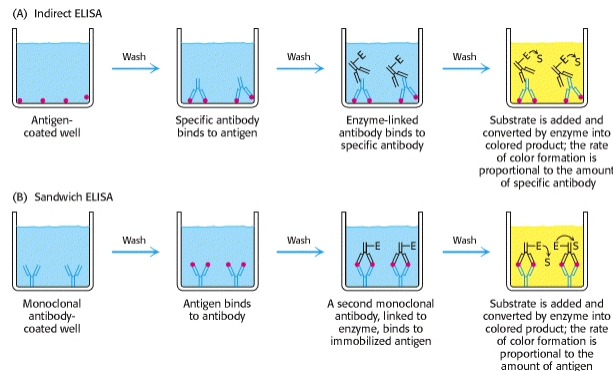
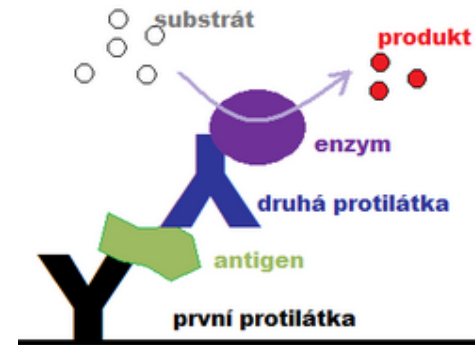
- detekovaná v testovaném séru
- známá, komerčně připravovaná

Konjugát

- jedná se opět o protilátku proti na kterou je navázaný enzym (konjugovaná enzymem)

Substrát

- je chemická látka, která reaguje s enzymem a tím změni svou barvu



3) Proteom

3. 2D gelová elektroforéza a hmotnostní spektrometrie

– A) Rozdělení podle izoelektrického bodu (pI) v pH gradientu

- při pH nižším než pI se protein pohybuje k negativnímu nabitému konci
- při pH vyšším než pI se protein pohybuje k pozitivnímu nabitému konci
- Protein se zastaví při pH stejném jako jeho pI

– B) Rozdělení podle velikosti v polyakrylamidovém gelu (PAGE)

- Aplikace elektrického pole v 90°

– C). Zviditelnění

- Silver, Coomassie barvení

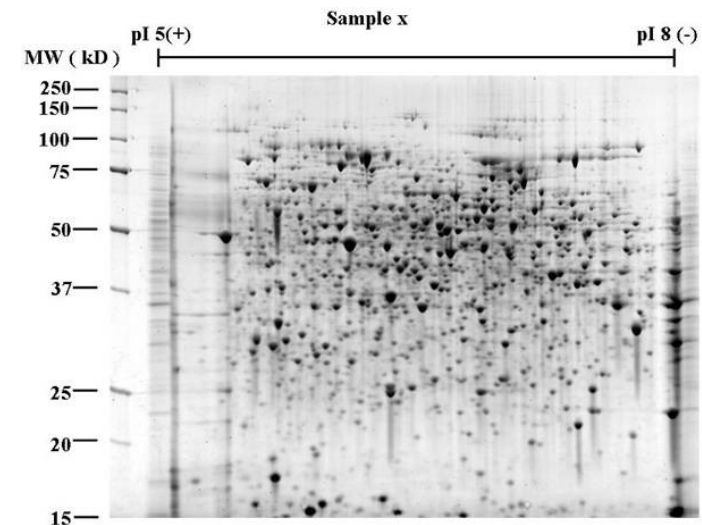
– D) Kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení

- Hmotnostní spektrometrie (MS)
- Nukleární magnetická rezonance (NMR)

