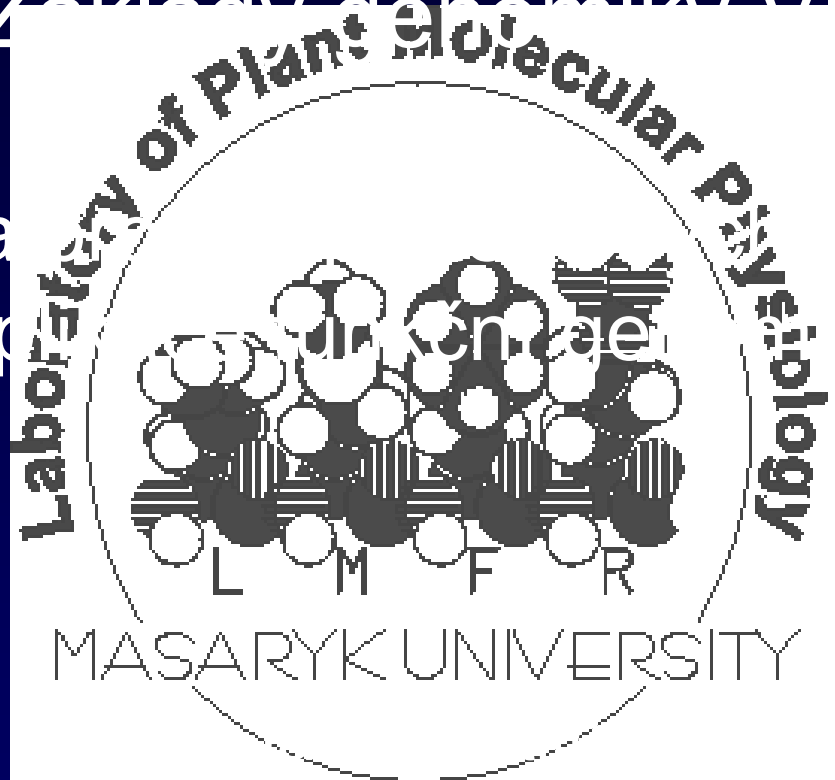
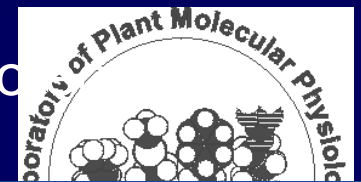


Základy genetiky, V1

Analýza funkční genetiky a interakcí
Apoptózy a senescence



Masarykova univerzita, Laboratoř funkční genomiky a pro
Laboratoř molekulární fyziologie rostlin

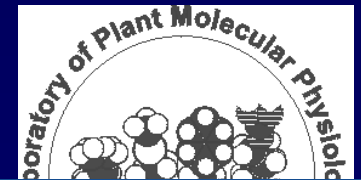


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Základy genomiky VI.

- Zdrojová literatura ke kapitole V:
 - Grefen et al., Molecular Plant, 1, 308-320
 - Van Leene et al., Trends in Plant Science, 2008
 - Walter et al., Plant Journal, 2004
 - Wilt and Hake, Principles of Developmental Biology
 - Goh et al., PNAS, 2007, 104, 8685-8690
 - Dietel and Sers, 2006, Virchows Arch, 448,744–755

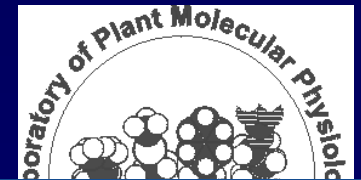


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika VI.

- Proč jsou proteinové interakce důležité
 - Funkční význam specifických interakcí proteinů
- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
 - koimunoprecipitace
 - tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)
 - kvasinkový dvouhybridní test (Y2H)
 - bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC)
 - analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)

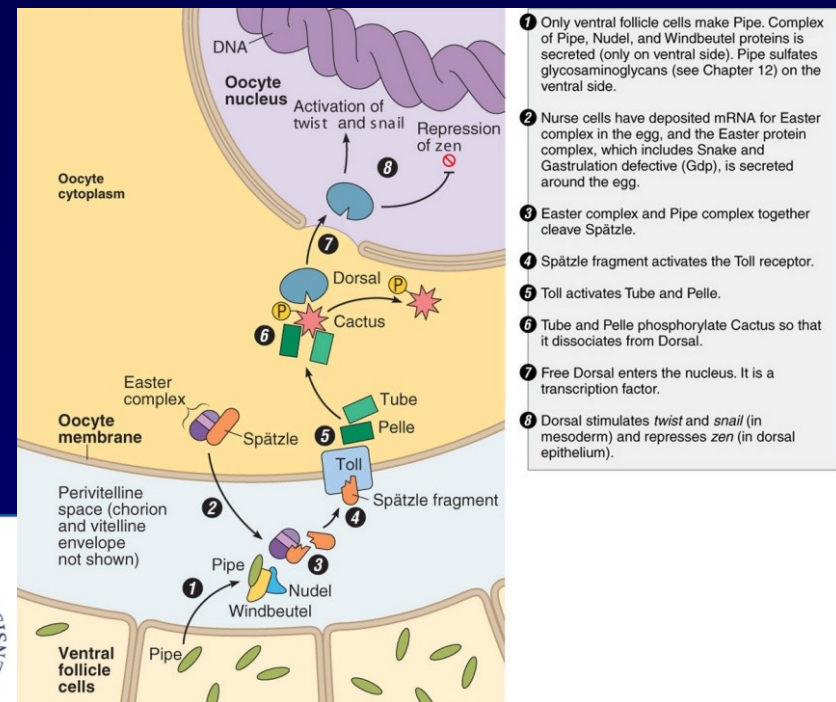
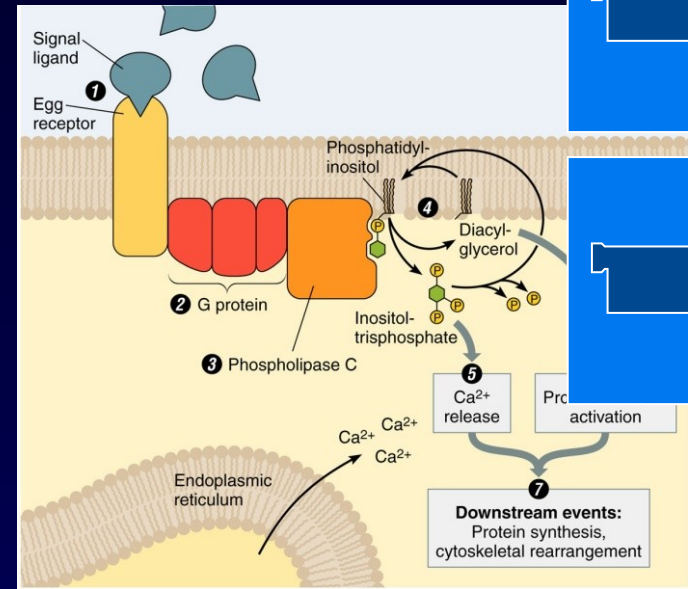


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

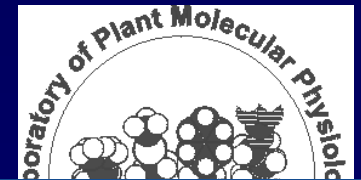
Genomika VI.

- Proč jsou proteinové interakce důležité
 - Funkční význam specifických interakcí proteinů
- Většina proteinů v buňce existuje ve formě komplexů, které mohou dále navzájem interagovat
- přenos signálu prostřednictvím G proteinu a fosfolipasy C
- signální kaskády využívající cAMP
- sestřih hnRNA
 - interakce 5 snRNA a více než 50 proteinů
- regulace buněčného cyklu
- vývojově specifické procesy
 - např. regulace buněčné diferenciace během embryonálního vývoje u *Drosophily*



Genomika VI.

