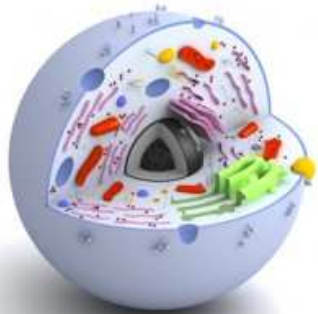




Department of Biology
Faculty of Medicine • Masaryk University

Modely....



... Vladimír Rotrekl

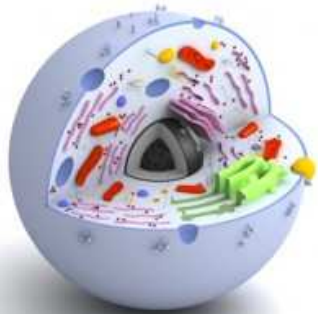




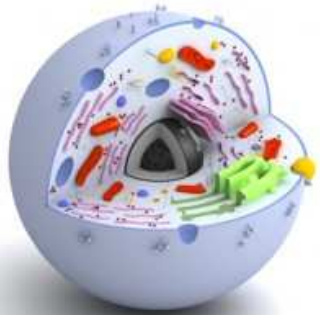
Modely....

... tentokrát buněčné modely chorob..

... Vladimír Rotrekl



K čemu slouží buněčné modely chorob...?



poznání (molekulární podstaty chorob)

vývoj nových léčiv

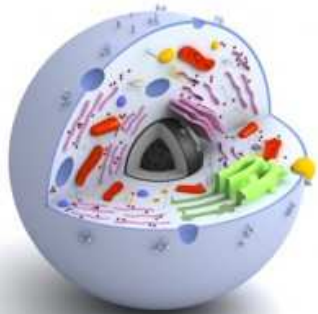
Proč molekulární podstata a proč nová léčiva?

Nové choroby

Nové příčiny známých chorob

Rezistence k existujícím léčivům

Mutace a adaptace stávajících kmenů



... a do toho všeho nám dochází tradiční inspirace...

Jako např. vyvraždění části vojska Marka Antonia ve válce s Parthy

... aneb jak objevit atropin v rulíku zlomocném



Journal of Medicinal Plants Research Vol. 4(2), pp. 082-086, 18 January, 2010
Available online at <http://www.academicjournals.org/JMPR>
ISSN 1996-0875© 2010 Academic Journals

Review

Herbal medicine in ancient Egypt

N. H. Aboelsoud

Department of Complementary Medicine Researches and Applications National Research Center- Cairo, Egypt.
E-mail: neveenster@gmail.com.

Accepted 8 December, 2009

- Acacia (*acacia nilotica*) - vermifuge eases diarrhea and internal bleeding, also used to treat skin diseases.
- Aloe vera - worms, relieves headaches, soothes chest pains, burns, ulcers and for skin disease and allergies.
- Basil (*ocimum basilicum*) - excellent for heart.
- Balsam Apple (*malus sylvestris*) or Apple of Jerusalem - laxative, skin allergies, soothes headaches, gums and teeth, for asthma, liver stimulant, weak digestion.
- Bayberry (*Myrica cerifera*) – stops diarrhea, soothes



Department of Biology
Faculty of Medicine • Masaryk University

Odhad: cca 600 dignóz starého Egypta

V roce 2007 WHO registrovalo 14199 kódů v
ICD10



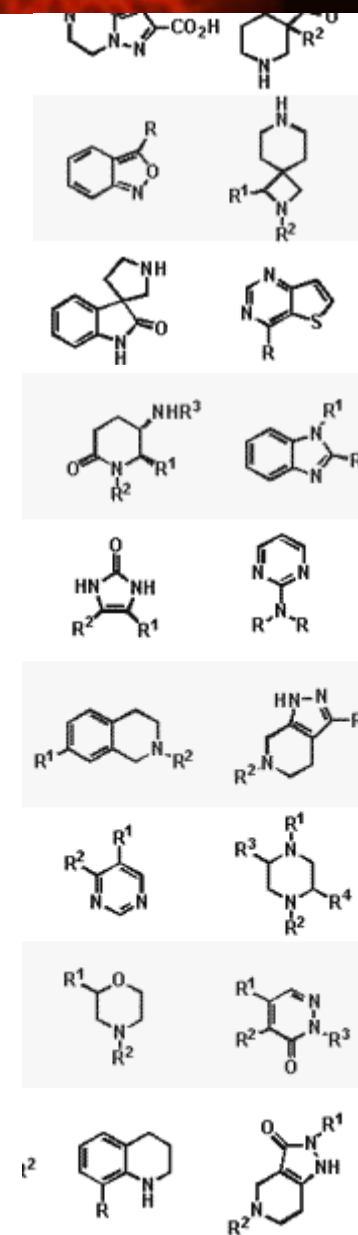


Známe tisíce chorob..!

...máme ale také k dispozici knihovny
stovek tisíc chemických látek



- Látky přírodního původu
- Produkty kombinatorické chemie



Knihovny malých molekul ...

dostupné jako kolekce tisíců látek na mikrotitračních destičkách
umožňují rychlý skrining tisíců látek v reálném čase

- **Nature-Inspired Chemistry:**

TimTec Natural Compound Library, NPL

TimTec Natural Derivatives Library, NDL

Flavonoid Derivatives

Plant Extracts

- **ActiTarg Series** - Targeted libraries:

ActiTarg-G (GPCR Ligands)

ActiTarg-K (Kinase Modulators)

ActiTarg-P (Protease Inhibitors)

ActiTarg-S (Serpins Inhibitors)

ActiTarg-I (Potassium Channel Modulators)

ActiTarg-N (Nuclear Receptor Ligands)

- **Template-Based** - Groups with common heterocyclic lattices:

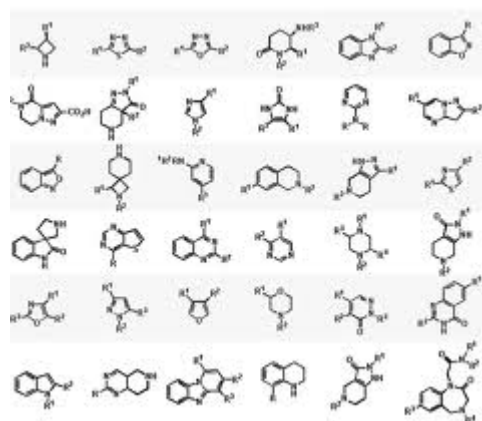
5-Membered Aromatic Heterocycles

5-Membered Fused Aromatic Heterocycles

6-Membered Aromatic Heterocycles

6-Membered Fused Aromatic Heterocycles

- **Privileged Structures**



Kinase	Lattice type
Contact us if you are interested in a chemical diversity selection of structures from the different kinase libraries assembled as 5, 10 and 20 plate sets	
Tyrosine / CDK	Various
CDK	Adenines
p38 MAP	4,5-Diarylimidazoles
Raf	Diarylureas
CDK	Flavones
CDK	Isoflavones
CDK	2-Aminothiazoles
Ser/Thr	NaphthBONH
CDK / PASS* >0.50	CDK isoxazolidinine subset CDK aminothiazole subset
Tyrosine / PASS >0.50	Various
p38MAP / PASS >0.50	Various



Department of Biology
Faculty of Medicine • Masaryk University

Jak ale testovat účinky tak velkého množství látek?



Testování účinků smogu (1956)



Jak ale testovat účinky tak velkého množství látek?

... když jen jedna látka – atropin – stála život nejen polovinu vojska Marka Antonia

... než jsme se ji naučili používat





Potřebujeme model...





Potřebujeme model...



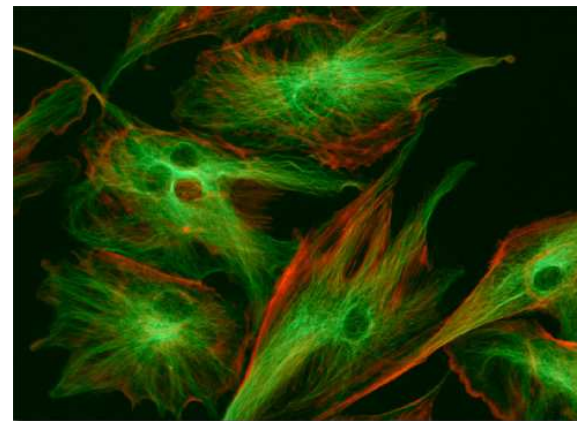
Nevýhody zvířecích modelů:

- Mnohdy chybí relevance k lidským chorobám
- Není možné testovat rozsáhlé knihovny sloučenin

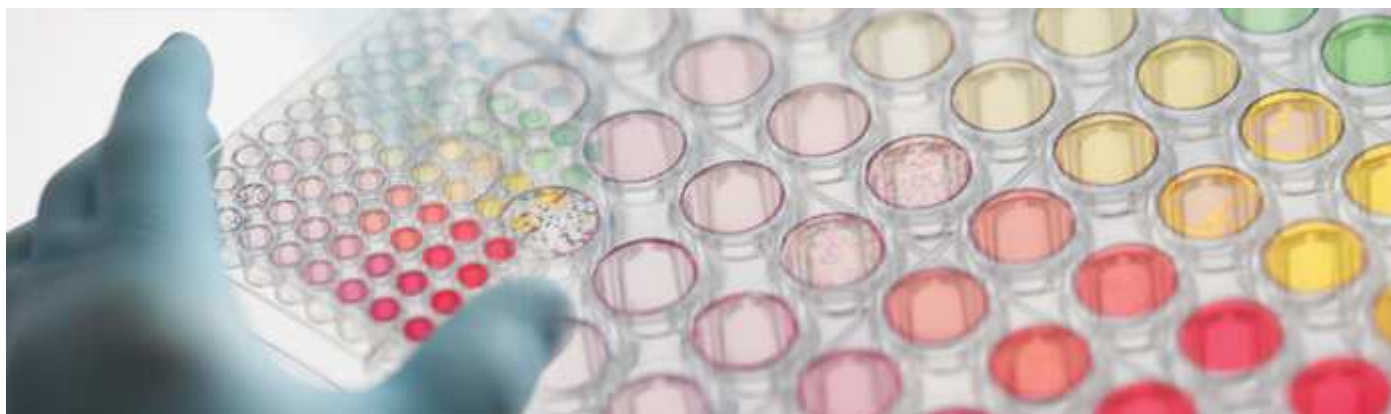


Department of Biology
Faculty of Medicine • Masaryk University

Potřebujeme model...

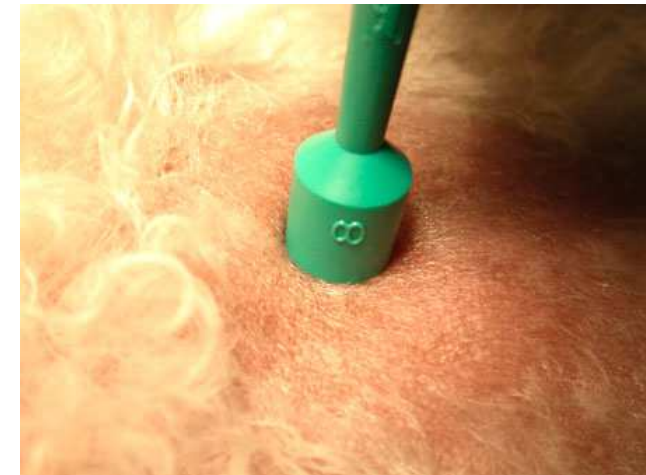


... buněčný model!