– Rozdělí stovky – tisíce proteinů

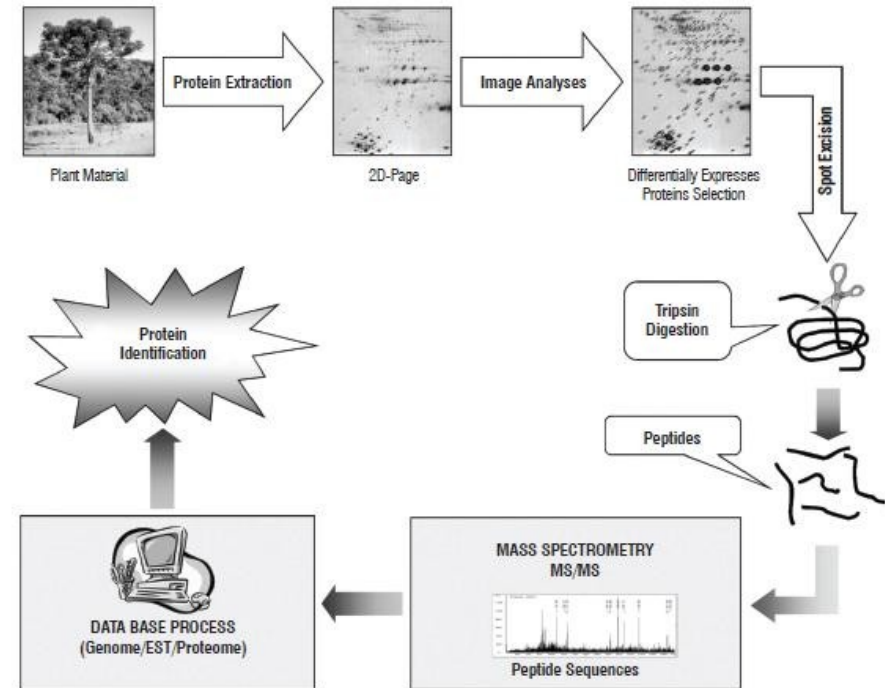
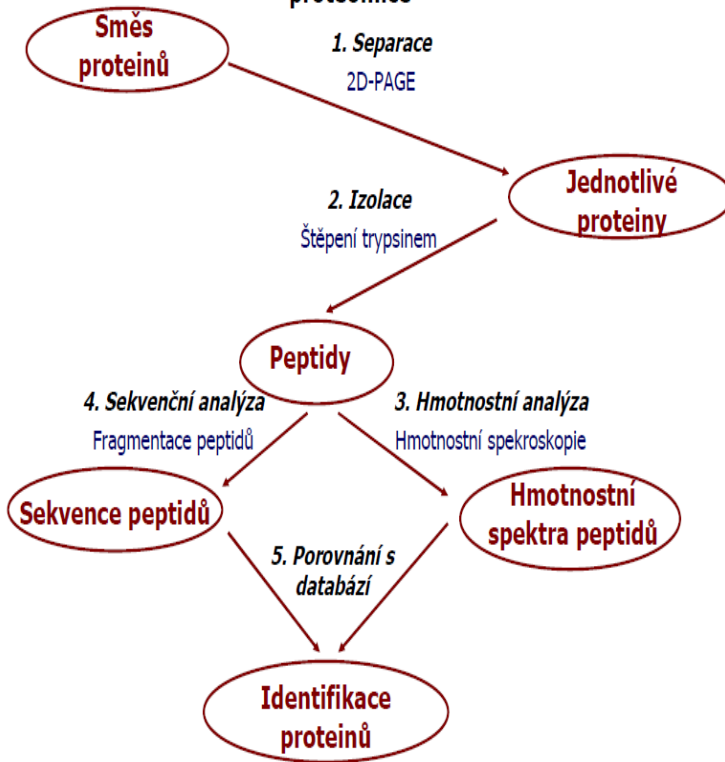
4. Rentgenová krystalografie