- Proč jsou proteinové interakce důležité
 - Funkční význam specifických interakcí proteinů
- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
 - koimunoprecipitace
 - tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)
 - kvasinkový dvouhybridní test (Y2H)
 - bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC)
 - analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

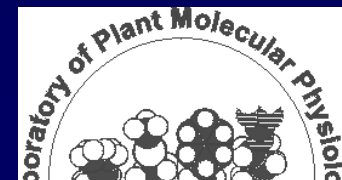
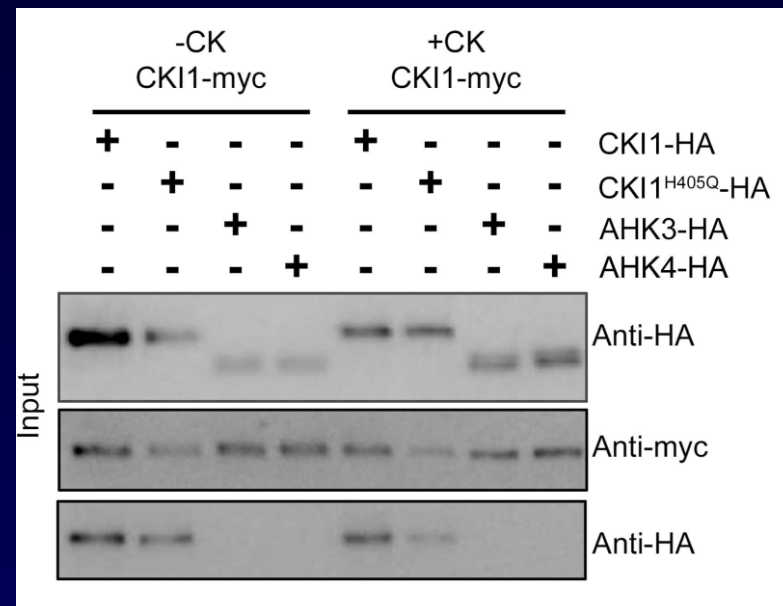
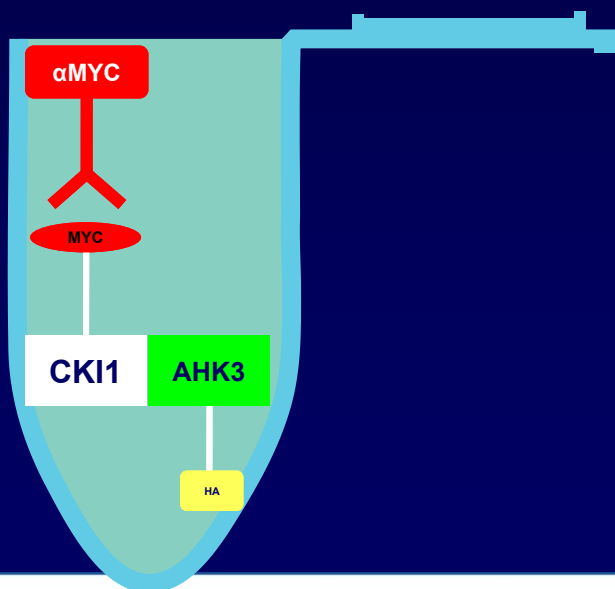
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika VI.

Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*

koimunoprecipitace

- založena na izolaci proteinových komplexů pomocí protilátek rozpoznávajících jeden z interagujících proteinů
- princip koimunoprecipitace využívá metoda pro potvrzení interakcí u proteinů, kde již tuto interakci předpokládáme pomocí tzv. pull-down assay

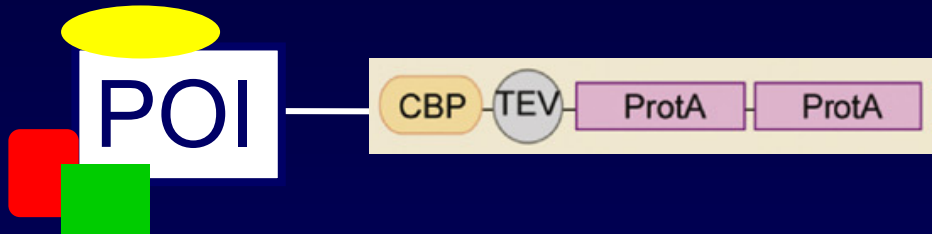


Genomika VI.

Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*

tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)

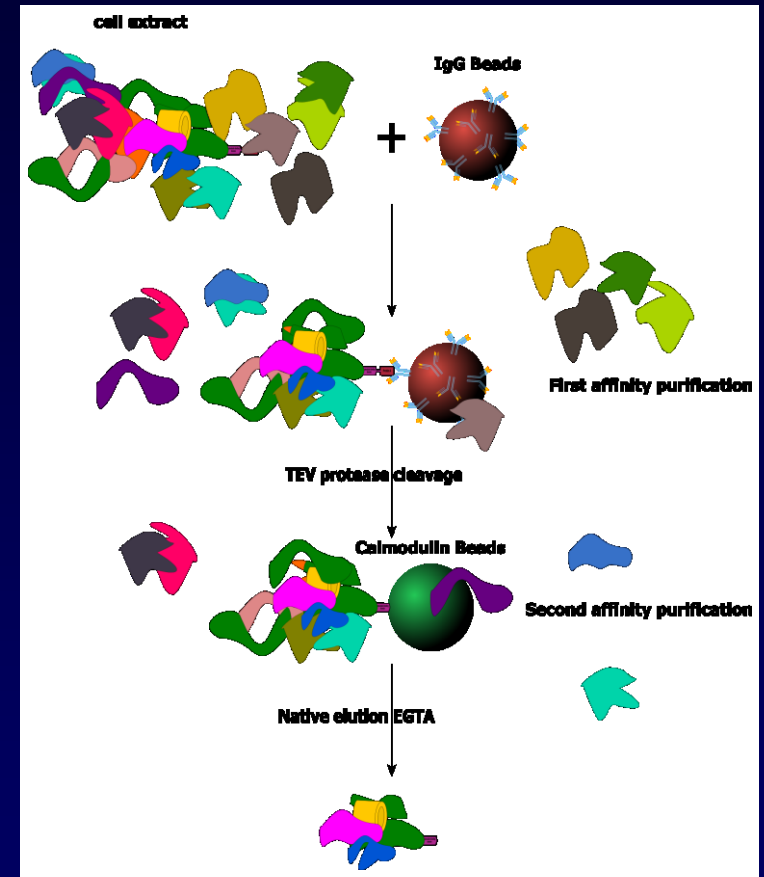
- izolace proteinových komplexů pomocí rekombinantních proteinů, fúzovaných s dvěma různými vazebnými doménami



- calmodulin-binding protein (CBP)
- IgG vazací domény proteinu A (ProtA)
- místo rozpoznávané specifickou proteázou z TEV viru (tobacco etch virus)

- proteiny izolovaných komplexů jsou po rozdělení na 1D ELFO identifikovány pomocí MS

- výhodou je použití dvou nezávislých proteinových domén pro afinitní purifikaci a tedy velká specificita

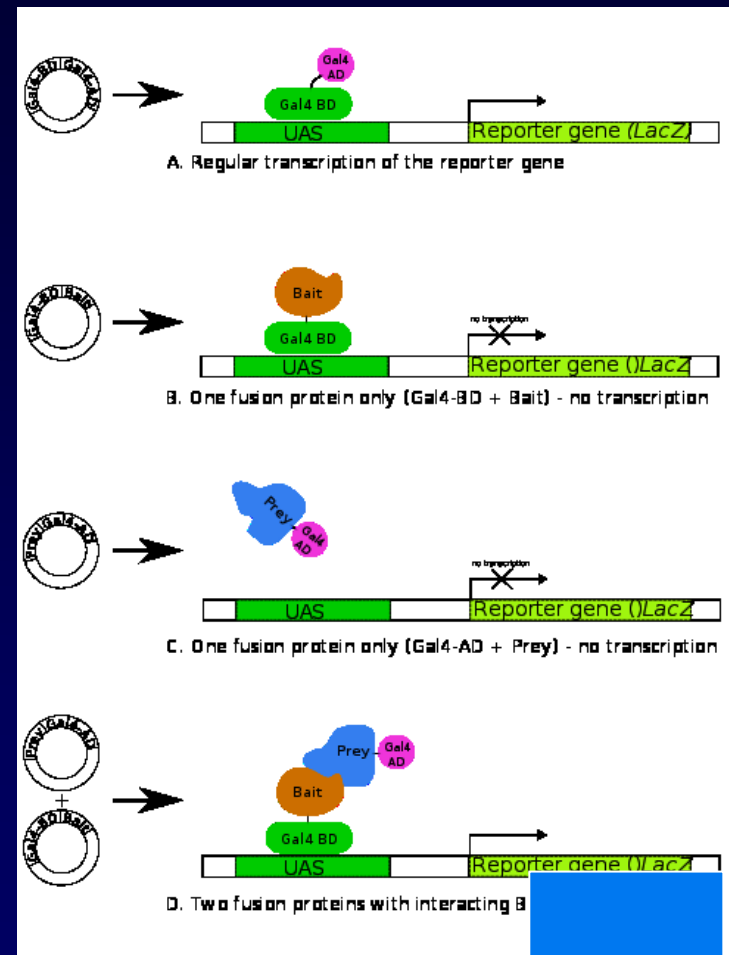


Genomika VI.

Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*

dvouhybridní kvasinkový test (Y2H)

- izolace proteinových komplexů pomocí rekombinantních proteinů, každý z nich fúzovaný s částí transkripčního faktoru Gal4
- jeden z proteinů (návnada, bait) fúzovaný s DNA vazebnou doménou Gal4 (Gal4-BD)
- druhý z proteinů (kořist, prey) fúzovaný s aktivační doménou Gal4 (Gal4-AD)
- Interakce proteinů umožní rekonstituci vazebné domény s aktivační doménou a spuštění reportérového genu
 - vizuální detekce (modré zbarvení, LacZ)
 - auxotrofní selekce (růst na médiu bez histidinu, His)
- umožňuje vyhledávání interakčních partnerů v expresních knihovnách jednotlivých organismů

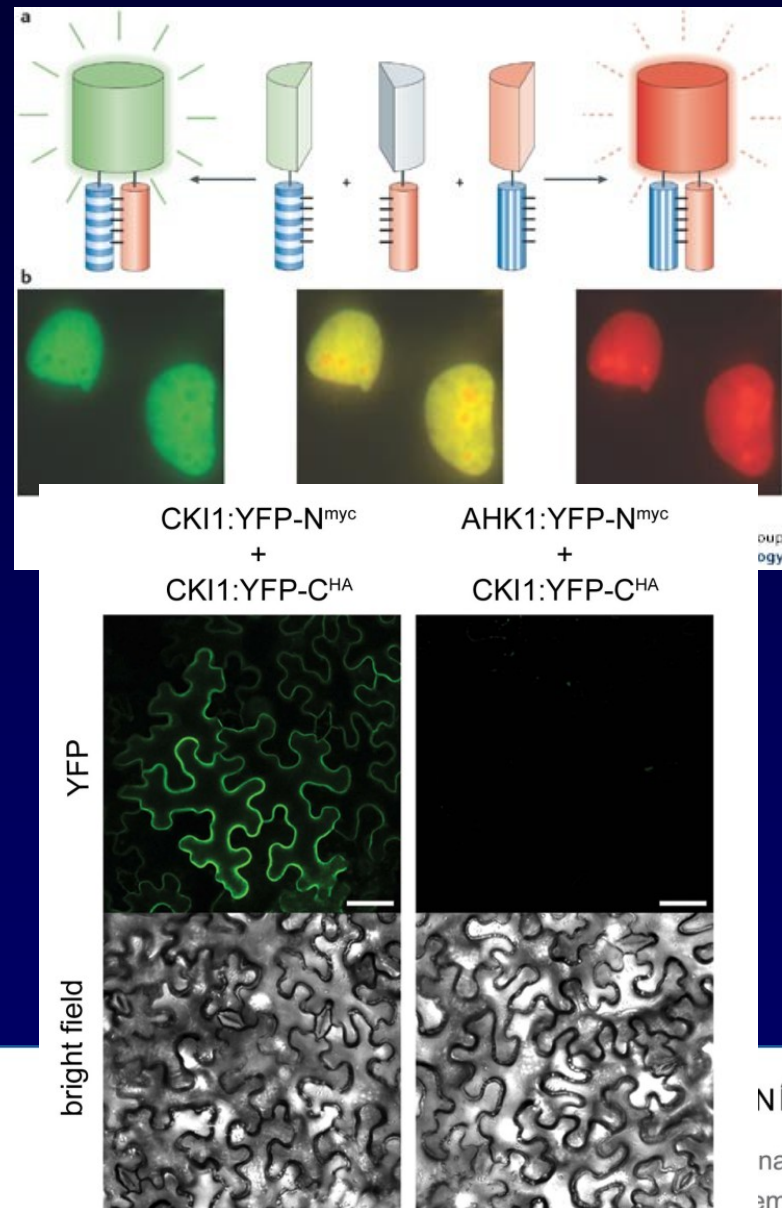


Genomika VI.

Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*

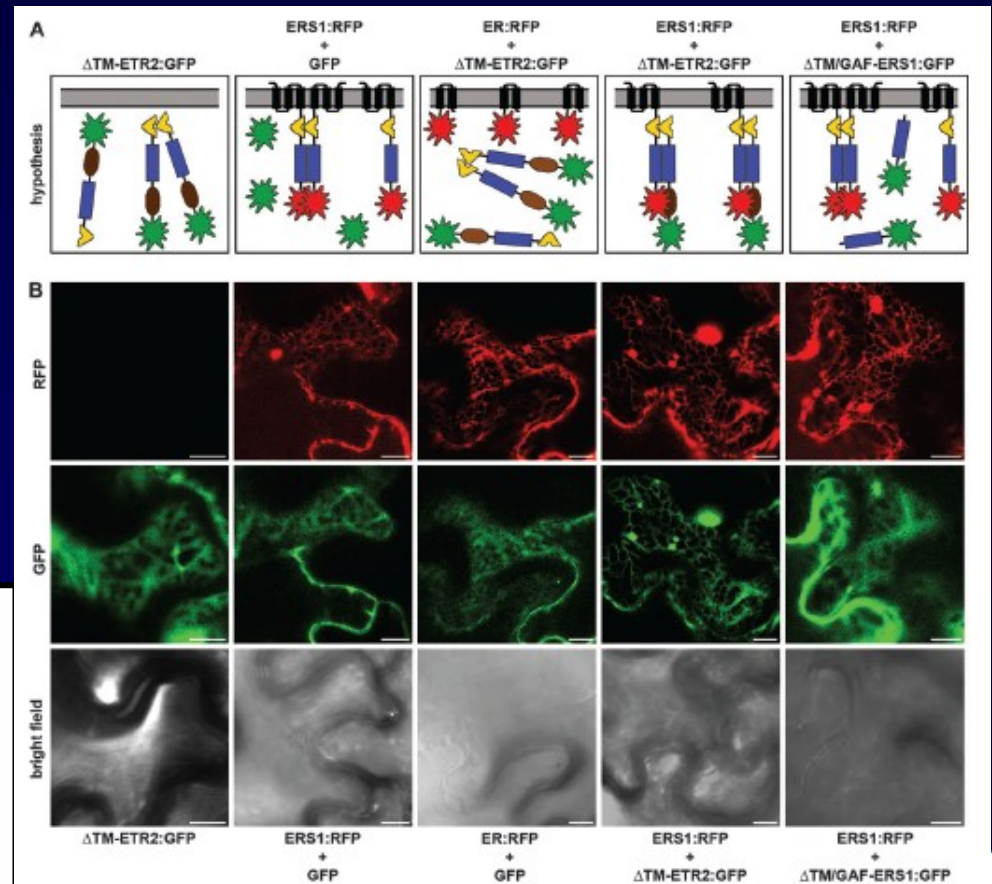
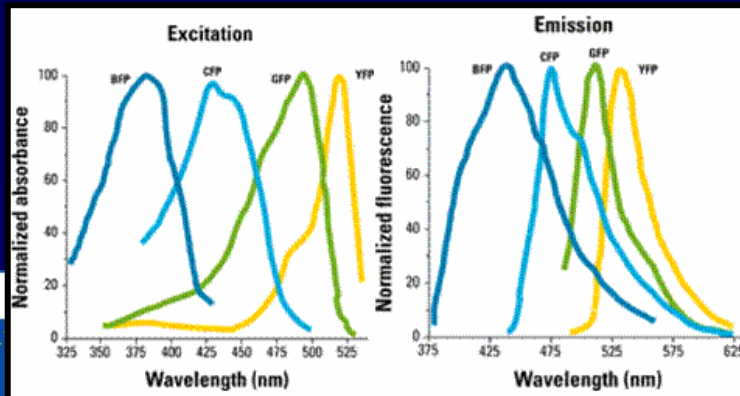
bimolekulární fluorescenční komplementace

- Proteinová interakce je detekována na základě reasociace fluoreskujícího proteinu
- každý z potenciálních interakčních partnerů je fúzován s jednou z podjednotek fluoreskujícího proteinu, např. YFP
- při interakci dojde ke znovuobnovení fluorescence
- Kromě identifikace vlastní interakce umožňuje i lokalizovat interakci v buňce



Genomika VI.

- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
 - analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)
- Umožňuje identifikaci interakcí cytoplazmatických proteinů s membránovými proteiny
 - membránový protein je fúzován s fluoreskujícím proteinem
 - potenciální ineterakční partner je fúzován s jiným fluoreskujícím proteinem, lišícím se svým emisním spektrem
 - v případě interakce dojde ke změně lokalizace cytoplazmatického proteinu na membránu (kolokalizaci s membránovým proteinem)

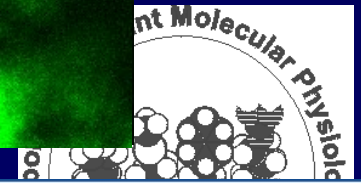
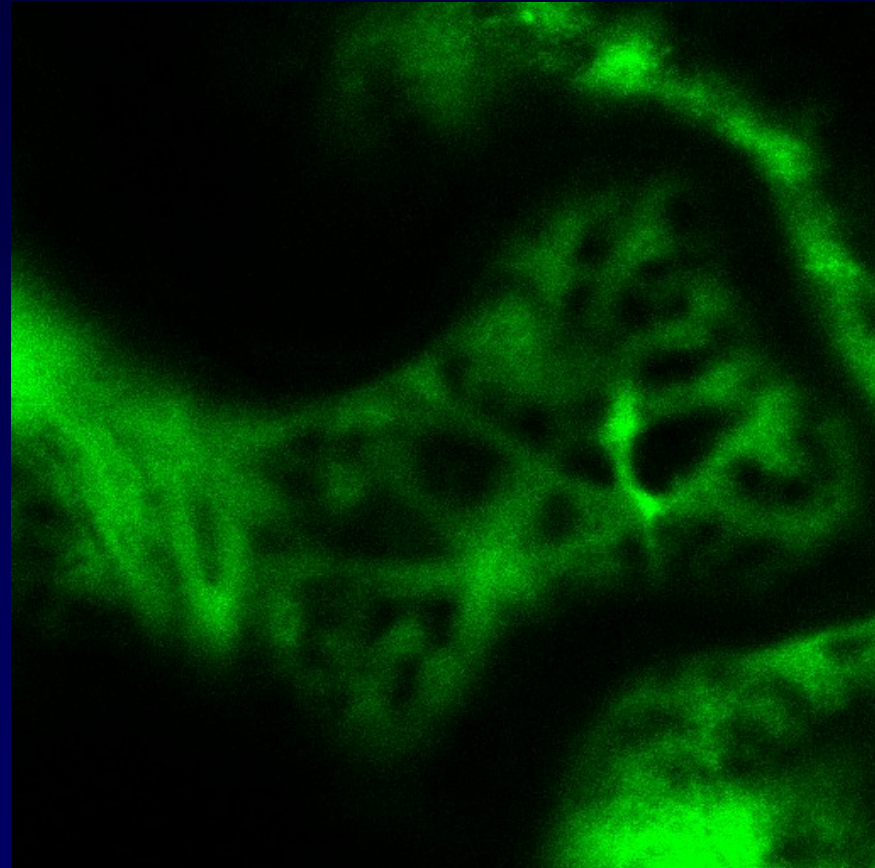
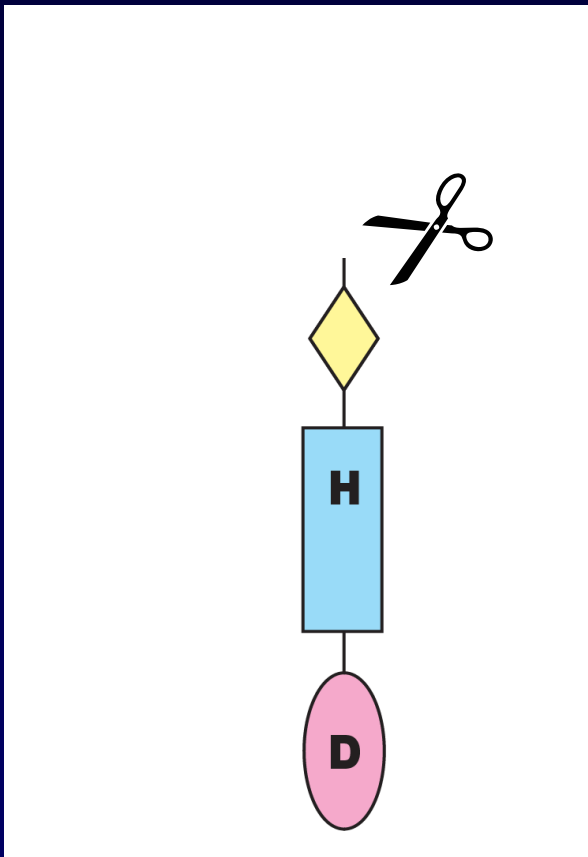


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

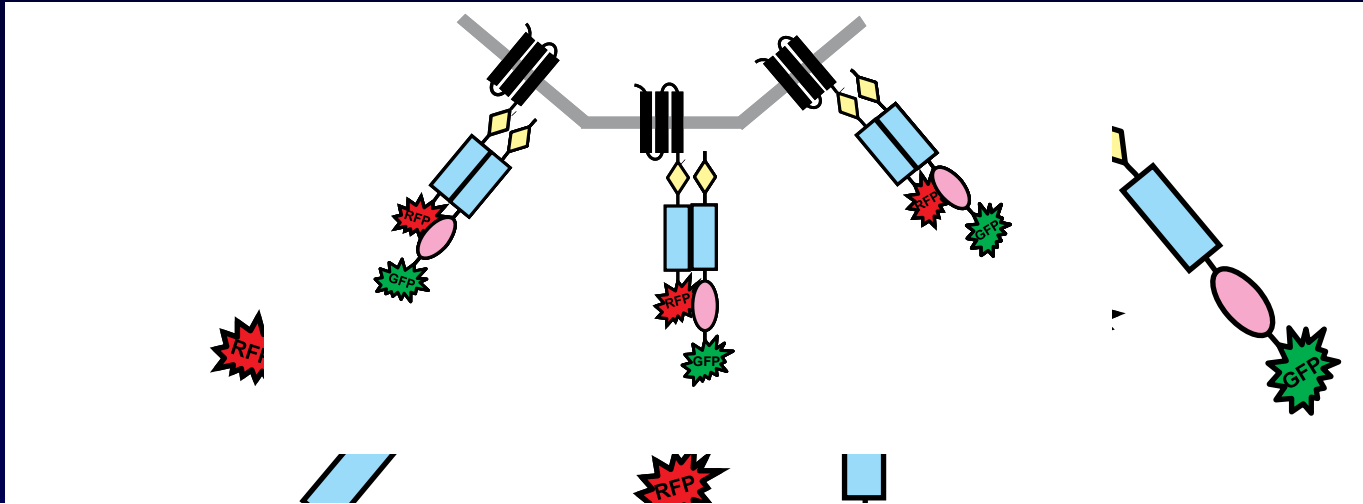
Genomika VI.

- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
 - analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)

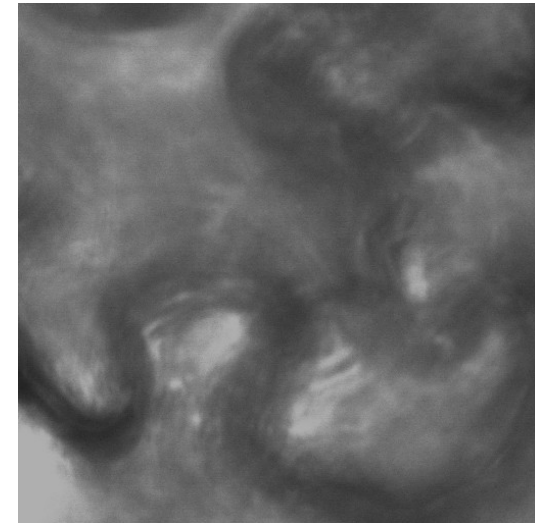
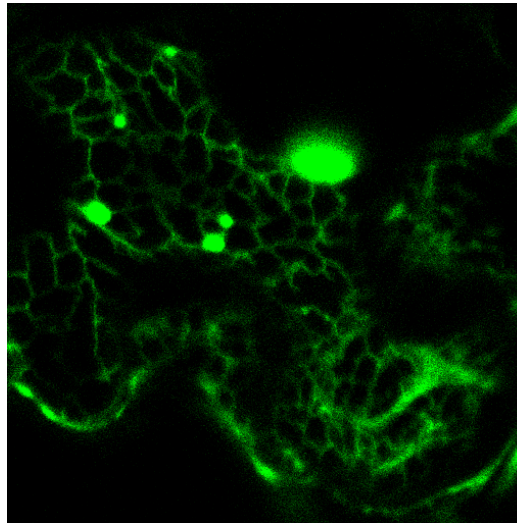
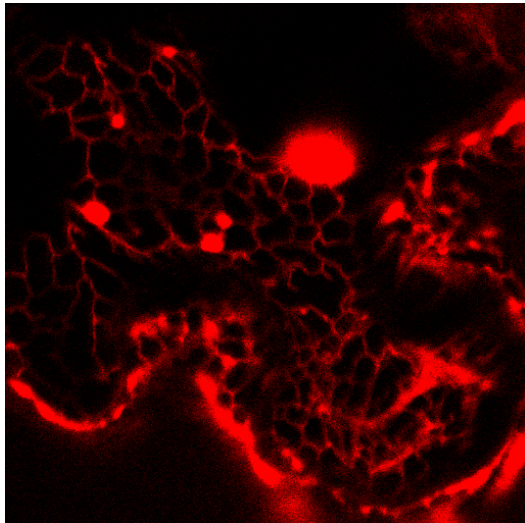


Genomika VI.

- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
 - analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)

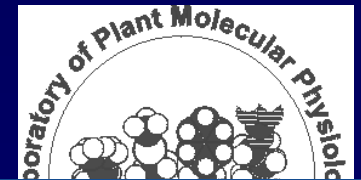


$P_{35S}::ERS1:RFP + P_{35S}::\Delta TM-ETR2:GFP$



Genomika VI.-shrnutí

- Proč jsou proteinové interakce důležité
 - Funkční význam specifických interakcí proteinů
- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
 - koimunoprecipitace
 - tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)
 - kvasinkový dvouhybridní test (Y2H)
 - bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC)
 - analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika VI.

Závěrečná diskuse

Praktické aplikace funkční genomiky:

- individualizovaná medicína („personalized medicine“)
- pokročilé biotechnologie
- šlechtění rostlin



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika VI.

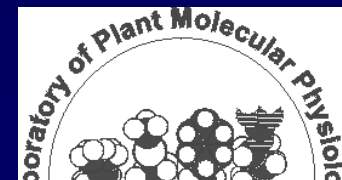
Závěrečná diskuse

Individualizovaná medicína („personalized medicine“)

Jedná se o lékařský přístup, který klade důraz na systematické využití informací o jednotlivém pacientovi za účelem vytvoření individuálně optimalizovaného preventivního a terapeutického plánu.

Některé předpoklady:

- detailní znalost genomu pacienta, ideálně kompletní genomová sekvence
- znalosti funkce jednotlivých genů včetně funkčních odlišností jednotlivých alel zastoupených v populaci
- korelace sekvenčních charakteristik s prognózami onemocnění, s úspěšností terapeutických postupů atd.




INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika VI.

- Individualizovaná medicína

 **Personalized
Medicine Coalition**



**Personalized Medicine:
The Changing Landscape of Healthcare**

American Association of Clinical Chemistry and
San Diego, California

July 14th, 2007

Edward Abrahams, Ph.D.
Executive Director
Personalized Medicine Coalition

What is Personalized Medicine?

Current Practice	Personalized Medicine
 <p>One size fits all</p>	
Trial and error	The right treatment for the right person at the right time

Genomika VI.

Individualizovaná medicína

Major Drugs Ineffective for Many...

Hypertension Drugs 10-30%

ACE Inhibitors



Heart Failure Drugs 15-25%

Beta Blockers



Anti Depressants 20-50%



Cholesterol Drugs 30-70%

Statins



Asthma Drugs 40-70%

Beta-2-agonists



...And Harmful to Some

- 100,000 deaths per year
- Just in hospitals: about 6.7% of patients (2.2 million) experience serious adverse drug reactions



Serious adverse drug reactions in even smaller percentages of treated populations have led to the withdrawal of several drugs from the market

Zelnorm

Vioxx

Cylert

“Are good drugs going to the wrong people?”

Rezulin

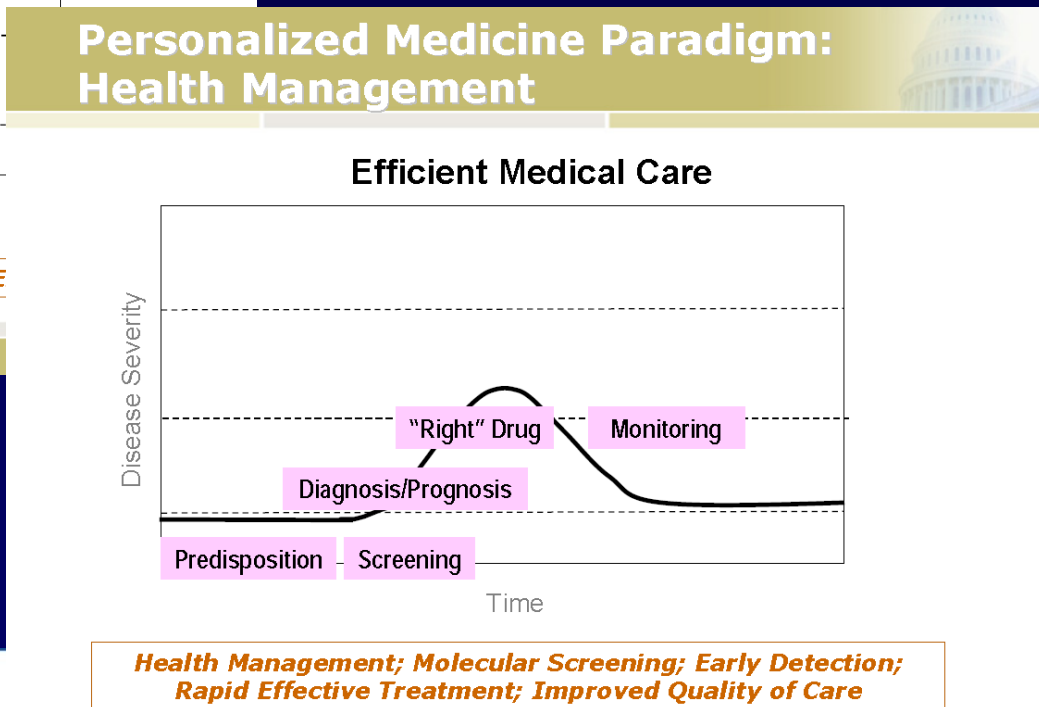
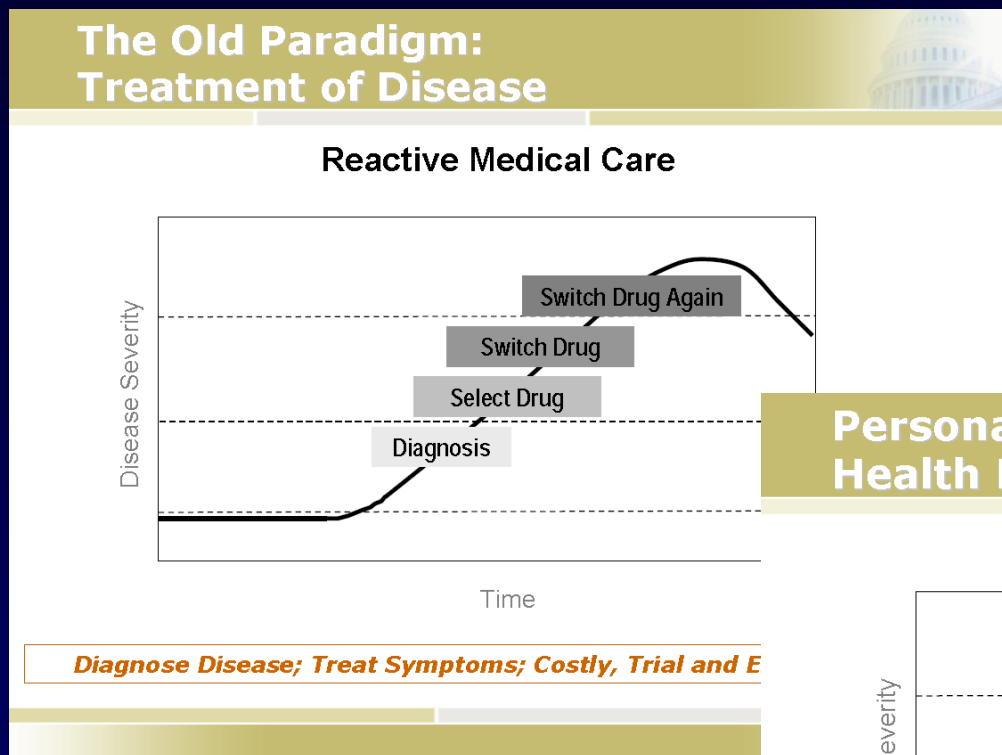
Baycol