... buněčné modely:

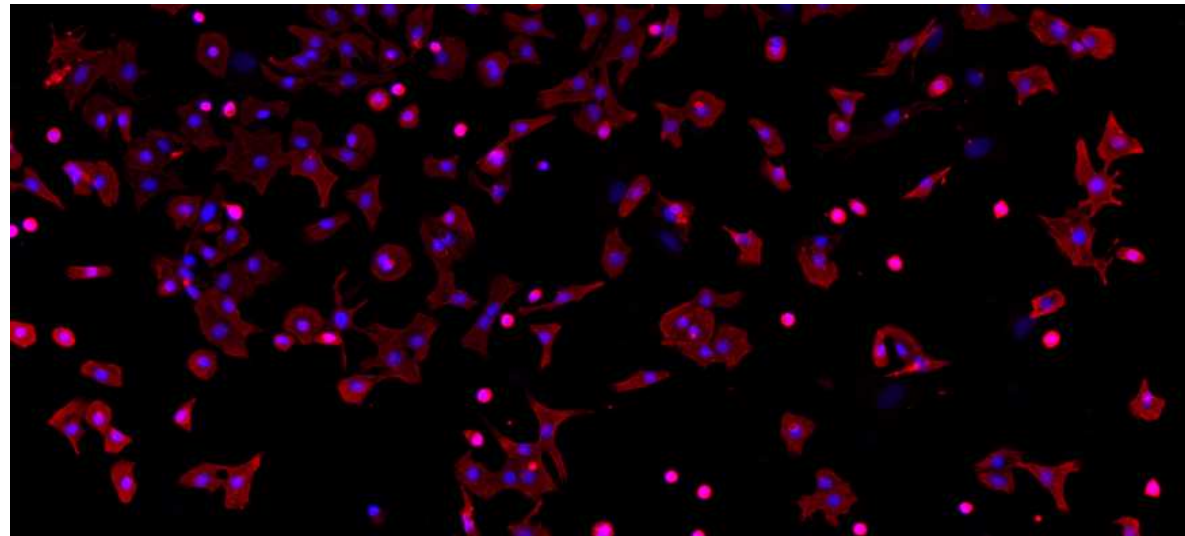


- Nedostatečné množství z biopsií
- Omezené množství buněčných typů lze kultivovat in vitro
- Délka kultivace je omezena



... buněčné modely:

- Rakovinné linie
- Kmenové buňky a odvozené buněčné typy..





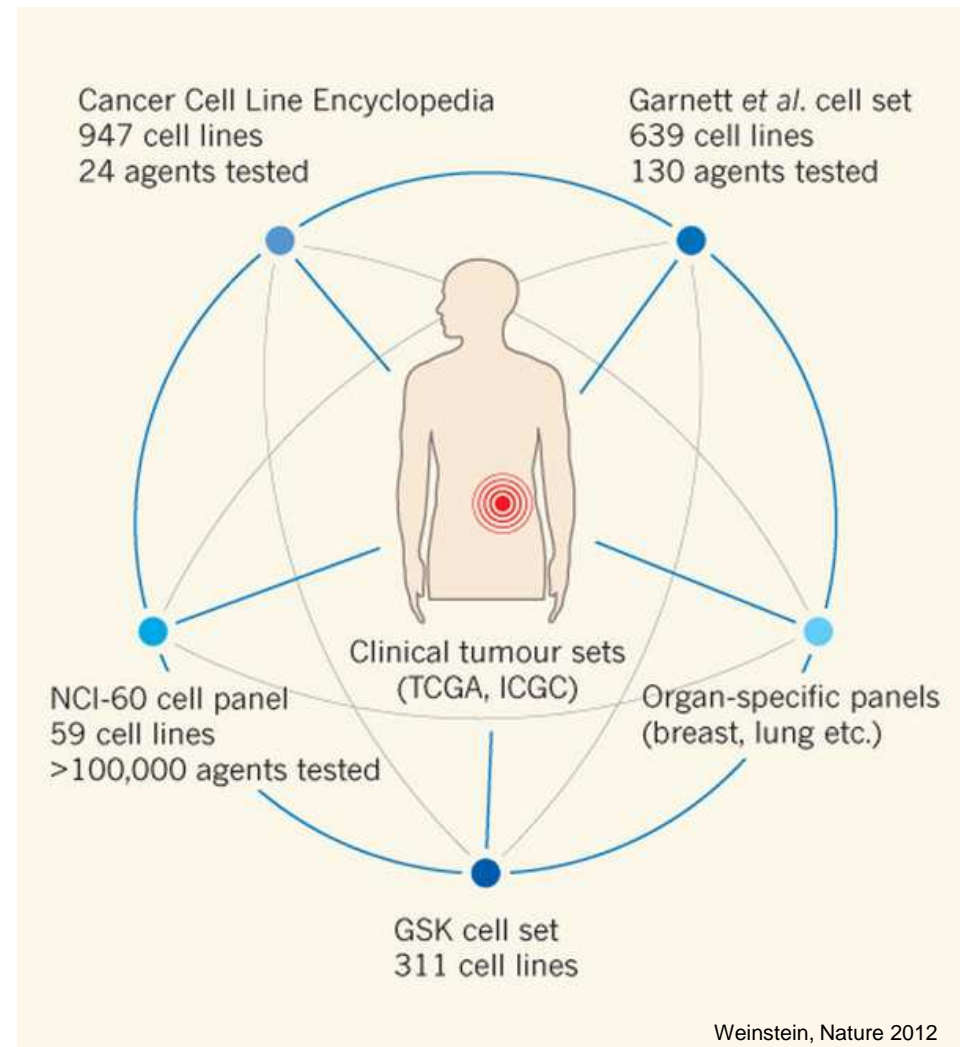
... buněčné modely: rakovinné linie

Výhody:

Onemocnění na buněčné úrovni
Immortalizované linie

Nevýhody:

Velká diverzita v mechanismu
onemocnění
Genomová nestabilita a s tím
spojená nestálost modelu





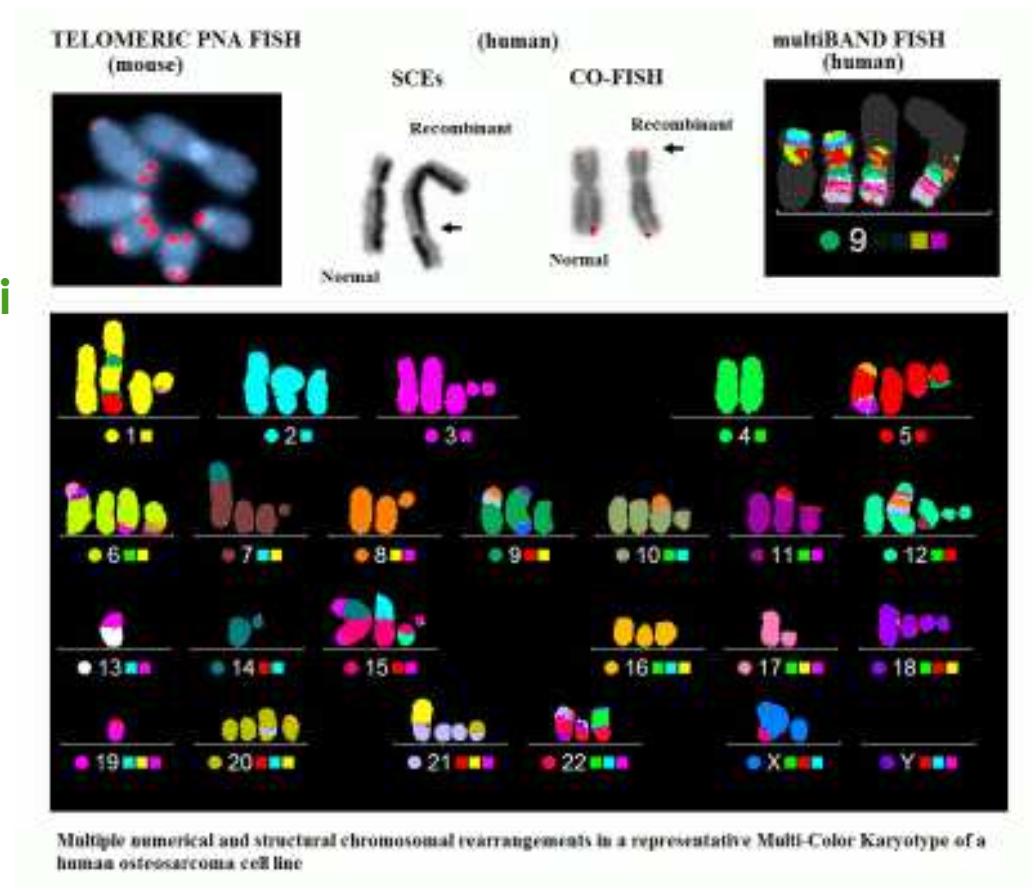
... buněčné modely: rakovinné linie

Výhody:

Onemocnění na buněčné úrovni
Immortalizované linie

Nevýhody:

Velká diverzita v mechanismu
onemocnění
Genomová nestabilita a s tím
spojená nestálost modelu





Projekt „Genomics of Drug Sensitivity in cancer“

Celkem vzorků doposud 1010 (z toho 1010 celých genomů)

Analyzovaných genů 23699

Identifikovaných mutací 1141626

Z toho jedinečných variant 1021175

www.cancerrxgene.org

Applikace | Zásopisu VETERÁN | ... | Dvojitý vysoce svítivý ...

Tato stránka je v jazyce angličtina | Chcete ji přeložit? Přeložit Ne | Jazyk angličtina nikdy nepřekládat

Možnosti ×


Genomics of Drug Sensitivity in Cancer


Home | **Compounds** | Genes | About | News | Downloads | Documentation

wellcome trust **sanger** institute | MASSACHUSETTS GENERAL HOSPITAL **CANCER CENTER**

The Genomics of Drug Sensitivity in Cancer project is an academic research program to identify molecular features of cancers that predict response to anti-cancer drugs.

Browse our data

 [Compounds](#)

 [Cancer Genes](#)

Search

Enter drug, gene or cell line

e.g. Docetaxel, RP-56976, BRAF, COLO-829

What's new!

Release 4 (March 2013)

This release features improvements increasing the functionality of the GDSC website to facilitate analysis and interpretation of results.