- Určení 3D struktury proteinů

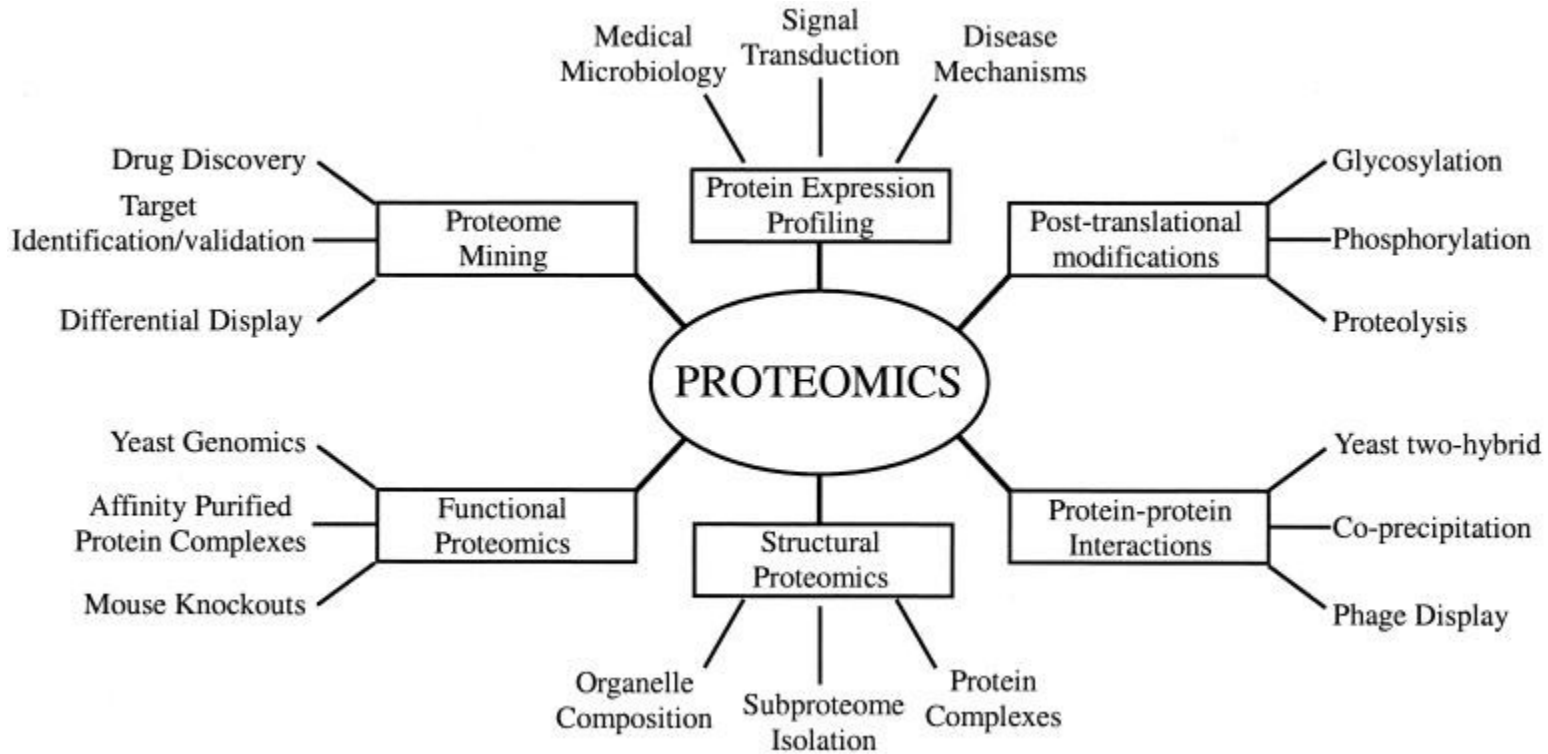


3) Proteom

Základní schéma analýzy užívané v proteomice



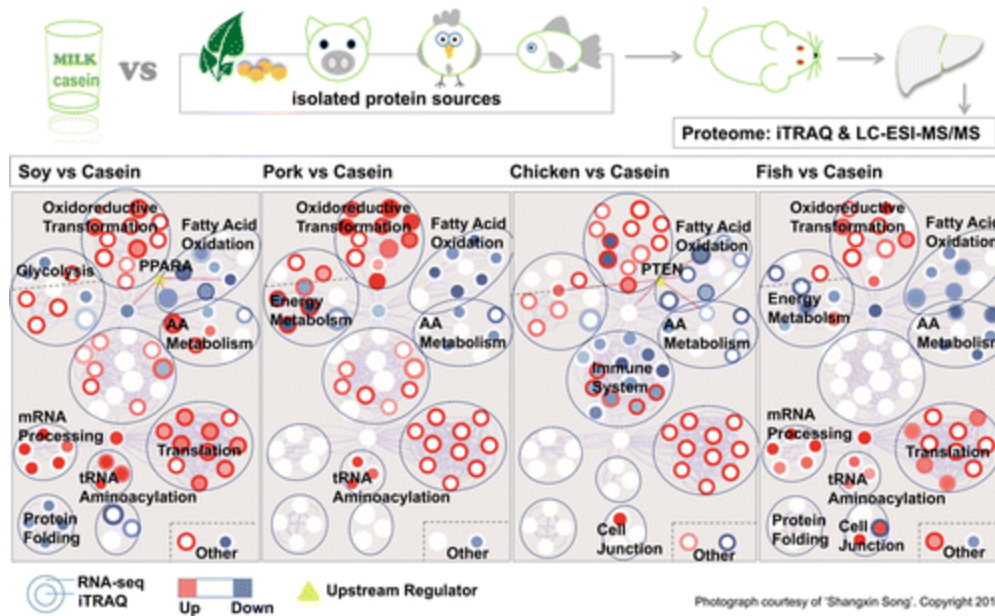
Proteomika



Proteomika - příklad

Vliv proteinových izolátů ze sóji, kuřecího, vepřového rybího masa na metabolické dráhy v játrech potkana

- ✓ Srovnávací proteomika
- ✓ Identifikováno 1437 proteinů
- ✓ V porovnání s kaseinem (kontrola) všechny izoláty snižovali množství proteinů podílejících se na metabolismu mastných kyselin a Ppar α signální kaskádě
- ✓ Izoláty ze sóji a z ryb zvyšovali zpracování a translaci mRNA
- ✓ Studie prokázala charakteristické účinky proteinových izolátů na metabolismu jater u potkanů



Proteomika - příklad

Asociace mezi plazmatickými hladinami α -tokoferolu a plazmatickým proteomem u člověka

- ✓ N = 1022
- ✓ Analyzováno 54 proteinů
- ✓ Pozitivní korelace mezi hladinami α -tokoferolu a koncentracemi apolipoproteinu C-III, fibrinogenu(alpha, beta, gamma řetězce), fibronektinu a fibrinopeptidu A
- ✓ Cirkulující hladiny α -tokoferolu pozitivně korelují ze specifickými plazmatickými proteiny --> Nově popsané fyziologické účinky vitamínu E

4) Metabolom

✔ Metabolom

- = kompletní soubor nízkomolekulárních látek, přítomných v buňce či tkáni v daném čase
- = soubor meziproduktů a koncových produktů genové exprese a enzymatické aktivity
- = Soubor organických (aminokyseliny, mastné kyseliny, sacharidy, organické kyseliny, lipidy, sekundární metabolity) a anorganických látek a elementů

✔ 1) Extrakce a purifikace metabolitů

- Extrakce na pevné fázi (SPE)
- Superkritická fluidní extrakce (SFE)
- Mikrovlnná extrakce (MAE)