Lotronex*

*Reintroduced in 2002 after a very strong campaign from patients who saw it as an important drug that should be made available again, even with restrictions.

Genomika VI.

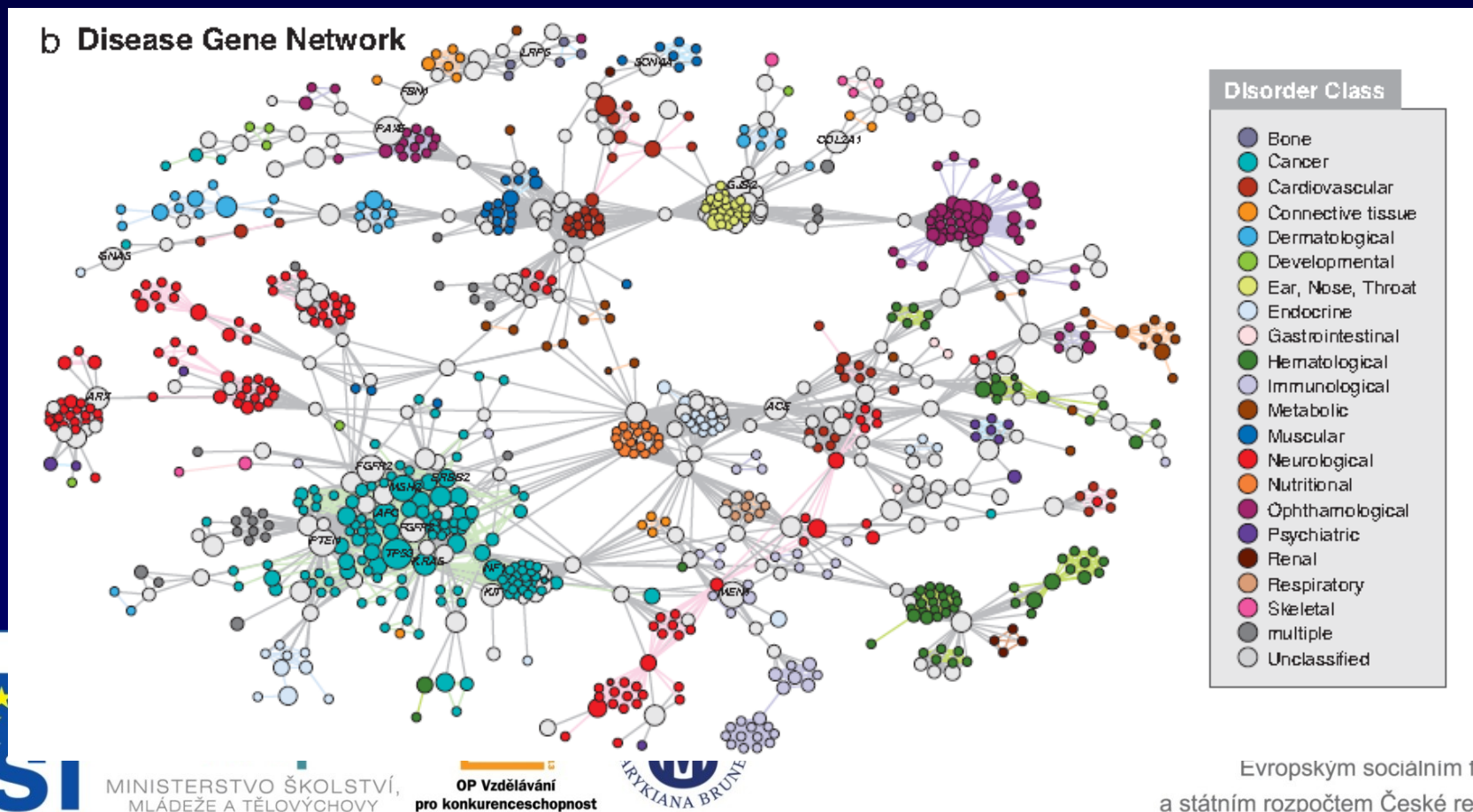
- Individualizovaná medicína



Genomika VI.

- Individualizovaná medicína
 - Využívá znalosti lidského genomu k predikci
 - zdravotních rizik
 - citlivosti k danému typu léčby
 - Problémem je multigenová podmíněnost většiny lidských onemocnění

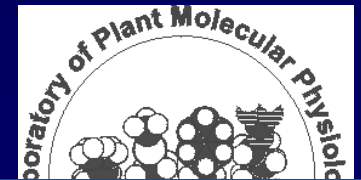
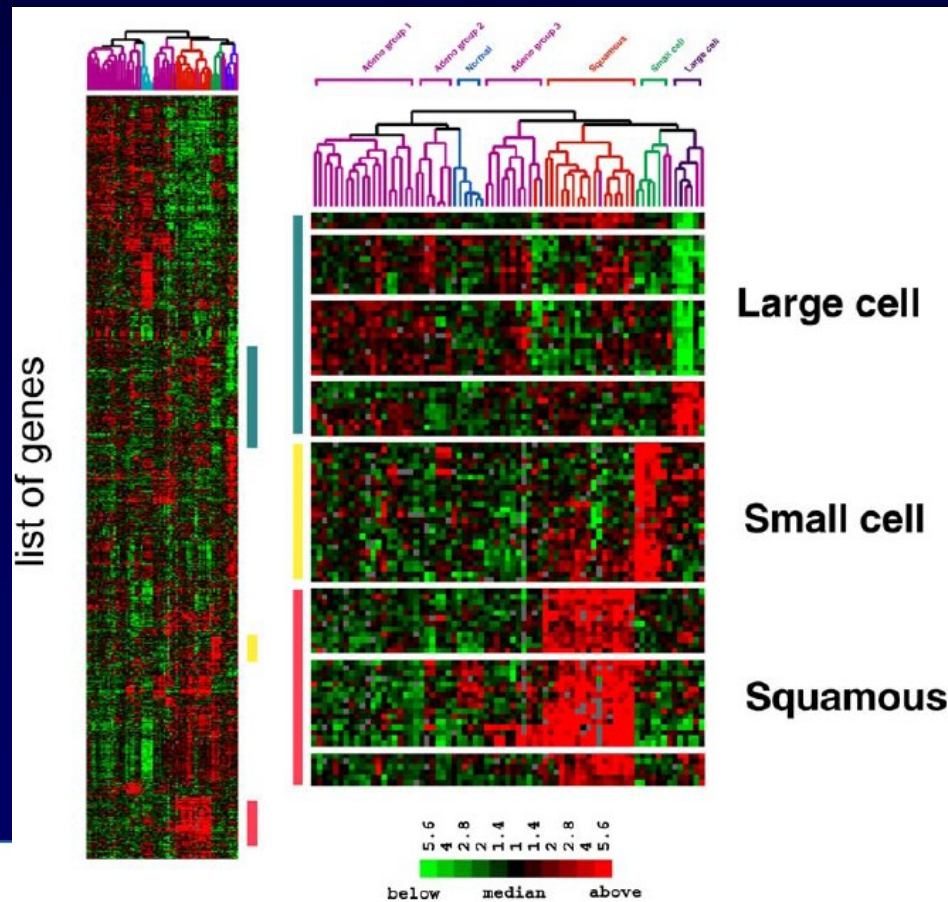
Goh et al., 2007