Projekt „Genomics of Drug Sensitivity in cancer“

Celkem vzorků doposud 1010 (z toho 1010 celých genomů)
Analyzovaných genů 23699
Identifikovaných mutací 1141626
Z toho jedinečných variant 1021175

Pokud známe mutaci, můžeme přiřadit mechanismus konkrétní účinné látky



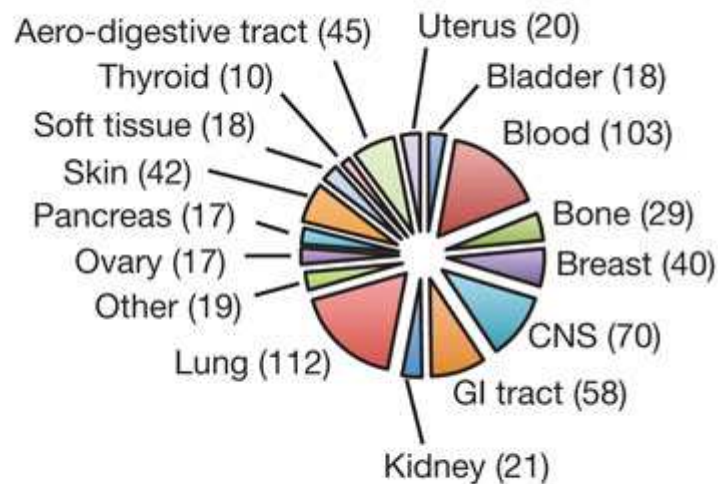
Projekt „Genomics of Drug Sensitivity in cancer“

Identifikace nových cílových molekul protinádorové terapie..

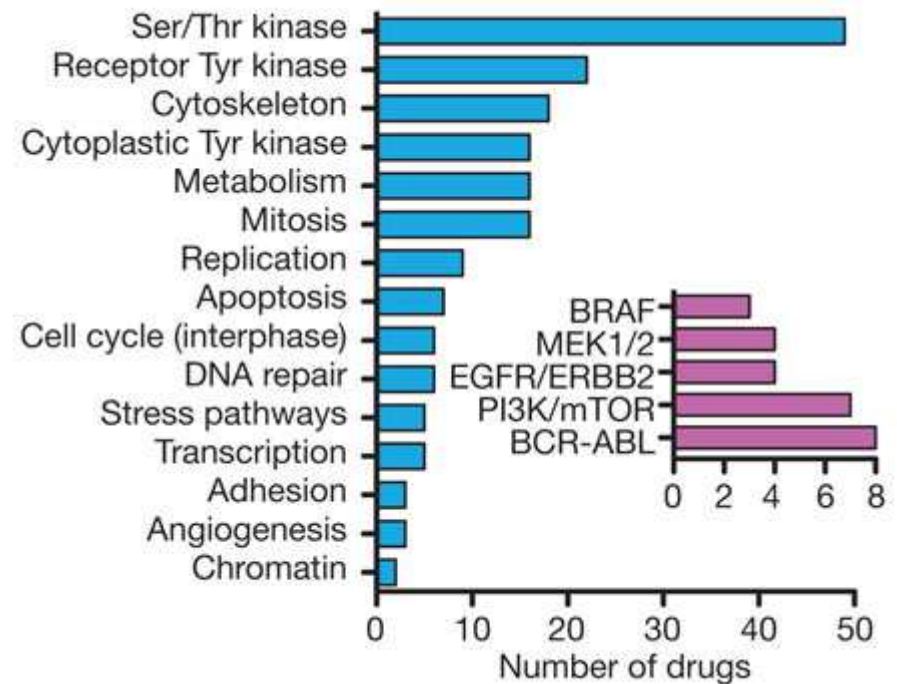
Několik set rakovinných linií

130 látek v klinickém a preklinickém testování

a



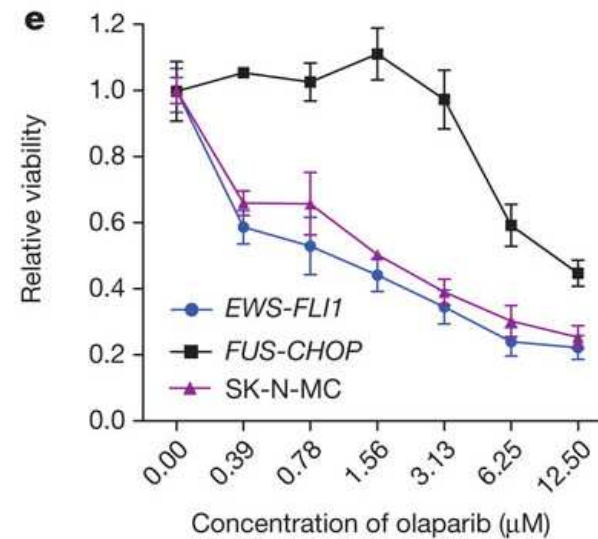
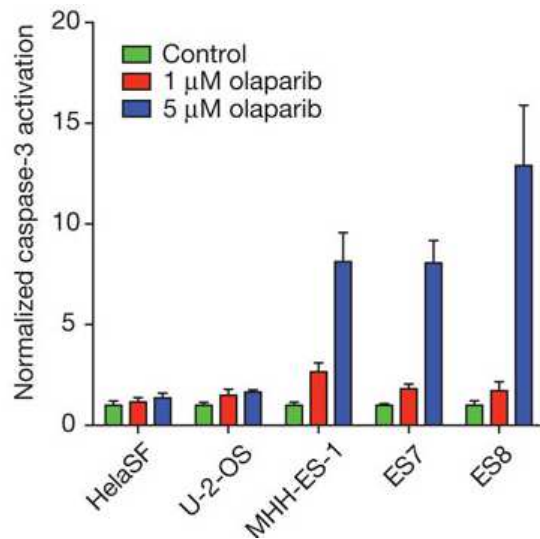
b





Projekt „Genomics of Drug Sensitivity in cancer“

Identifikace nových cílových molekul protinádorové terapie..



Identifikován biomarker typický pro Ewingův sarkom rezpozivní na inhibitory PARP



Modely chorob vyjma rakovin....

Indukované pluripotentní kmenové buňky

- + model přesně odpovídá pacientovi
- + přesně víme co se odehrává na úrovni organismu
- neustálený standard kontrol
- možný neznámý polygenní a epigenetický vliv

Embryonální kmenové buňky

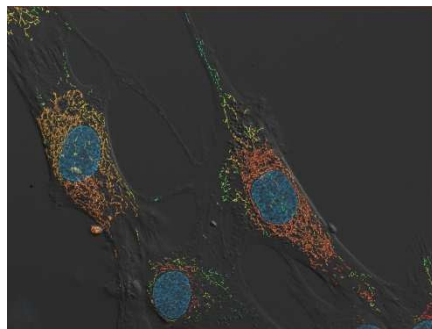
- + konzistentní genetické pozadí
- + “čistota“ genetické manipulace
- nutnost použití řízené manipulace genomu
- absence polygenních faktorů



Modely chorob vyjma rakovin....

Indukované pluripotentní kmenové buňky

- + model přesně odpovídá pacientovi
- + přesně víme co se odehrává na úrovni organismu
- neustálený standard kontrol
- možný neznámý polygenní a epigenetický vliv

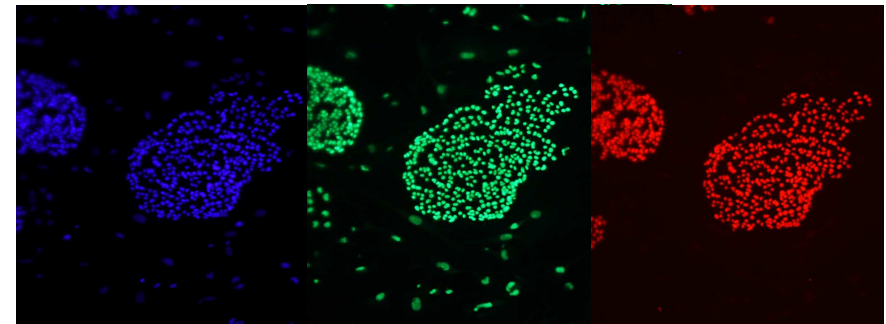


diferencovaná buňka

epigenetický reset
Yamanakovým „koktejlem“



Oct4
Sox2
Klf4
C-Myc



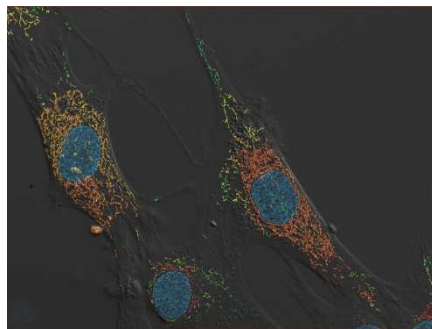
Pluripotentní buňka



Modely chorob vyjma rakovin....

Indukované pluripotentní kmenové buňky

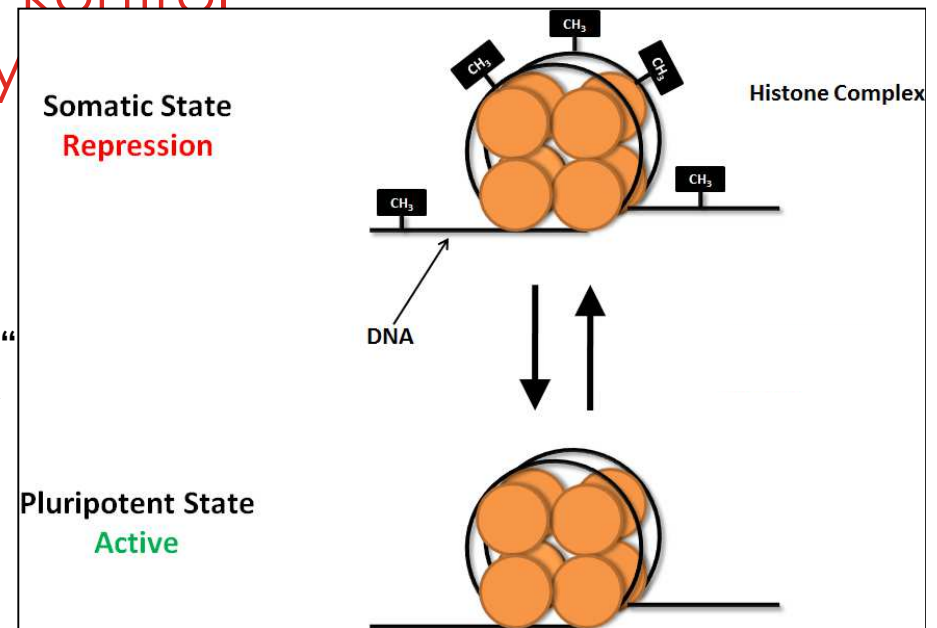
- + model přesně odpovídá pacientovi
- + přesně víme co se odehrává na úrovni organismu
- neustálený standard kontrol
- možný neznámý poly



diferencovaná buňka

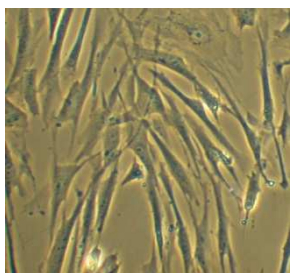
epigenetický reset
Yamanakovým „koktejlem“

Oct4
Sox2
Klf4
C-Myc

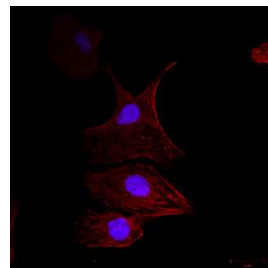




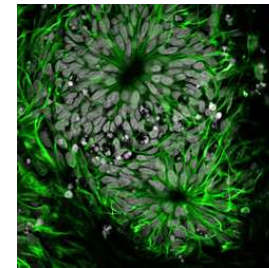
Modely chorob: Indukované pluripotentní kmenové buňky



fibroblasts

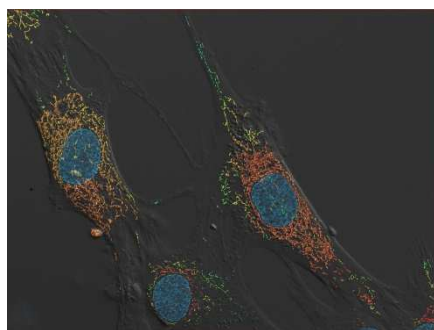


cardiomyocytes



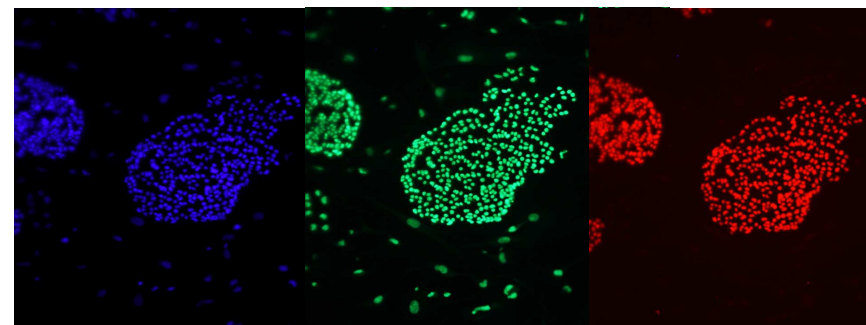
neurons

Diferenciace in vitro



diferencovaná buňka

epigenetický reset
Yamanakovým „koktejlem“



Pluripotentní buňka

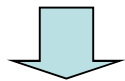


Nature. 2011 May 12; 473(7346): 221–225. doi:10.1038/nature09915.

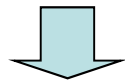
Modeling schizophrenia using hiPSC neurons

Kristen Brennand¹, Anthony Simone^{1,*}, Jessica Jou^{1,*}, Chelsea Gelboin-Burkhart^{1,*}, Ngoc Tran^{1,*}, Sarah Sangar¹, Yan Li¹, Yangling Mu¹, Gong Chen², Diana Yu¹, Shane McCarthy³, Jonathan Sebat⁴, and Fred H. Gage¹

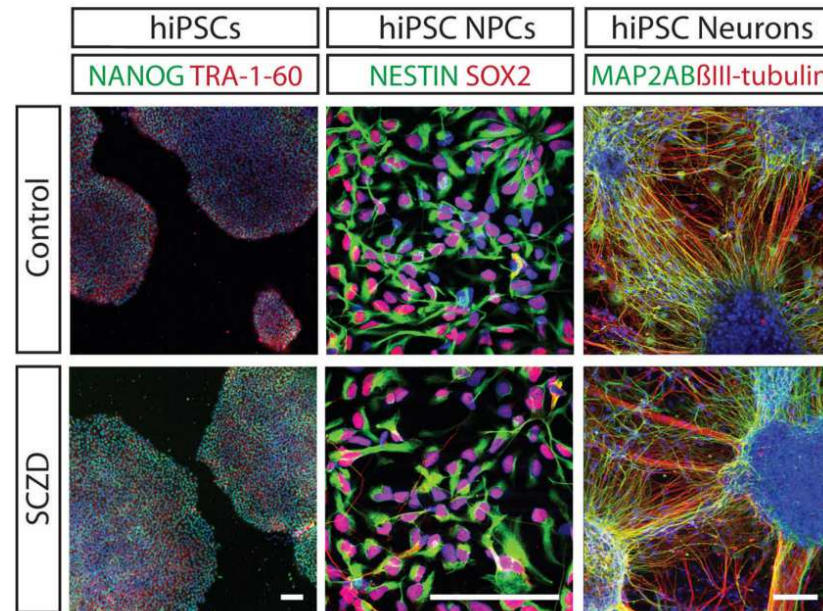
¹Salk Institute for Biological Studies, Laboratory of Genetics, 10010 North Torrey Pines Road, La Jolla CA 92037



hiPSC

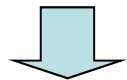


neurony

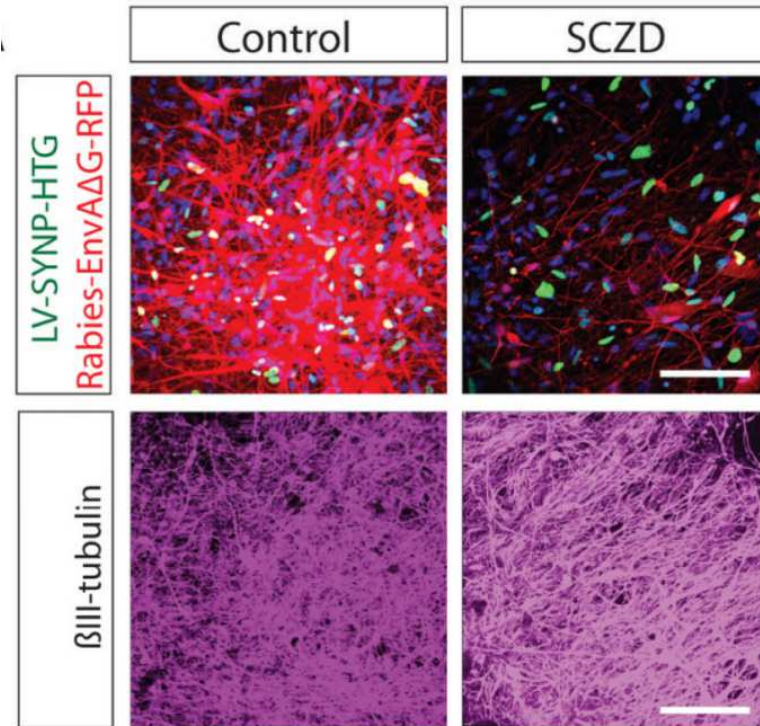




hiPSC



neurony



Brennand et al. Nature 2011

SCZD neurony replikují chování post mortem neuronů

Nové poznatky:

SCZD neurony mají sníženou konektivitu

Identifikovány nové dráhy s rozdílnou expresí: NOTCH, SLIT/ROBO EFNA
atd..



Duchenova muskulární dystrofie

- Postižené kosterní svalstvo
- dilatovaná kardiomyopatie

- Předpoklad:

- Chybí dystrofin

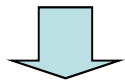
- Únik kalcia ze sarkoplazmatického retikula

- Pomohly by inhibitory vápníkových kanálů?

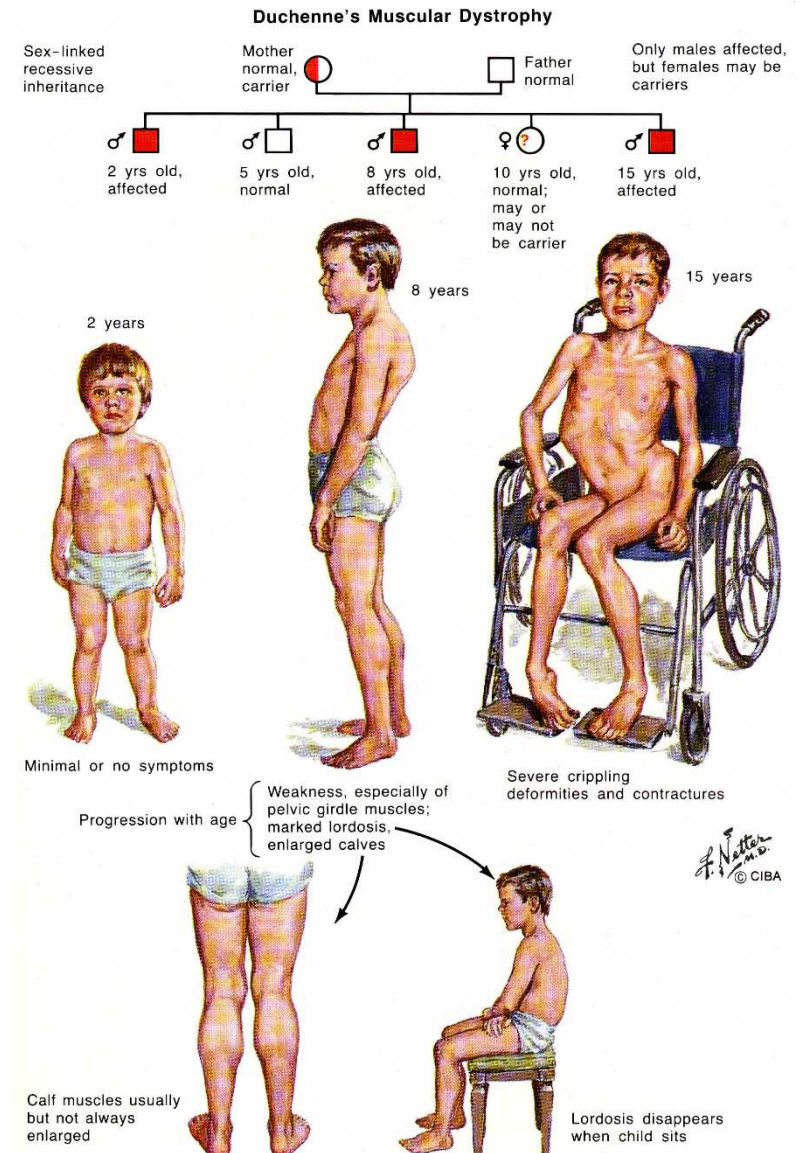
Chceme je testovat na srdečních buňkách!!!



hiPSC



Srdeční buňky

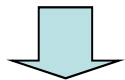




Duchenova muskulární dystrofie



hiPSC



neurony

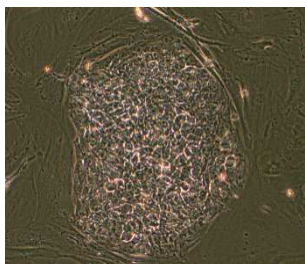
~~Biopsie buněk
cílového orgánu~~



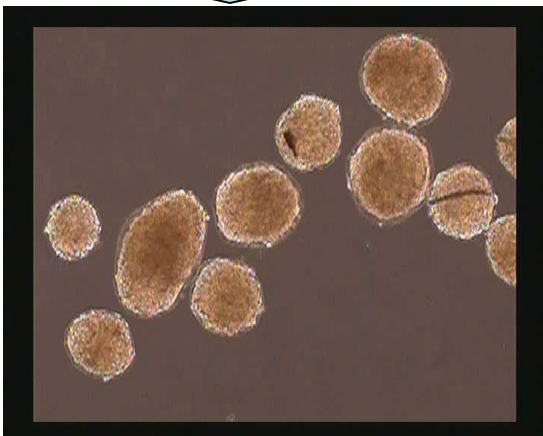
Toto si nemůžeme dovolit
vzhledem ke stavu
pacienta a typu tkáně