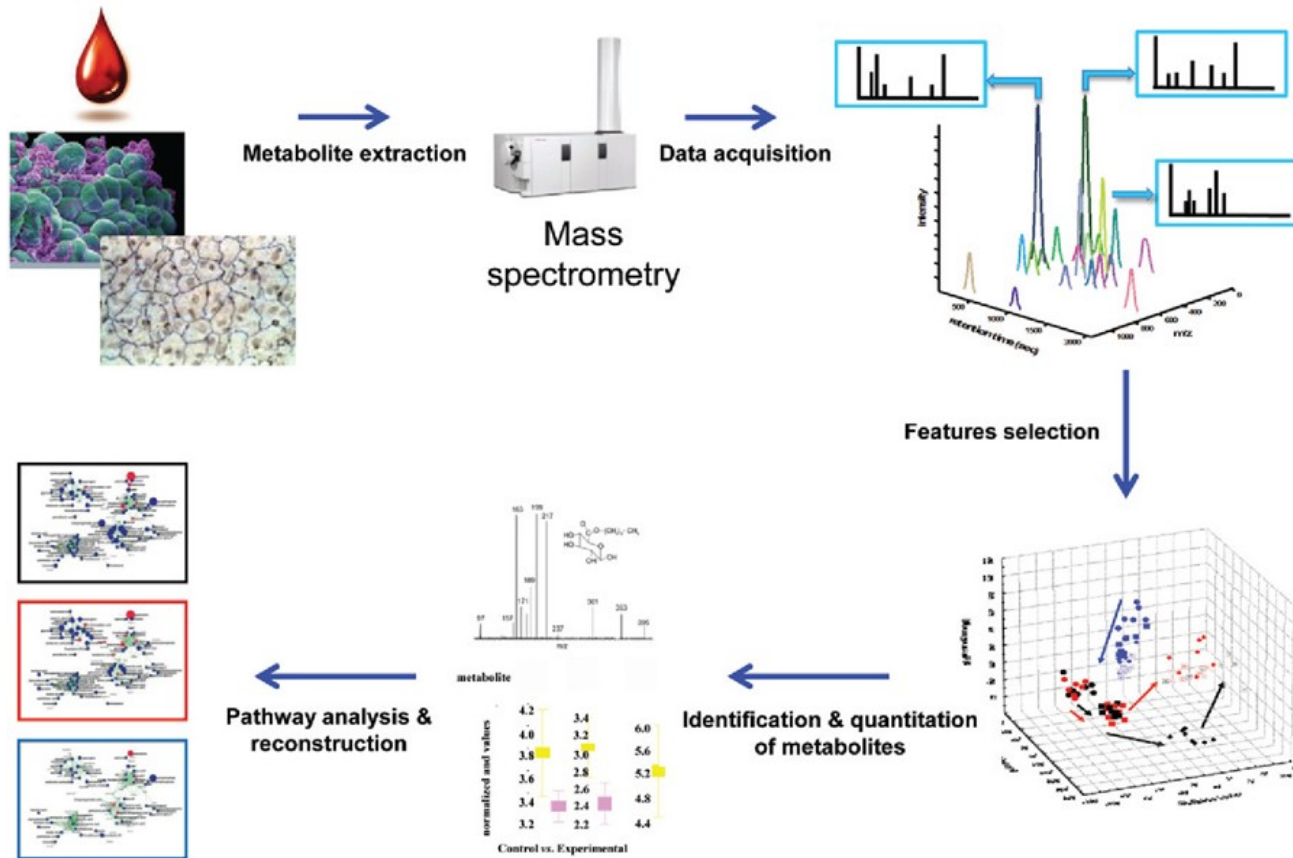
✔ 2) Derivatizace

- Převedení analytu chemickou reakcí na její derivát s požadovanými vlastnostmi
- Změna polarity, vnesení chromoforu, fluoroforu

✔ 3) Analytické metody

- Kapalinová, plynná chromatografie, kapilární elektroforéza s hmotnostní nebo UV/VIS spektrometrií
- NMR

4) Metabolom



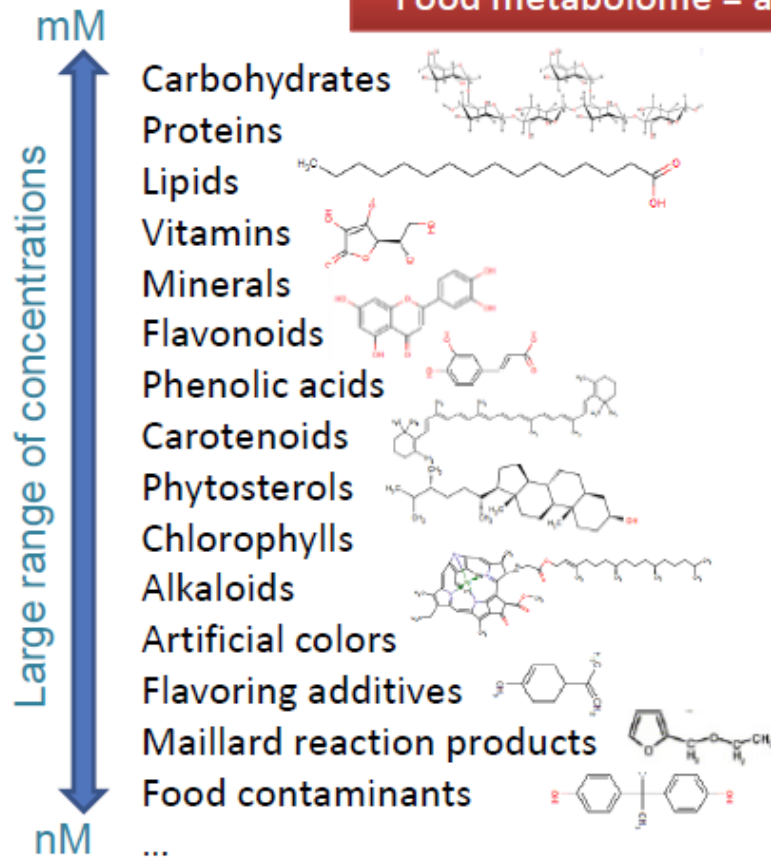
Metabolomika

- a) **Cílená analýza (target analysis)**- substrát nebo produkt jediného enzymu
- b) **Určení metabolického profilu (metabolic profiling)** – kvantitativní analýza predefinovaných metabolitů
- c) **Vlastní metabolomika** – analýza „kompletního“ souboru metabolitů buňky, tkáně

- ✓ **The Human Metabolome Database**
- ✓ >16,000 endogenních metabolitů,
- ✓ >1500 metabolitů léků
- ✓ >22,000 složek potravy a metabolitů potravy

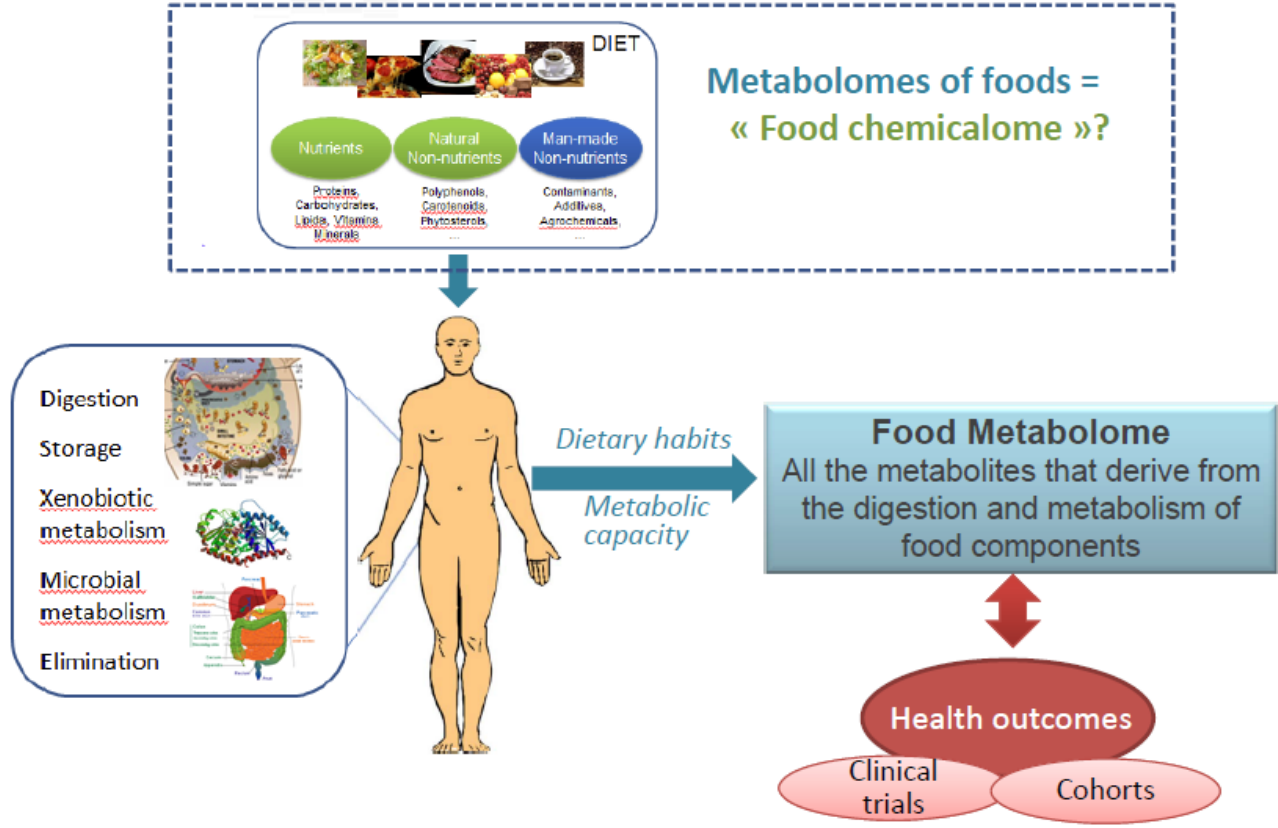
FOOD METABOLOME: AN ANALYTICAL CHALLENGE

Food metabolome = at least 25,000 compounds



Usually analyzed using a range of distinct targeted methods
(GC-MS, LC-UV, LC-MS in pos or neg mode, NMR, ...)

THE FOOD METABOLOME DEFINITION



✓ Děkuji Vám za pozornost