Genomika VI.

- Individualizovaná medicína
 - Řešením je přístup systémové biologie
 - využívá např. genové klastrování pro identifikaci genů podílejících se na pozorovaných jevech

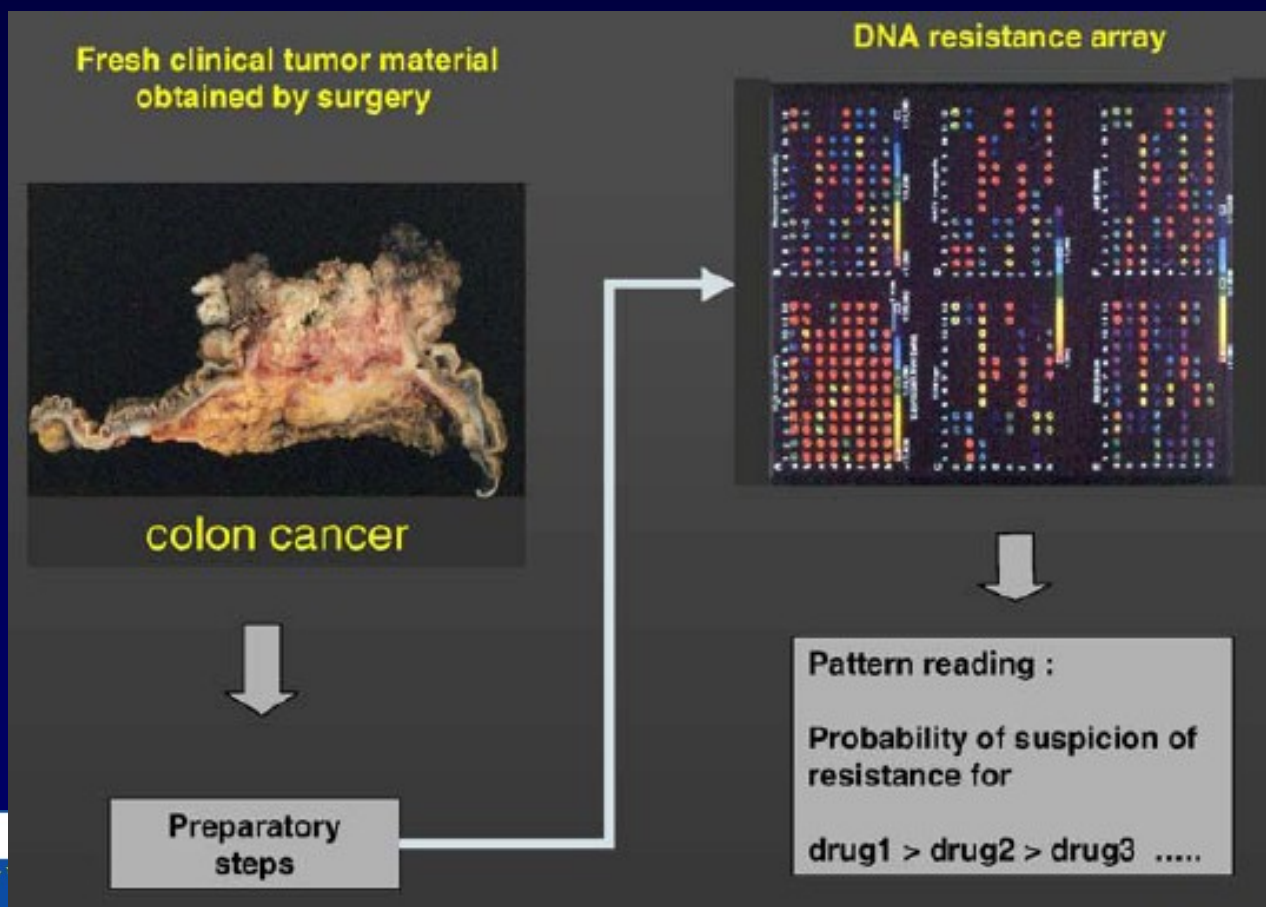
Dietel and Sers, 2006



Genomika VI.

- Individualizovaná medicína
 - Po identifikaci genů asociovaných s rezistencí možnost využití nízkodenzitních microarrays pro identifikaci potenciální rezistence např. nádorových onemocnění

Dietel and Sers, 2006



OP ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika VI.

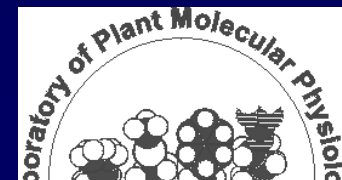
Závěrečná diskuse

Pokročilé biotechnologie

<http://www.efb-central.org>

Některé příklady:

- efektivní využití rostlinné biomasy pro výrobu paliv
- získávání základních jednotek pro výrobu polymerních látek z živých organismů místo z fosilních zdrojů
- fytofarmaceutika – nové metody vakcinace jako je například exprese protilátek, nebo antigenů vhodných k imunizaci v rostlinách



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika VI.

Šlechtění rostlin

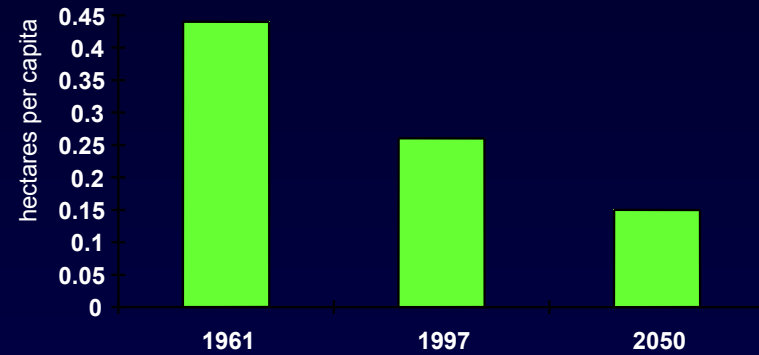
<http://www.efb-central.org>

<http://www.gmo-compass.org/>

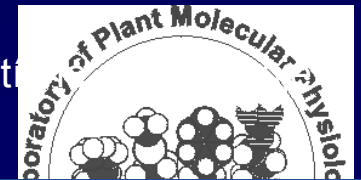
<http://www.ugent.be/we/genetics/ipbo/en>

Některá fakta k zamyšlení:

- naše civilizace je postavena na zemědělství, za 10.000 let jeho existence klesla plocha potřebná k obživě jedince o 90%
- k zabránění kolapsu je třeba tuto plochu dále snížit a to ze současných 0,45 ha/osobu až na 0,2 ha/osobu a to do roku 2050
- návrat k původním metodám zemědělství je návratem k původním nárokům na plochu k obživě a je tedy dlouhodobě neudržitelný (Jaké trendy vidíme kolem sebe v Evropě? Jak se to slučuje se solidaritou k rozvojovým zemím?)
- intenzivní zemědělství = konverze vody a ropy na potraviny
- cílem rostlinných biotechnologií je využít všech dostupných poznatků vědy ke šlechtění odrůd s větším výnosem při menších nákladech na vodu a hnojiva
- je nutná obhajoba GMO rostlin („biotech crops“) před veřejností, neboť toto budou plodiny 21. století rostoucí v lepším životním prostředí
- neakceptovatelnost nových metod z ideologických důvodů staví každého vědce do obtížné situace, kterou nerozumem, kterému musí s plným nasazením čelit

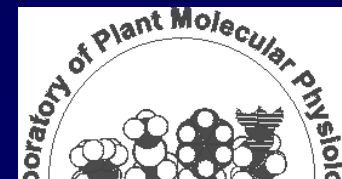


Source: UN Millennium Ecosystem Assessment



Genomika VI.