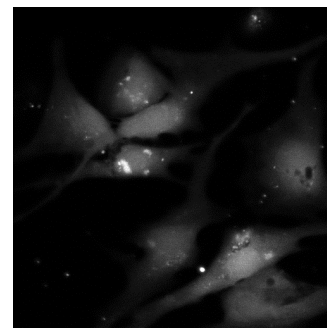
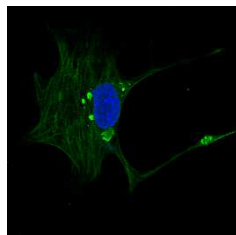
Biopsie kožních buněk



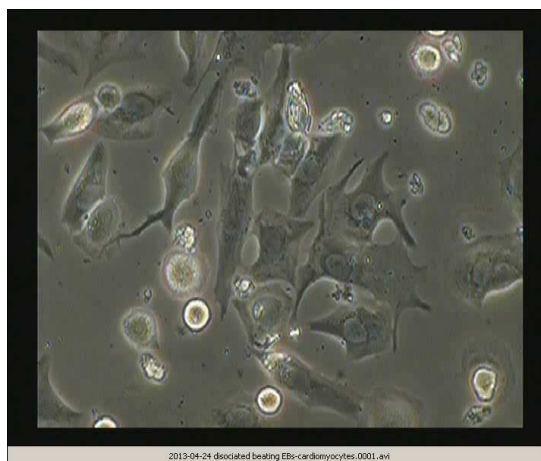
Indukované pluripotentní buňky



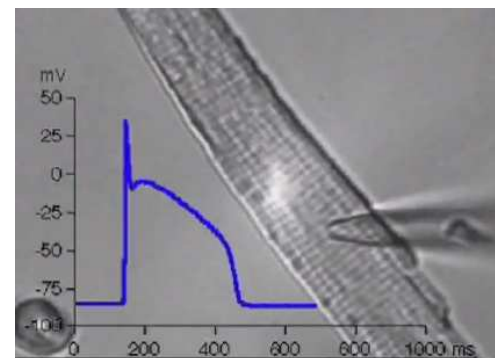
Embryonální tělíska



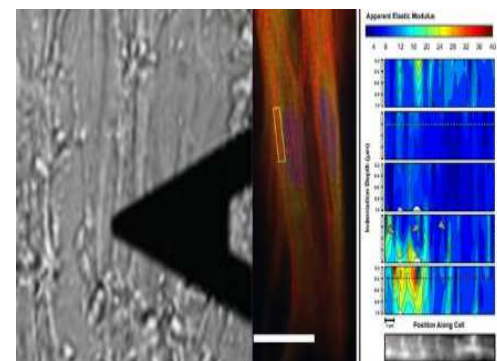
Fluorescenční mikroskopie



Izolované srdeční buňky
Identické s pacientem

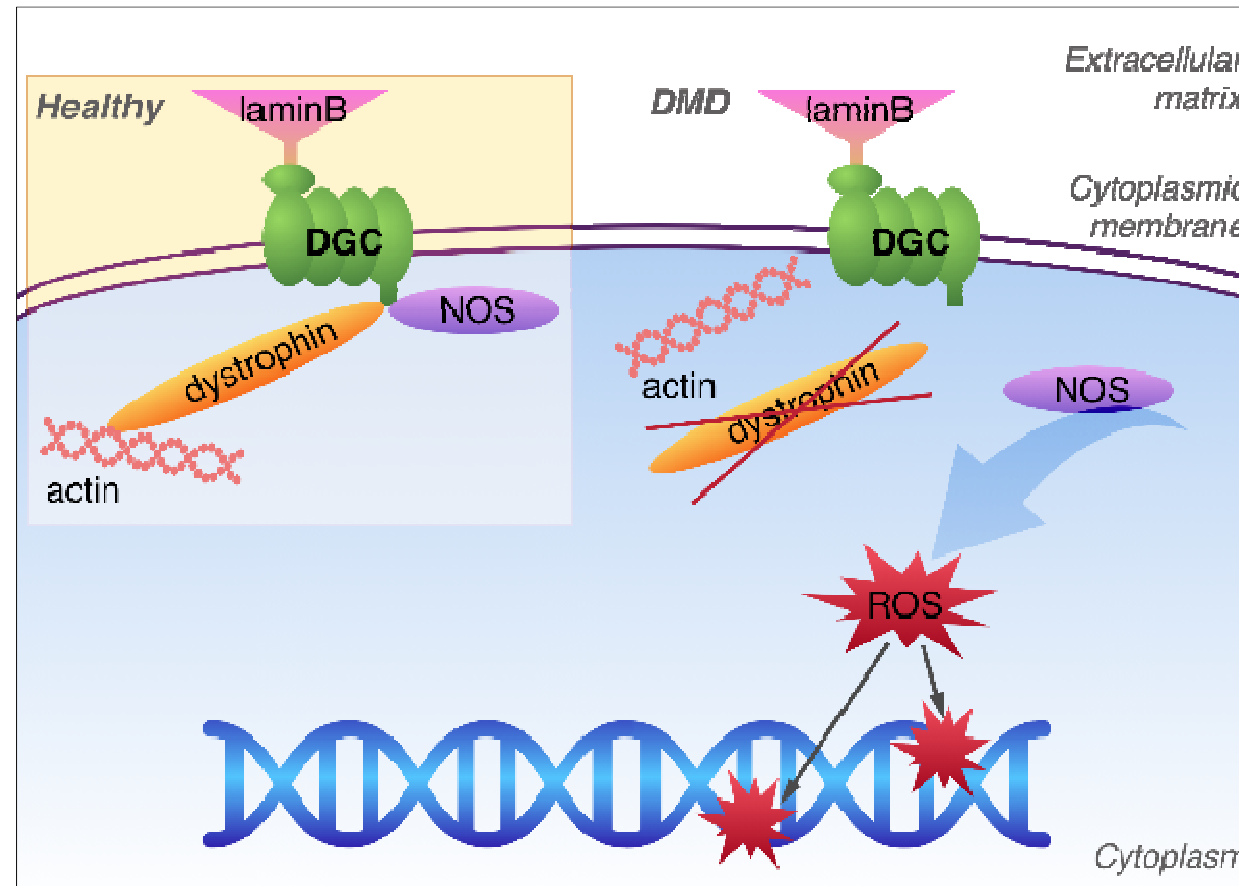


Patch clamp





DMD: disease of stem cells



Cardiac progenitor depletion due to excessive DNA damage...

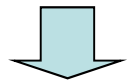


Katecholinergní Polymorfní Komorová Tachykardie (CPVT)

- způsobuje náhlou srdeční smrt



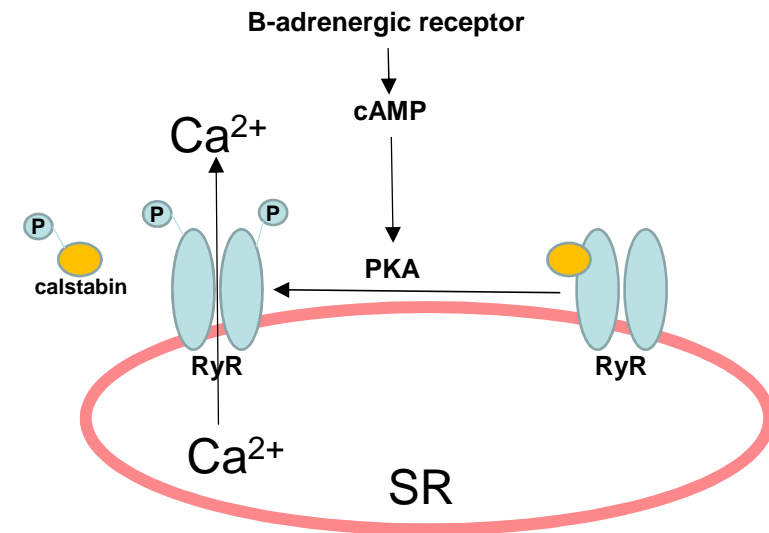
hiPSC



Srdeční buňky

- Předpoklad:
- nestabilní vazba RyR a calstabinu
- Únik kalcia ze sarkoplazmatického retikula
- Pomohly stabilizátory RyR?

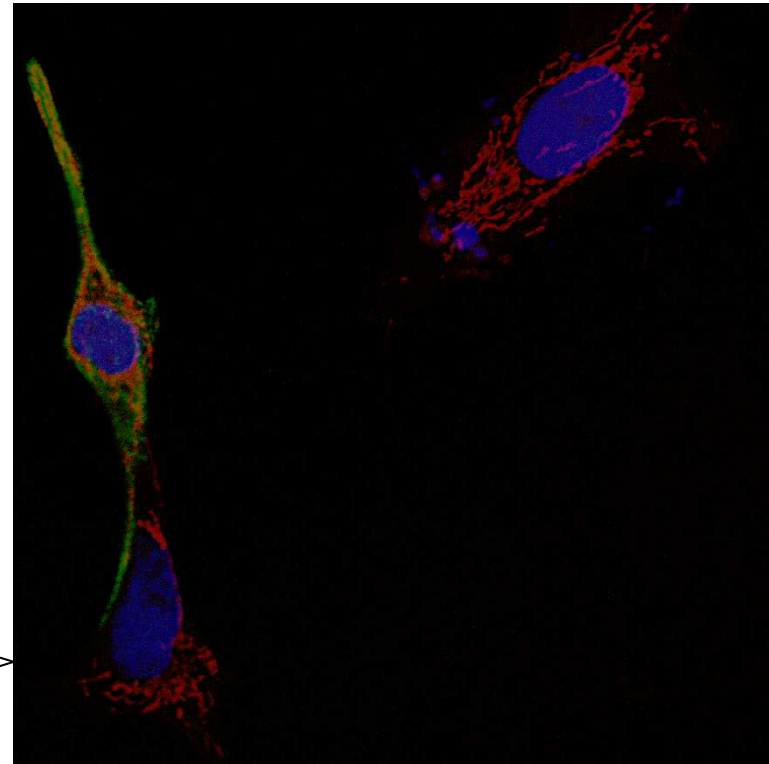
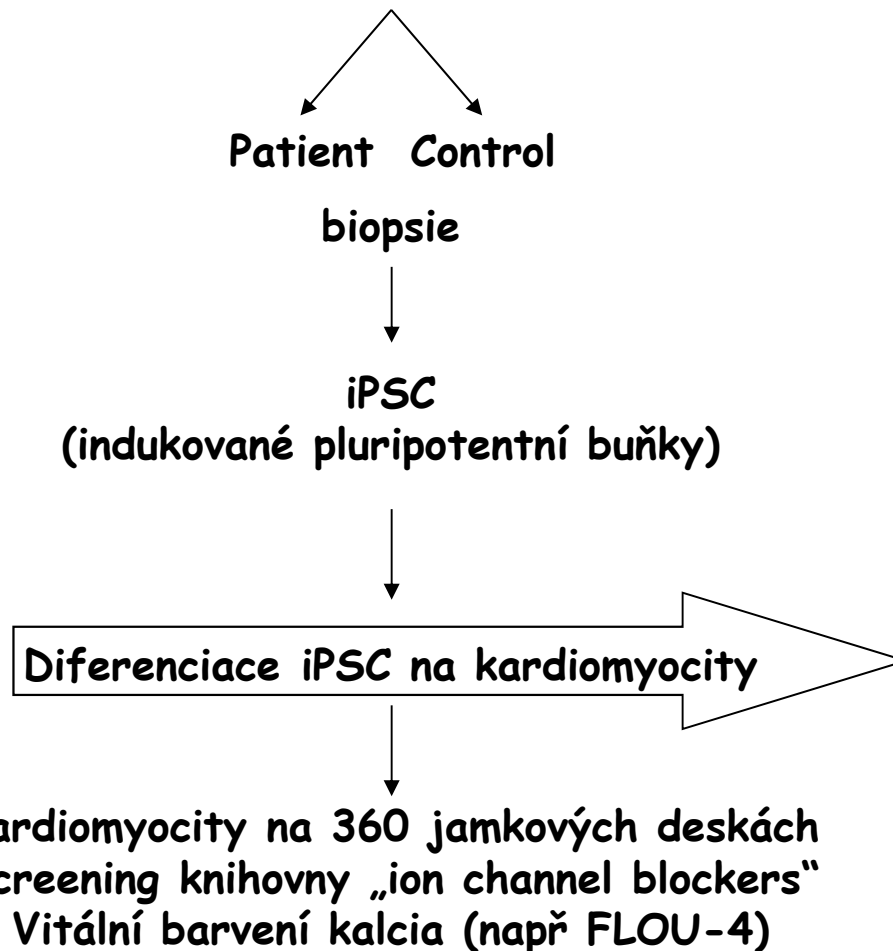
Chceme je testovat na srdečních buňkách!!!





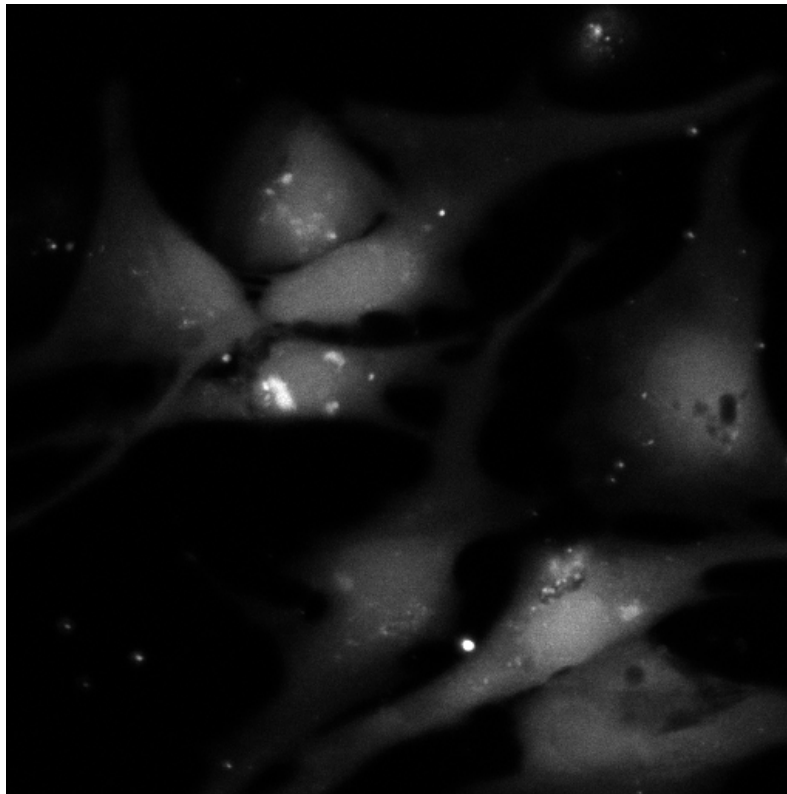
MODEL: Syndrom náhlé srdeční smrti

Náhlá srdeční zástava při zátěži
Ryanodinový receptor propouští Ca^{2+} i když zrovna nemá

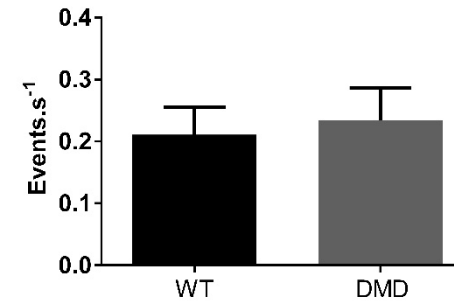




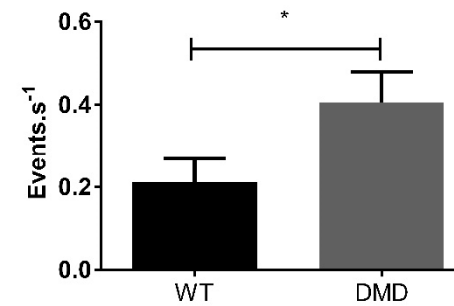
Vizualizace uvolňování kalcia..



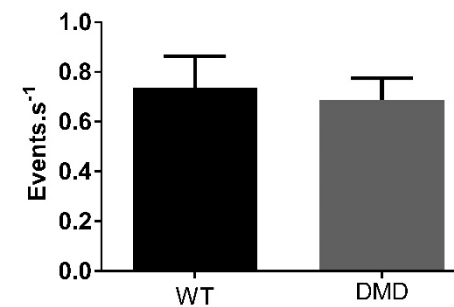
Frequency of big Ca^{2+} events in 2-months-old CMs at 0Hz



Frequency of medium Ca^{2+} events in 2-months-old CMs at 0Hz



Frequency of small Ca^{2+} events in 2-months-old CMs at 0Hz





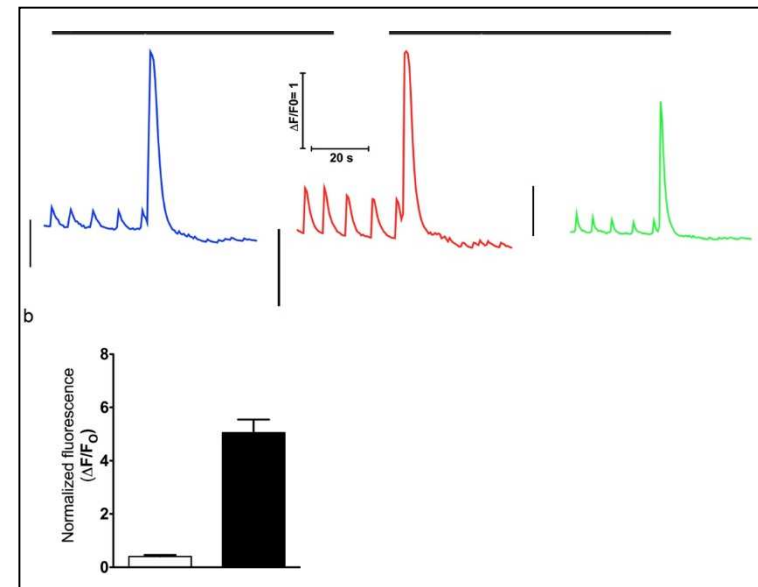
MODEL: Syndrom náhlé srdeční smrti

Náhlá srdeční zástava při zátěži
Ryanodinový receptor propouští Ca^{2+} i když zrovna nemá

Pro hledání účinných látek je krom modelu třeba i robustní screeningová metoda



Kardiomyocity na 360 jamkových deskách
Screening knihovny „ion channel blockers“
Vitální barvení kalcia (např FLOU-4)



Použití organoidů k modelování chorob

nature International weekly journal of science

Home | News & Comment | Research | Careers & Jobs | Current Issue | Archive | Audio & Video | F

Archive > Volume 516 > Issue 7531 > Letters > Article

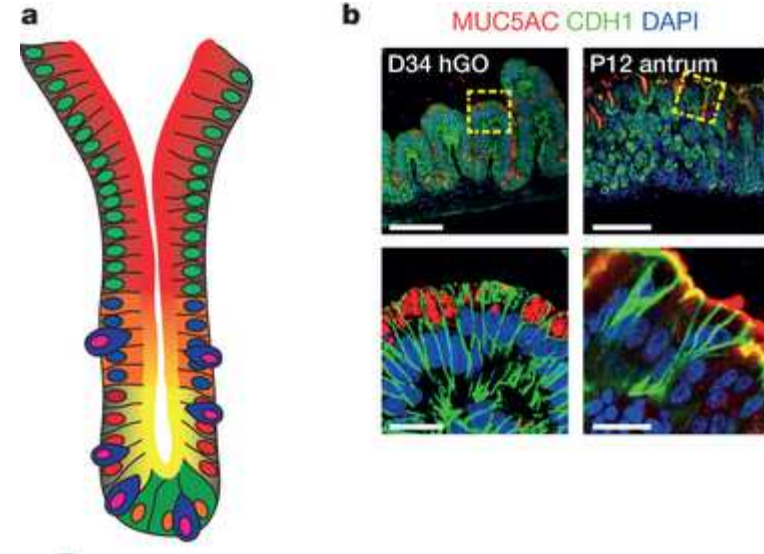
ARTICLE PREVIEW
[view full access options](#)

NATURE | LETTER

日本語要約

Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids

Kyle W. McCracken, Emily M. Catá, Calyn M. Crawford, Katie L. Sinagoga, Michael Schumacher, Briana E. Rockich, Yu-Hwai Tsai, Christopher N. Mayhew, Jason R. Spence, Yana Zavros & James M. Wells



Helicobacter pylori

Asociace s C-MET receptorem

Epiteliační proliferace



Modely chorob vyjma rakovin....

Indukované pluripotentní kmenové buňky

- + model přesně odpovídá pacientovi
- + přesně víme co se odehrává na úrovni organismu
- neustálený standard kontrol
- možný neznámý polygenní a epigenetický vliv

Možnosti: porovnání více iPSC z pacientů nesoucích stejnou mutaci se stejně širokou skupinou kontrolní

,nebo.....



Modely chorob vyjma rakovin....

Indukované pluripotentní kmenové buňky

- + model přesně odpovídá pacientovi
- + přesně víme co se odehrává na úrovni organismu
- neustálený standard kontrol
- možný neznámý polygenní a epigenetický vliv

Cílená inverze mutace u iPSC z pacienta...

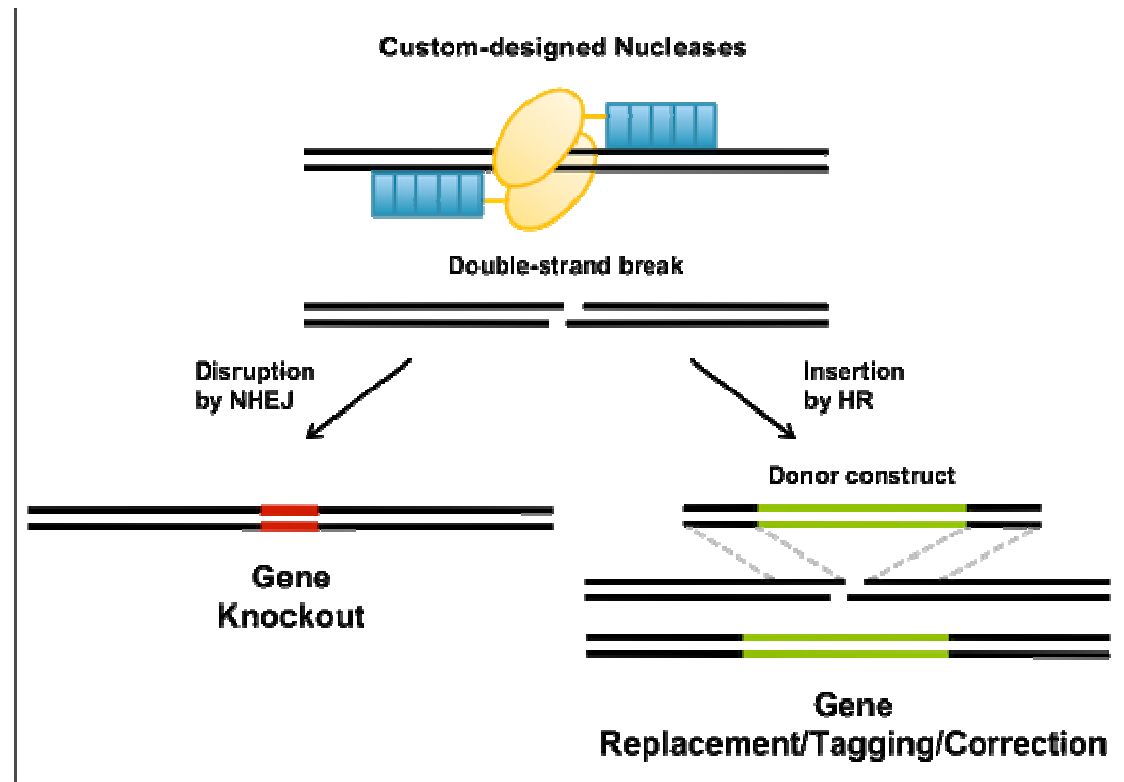


Modely chorob vyjma rakovin....

Nejčastěji využívané

Programovatelné místně
řízené nukleázy

- Zinc-Finger nukleázy)
- Taleny
- CRISPR/Cas



<http://www.ctm-basel.ch/>

Cílená inverze mutace u iPSC z pacienta...

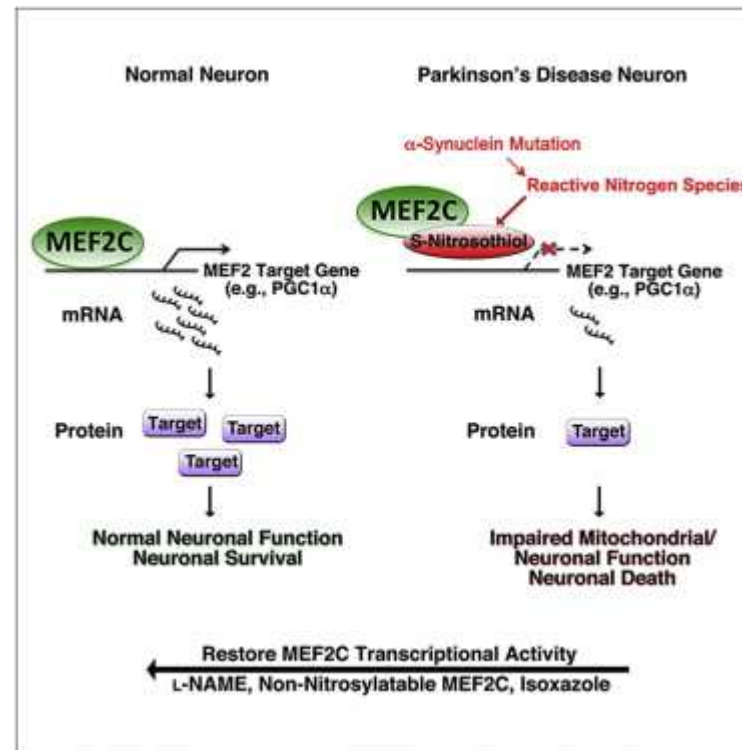


Modely chorob vyjma rakovin....

Nejčastěji využívané

Programovatelné místně
řízené nukleázy

- Zinc-Finger nukleázy)
- Taleny
- CRISPR/Cas



Ryan, SDY, CELL, 2013

Model Parkinsonovy choroby: technologií CRISPR/CAS opravená mutace synnucleinu v neuronech derivovaných z iPSC

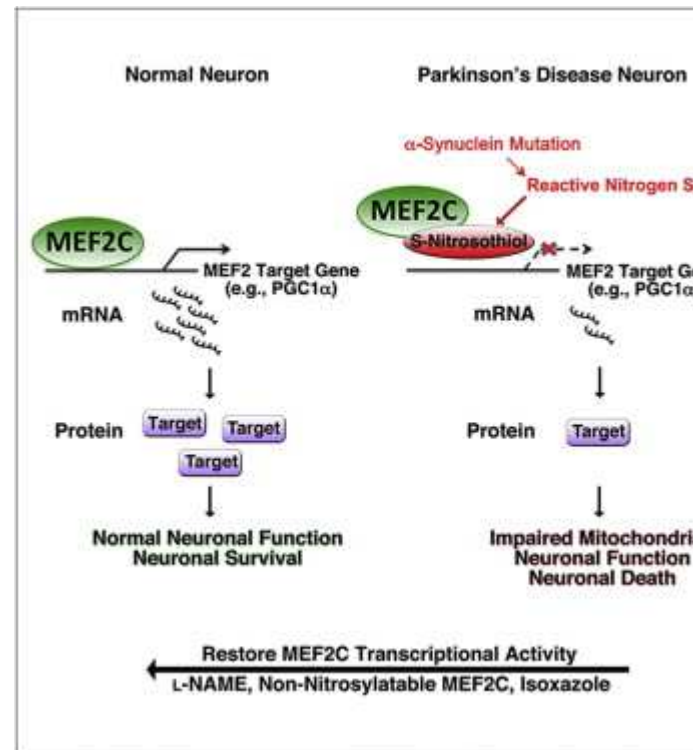


Modely chorob vyjma rakovin....

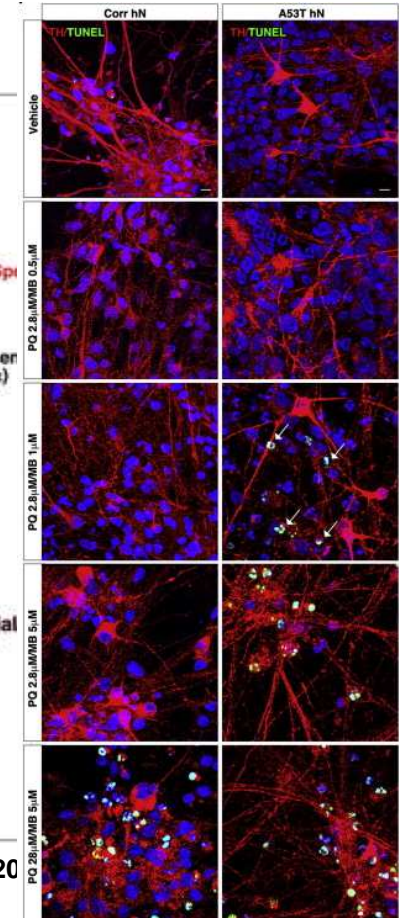
Nejčastěji využívané

Programovatelné místně
řízené nukleázy

- Zinc-Finger nukleázy)
- Taleny
- CRISPR/Cas

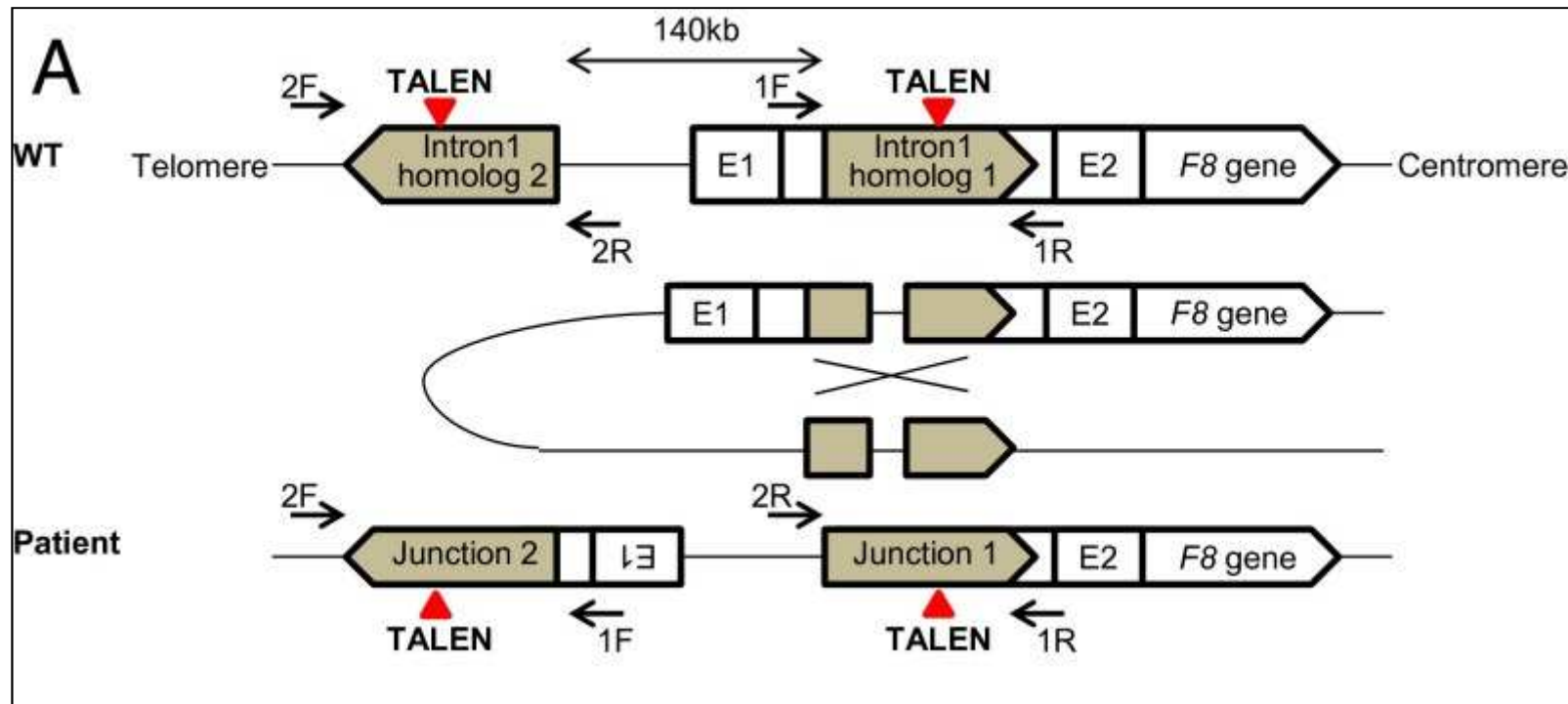


Ryan, SDY, CELL, 20



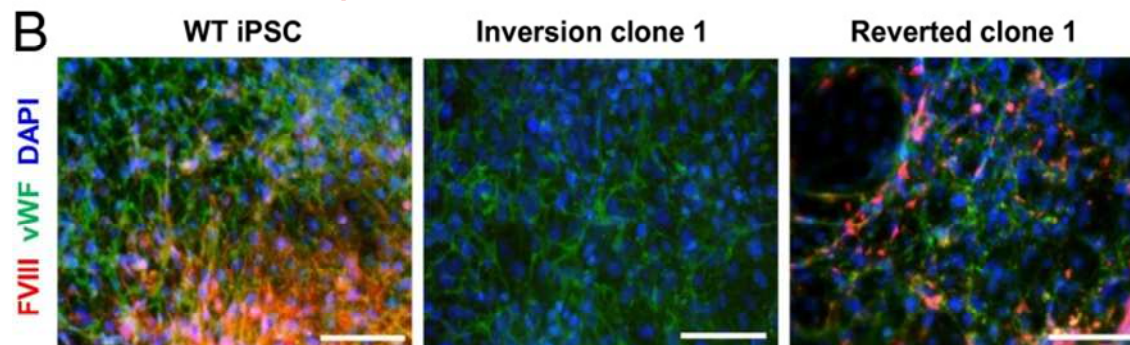
Model Parkinsonovy choroby: technologií CRISPR/CAS opravená mutace synnucleinu v neuronech derivovaných z iPSC

Hemofilie A – nejčastější příčina je inverze části genu koagulačního faktoru 8



Park, CY, PNAS, 2014

Bonus: Stejným párem TALENů lze opravit mutaci v iPSC z pacienta – otevírá cestu genové/buněčné terapii



Park, CY, PNAS, 2014



Modely chorob vyjma rakovin....

Indukované pluripotentní kmenové buňky

- + model přesně odpovídá pacientovi
- + přesně víme co se odehrává na úrovni organismu
- neustálený standard kontrol
- možný neznámý polygenní a epigenetický vliv

Embryonální kmenové buňky

- + konzistentní genetické pozadí
- + “čistota“ genetické manipulace
- nutnost použití řízené manipulace genomu
- absence polygenních faktorů

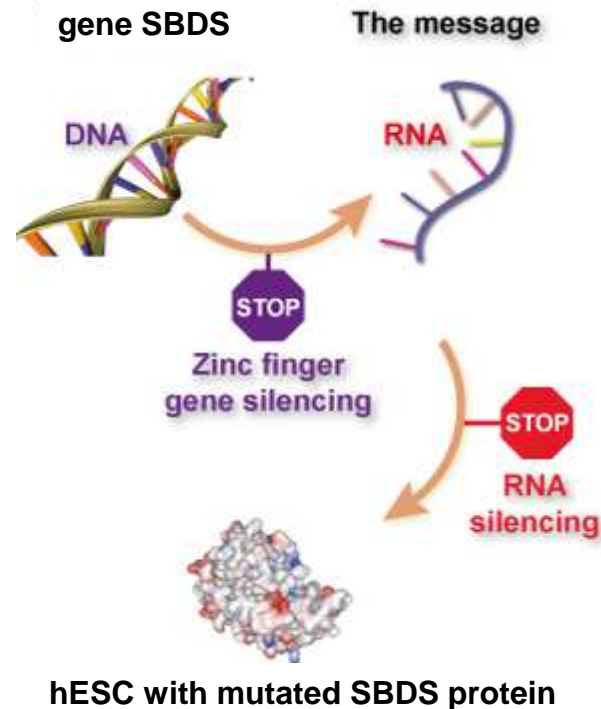


Shwachman-Bodian-Diamondův syndrom

Wiki: „The encoded protein may function in RNA metabolism.^[3] The precise function of the SBDS protein is not known but it appears to play an important role in [ribosome](#) function or assembly.“

Charakteristika choroby:

Exokrinní pankreatická dysfunkce
(výsledkem je podvýživa a zastavení růstu)
Hematologické abnormality (často vyústí do myeloidní leukemie)

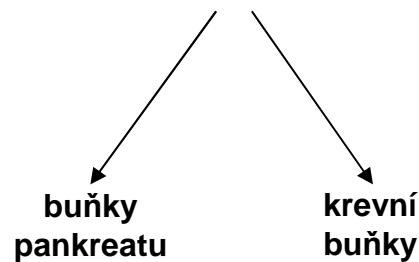


Shwachman-Bodian-Diamondův syndrom

Wiki: „The encoded protein may function in RNA metabolism.^[3] The precise function of the SBDS protein is not known but it appears to play an important role in [ribosome](#) function or assembly.“

Charakteristika choroby:

Exokrinní pankreatická dysfunkce
(výsledkem je podvýživa a zastavení růstu)
Hematologické abnormality (často vyústí do
myeloidní leukemie)



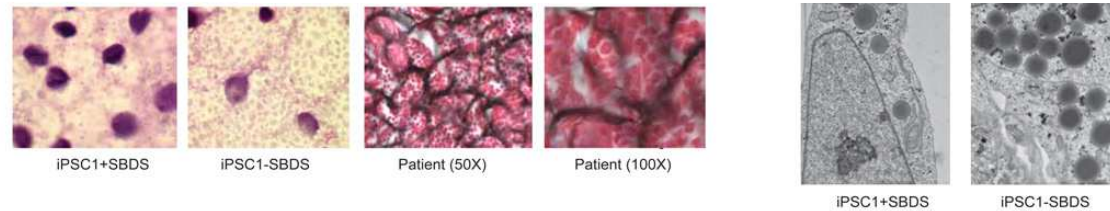


Pluripotent stem cell models of Shwachman-Diamond syndrome reveal a common mechanism for pancreatic and hematopoietic dysfunction

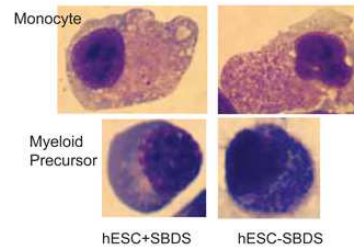
Asmin Tulpule, James M. Kelley, [...], and George Q. Daley

SBDS protein mutation
↓
Protease induction
↓
Increased cell death
in both
Blood and Pancreas

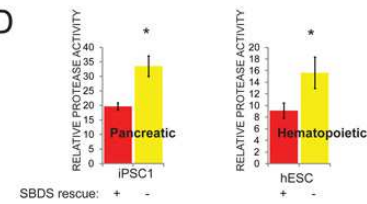
A



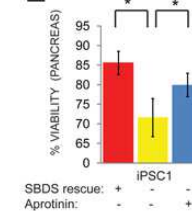
C



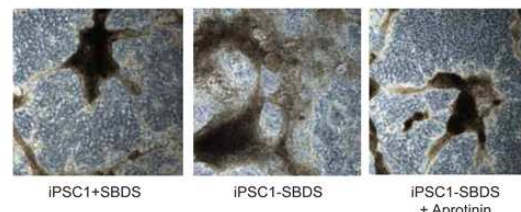
D



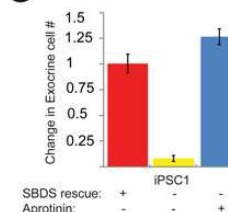
E



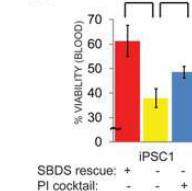
F



G



H





Department of Biology
Faculty of Medicine • Masaryk University



Děkuji za pozornost..

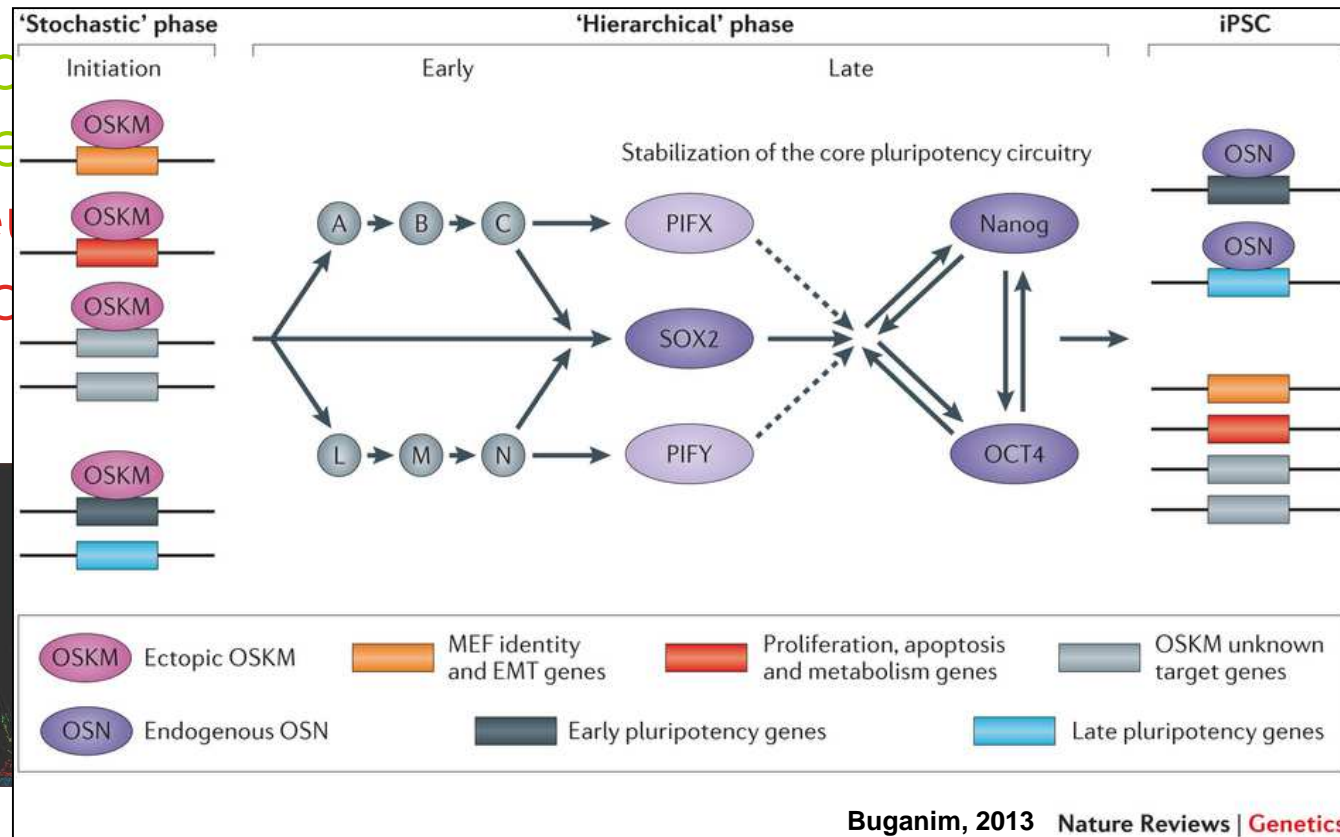
Vladimír Rotrekl
vrotrekl@med.muni.cz



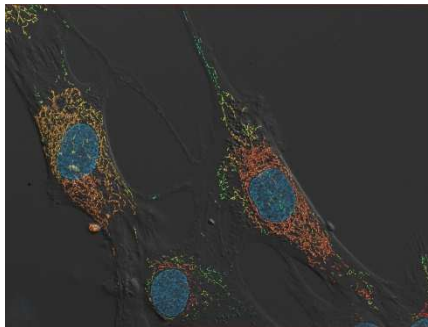
Modely chorob vyjma rakovin....

Indukované pluripotentní kmenové buňky

+ mo
+ pře
- ne
- mo



zmu



diferencovaná buňka