- Geneticky Modifikované Organismy (GMO)
 - Organismy, nesoucí upravenou vlastní nebo cizí 90z jiného organismu) genetickou informaci, umožňující cílené změny daného organismu a jeho využití pro daný účel
 - **GMO rostliny, možnosti využití**
 - Zvýšení odolnosti ke škůdcům
 - Zvýšení výnosů bez nutnosti používat pesticidy, fungicidy, insekticidy
 - Tolerance k herbicidům
 - Snížení zatížení prostředí herbicidy
 - zvýšení tolerance k chladu, suchu a zasolení půdy
 - Zvýšení využitelnosti pěstebních ploch v aridních oblastech
 - Snížení spotřeby vody pro zemědělství
 - Produkce farmaceuticky využitelných látek (biofarmak) v rostlinách
 - Zvýšení dostupnosti některých zásadních léčiv (inzulín) v chudých oblastech světa



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika VI.

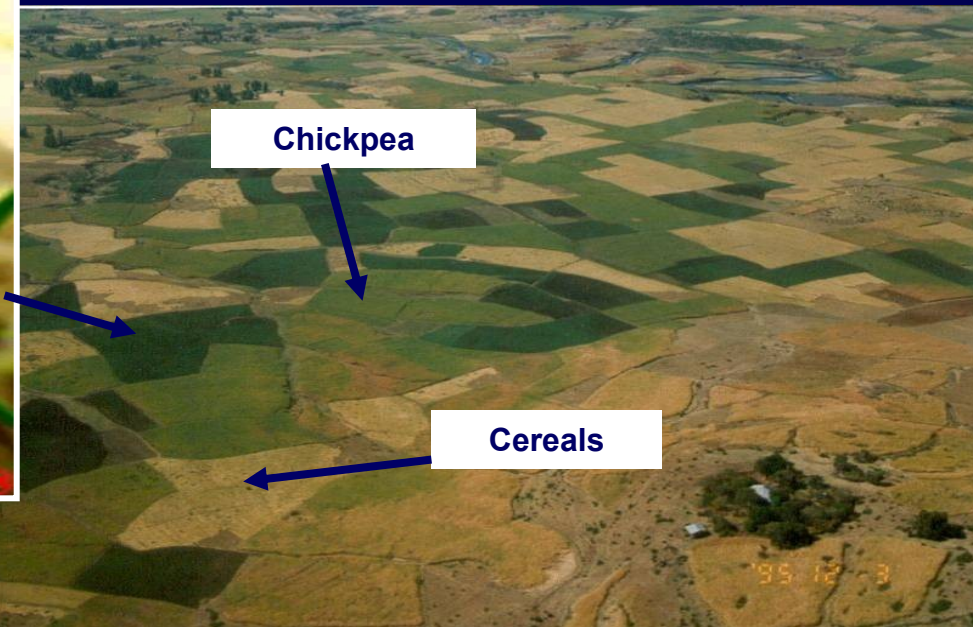
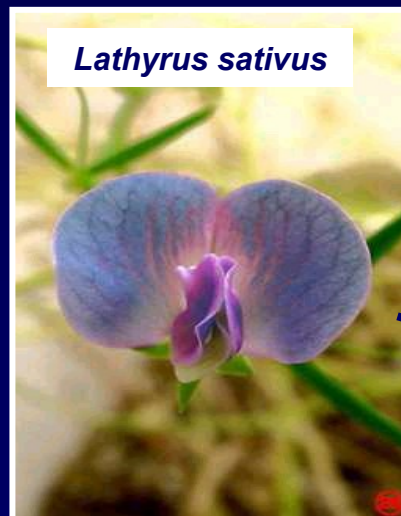
- GMO, pro a proti
 - Zvýšení odolnosti ke škůdcům
 - Zvýšení výnosů bez nutnosti používat pesticidy, fungicidy, insekticidy
 - BT rýže
 - Expres zkrácené verze genu pro delta-endotoxin, cryIA(b z *Bacillus thuringiensis*, který má insekticidní účinky
 - Existují studie prokazující potenciálně negativní vliv i na jiný než škodlivý hmyz, průkaznost není zcela jasná
 - Frekvence přenosu pylu na jiné druhy (křížení) byla zjištěna v rozsahu 0,05-0,53%
 - Negativní vliv silných pesticidů používaných v současném zemědělství je ovšem jednoznačný

Ming High 2004



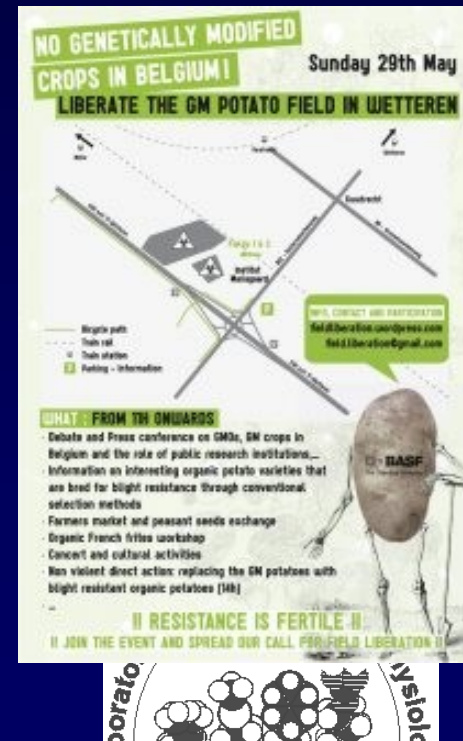
Genomika VI.

- GMO, pro a proti
 - Zvýšení nutričních hodnot
 - Zlatá rýže (golden rice)
 - Vložení několika enzymů pro biosyntézu β karotenu
 - Zabránění problémům se zrakem u velké části populace v Indii a Číně
 - Detoxifikace cizrny (*Lathyrus sativus*)
 - Rezistentní k suchu
 - Zdroj obživy pro velkou část populace v Africe



Genomika VI.

- GMO, pro a proti
 - Nebezpečí vzniku alergií
 - GMO rostliny obsahují vždy jen jediný nebo několik málo vnesených genů a jsou velmi pečlivě testovány
 - Naopak daleko méně jsou testovány nové odrůdy, při jejichž šlechtění se velmi často používají silné mutageny, např. rentgenové záření a kde dochází ke vzniku desítek a stovek nových mutací najednou
 - O zákazu pěstování GMO ve Švýcarsku rozhodlo referendum
 - 30% populace EU se domnívá, že pouze transgenní rostliny mají geny a odmítá je jíst...



EVROPSKÁ UNIE



MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika VI.

Závěrečná diskuse

Váš úkol:

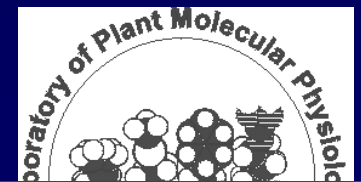
- neúnavně vysvětlovat, že využívání vědeckých poznatků, a to včetně genomiky, je nutné kromě pokroků v medicíně také pro zachování planety a naší civilizace
- diskuse s širokou veřejností o významu a přínosech GMO pro lidskou společnost
- žádná technologie není bez rizika, ani GMO, ale není možné dělat z GMO strašáka a démonizovat je – za tím je třeba hledat finanční zájmy některých firem a zaslepenost „rádobychránců světa“ všeho druhu



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika V. Diskuse



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky