



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace předmětu

Genetika člověka GCPSB

„Propojení výuky oborů
Molekulární a buněčné biologie
a Ochrany a tvorby životního
prostředí“

Reg. č.: CZ.1.07/2.2.00/28.0032

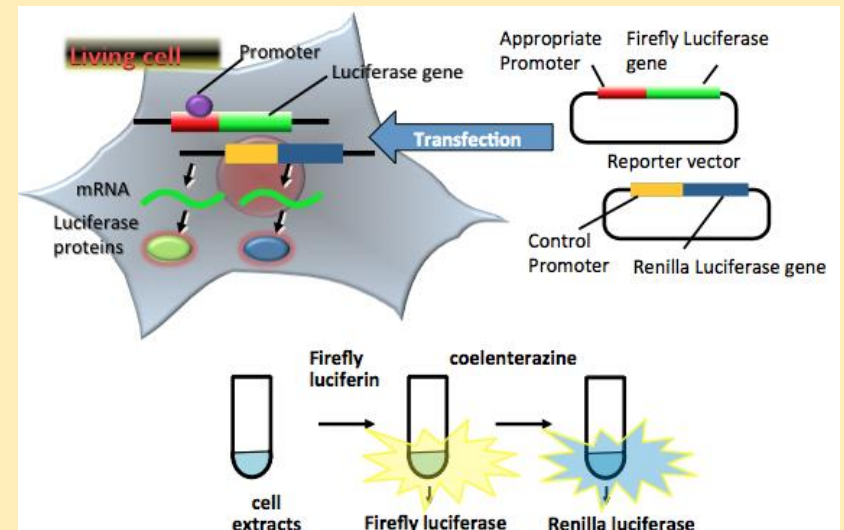
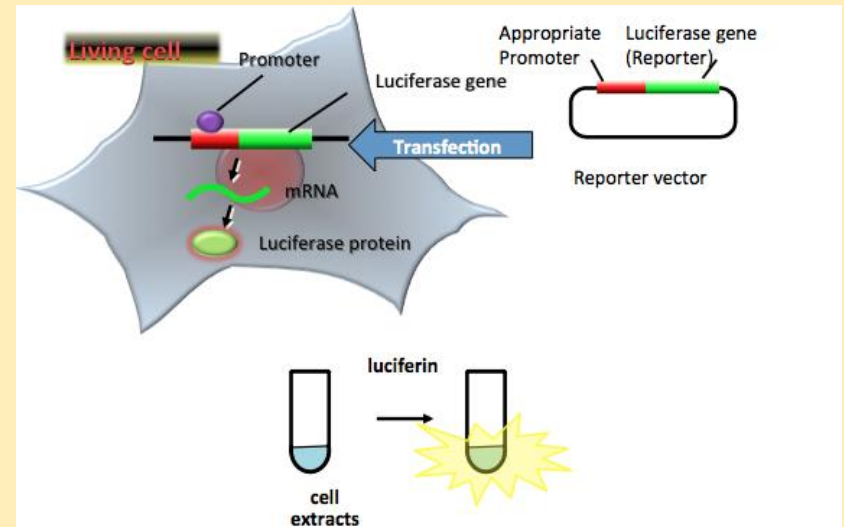
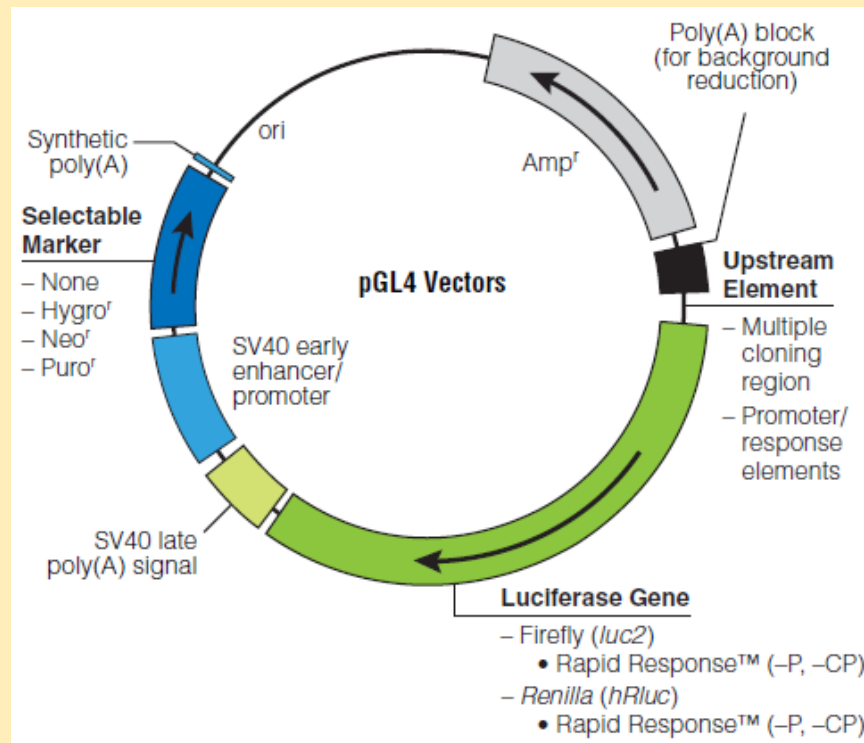
PZ-TR: Konštrukcia reportérovej bunkovej línie na stanovenie transkripčnej aktivity tyroidného receptoru a jej využitie v praxi

RNDr. Peter Illés, Ph.D.

12.3. 2015, Olomouc

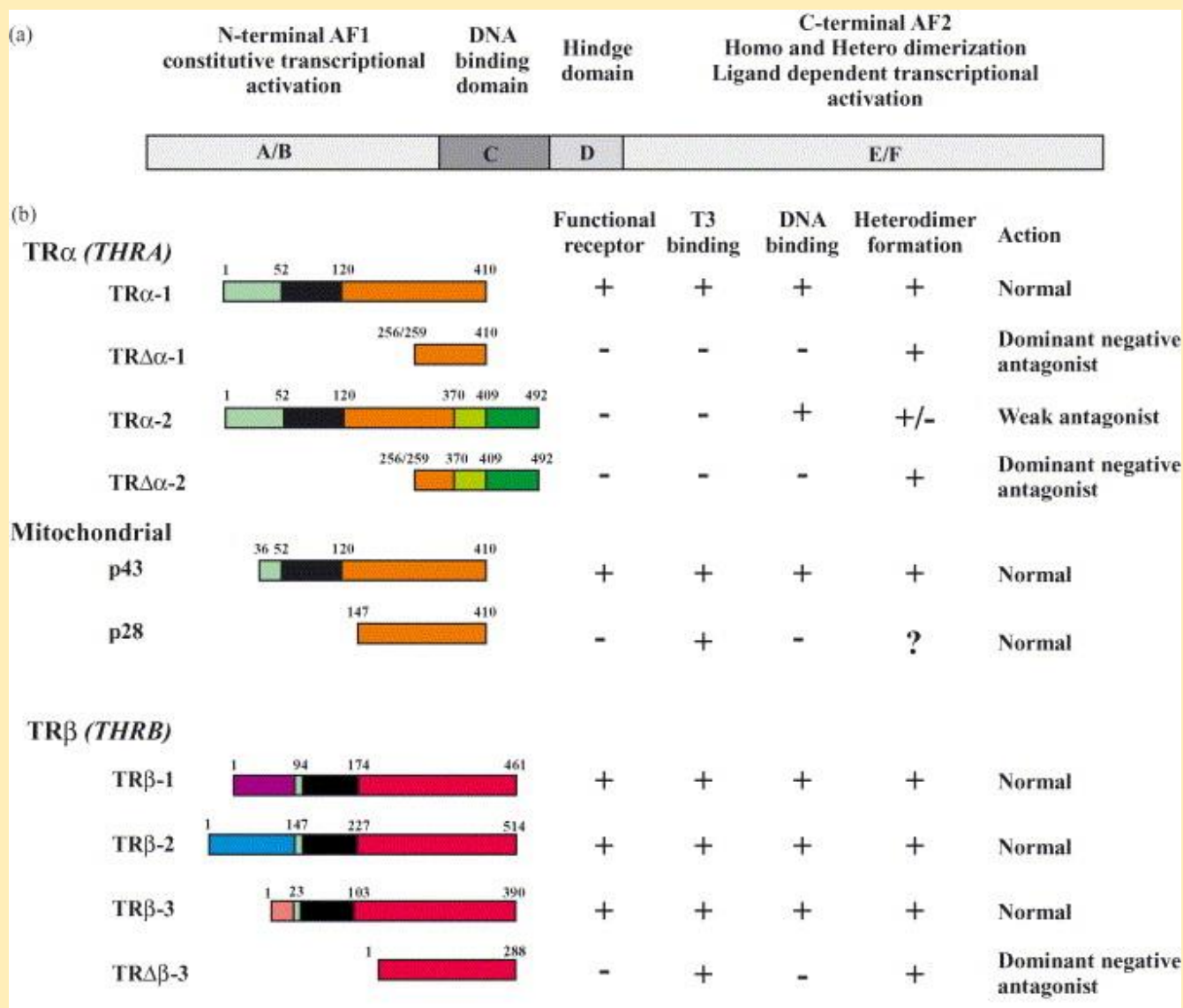
LUCIFERÁZOVÝ REPORTÉROVÝ SYSTÉM

- štúdium génovej expresie na transkripčnej úrovni

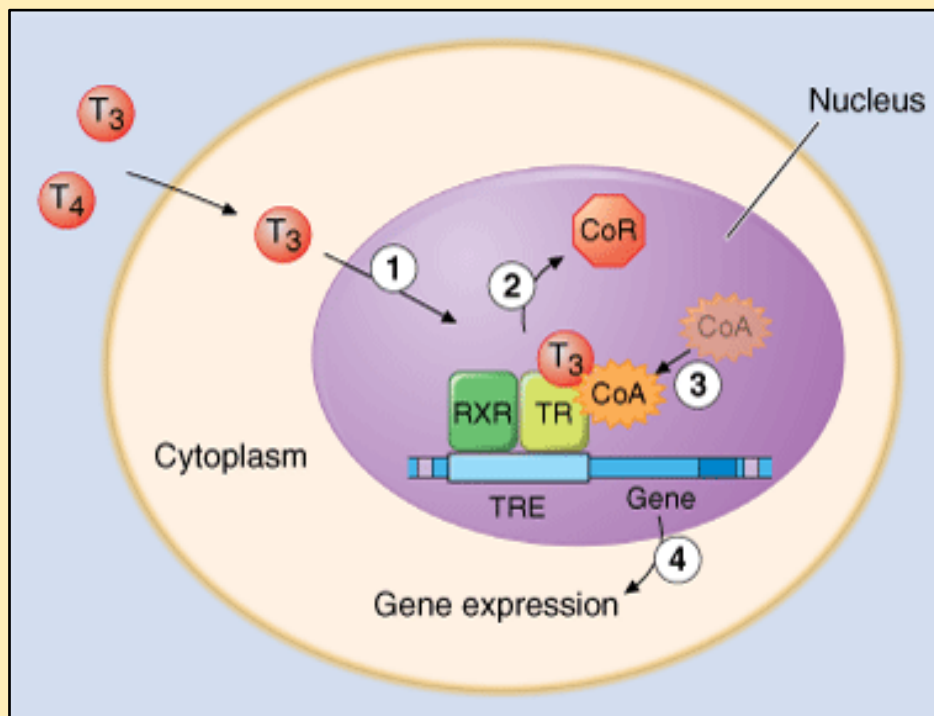


1. Tranzientná transfekcia
2. Stablná transfekcia

RECEPTORY TYROIDNÉHO HORMÓNU - TRs



"RESPONSE" ELEMENTELEMENY PRE TYROIDNÝ HORMÓN - TREs



2 x hexamérická "half-site"

AGGTCA

G AG

Priama repetícia (DR4)

→ →
 AGGTCAnnnnnAGGTCA
 TCCAGTnnnnnTCCAGT

Invertovaný palindróm (IP6, F2)

→ →
 TGACCTnnnnnnnAGGTCA
 ACTGGAnnnnnnnTCCAGT
 ← ←

Obrátená repetícia (ER8, IP8)

→ →
 TGACCTnnnnnnnnnAGGTCA
 ACTGGAnnnnnnnnnTCCAGT
 ← ←

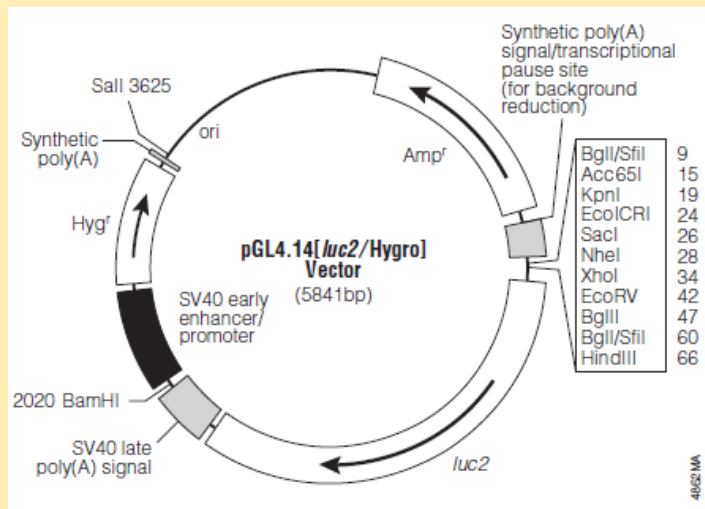
Palindróm (Pal0)

→ →
 AGGTCATGACCT
 TCCAGTACTGGA
 ← ←

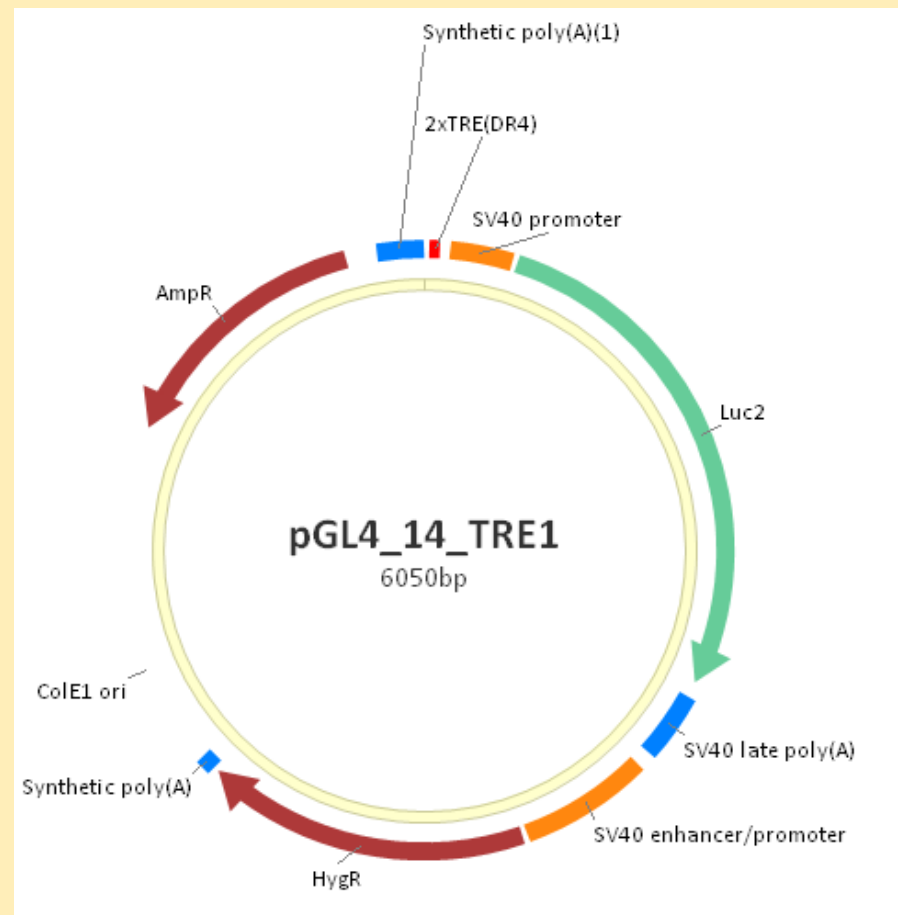
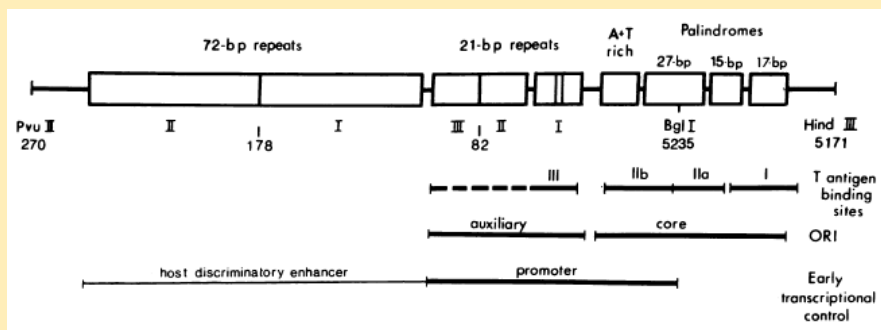
NÁVRH REPORTÉROVÉHO KONŠTRUKTU

- 2 x TAAGGTCATTTAAGGTCAA motív

- pGL4.14[*luc2P*/Hygro] vektor



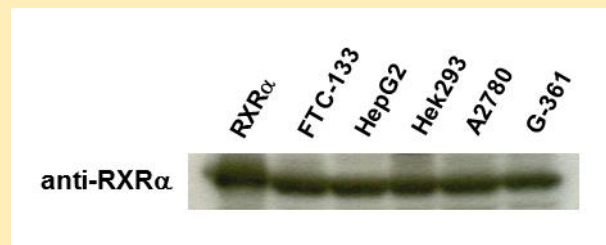
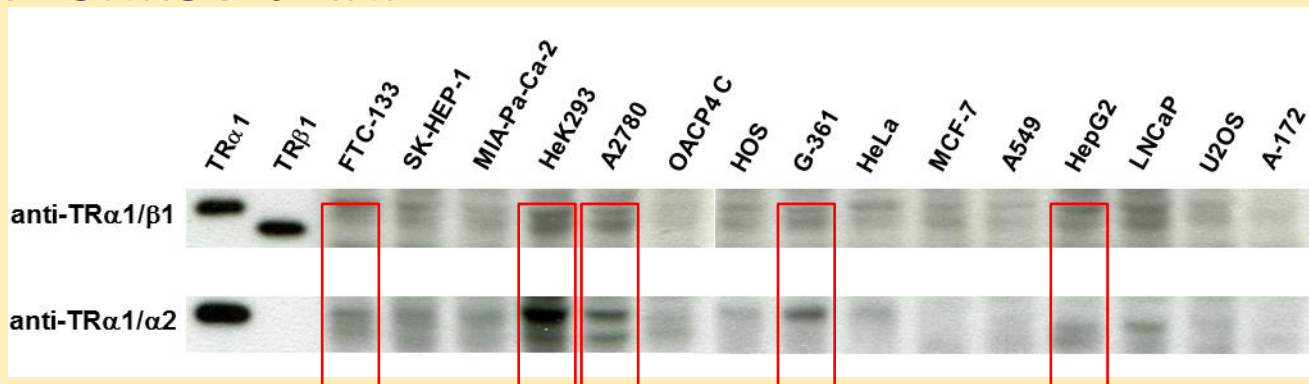
- SV40 promótor



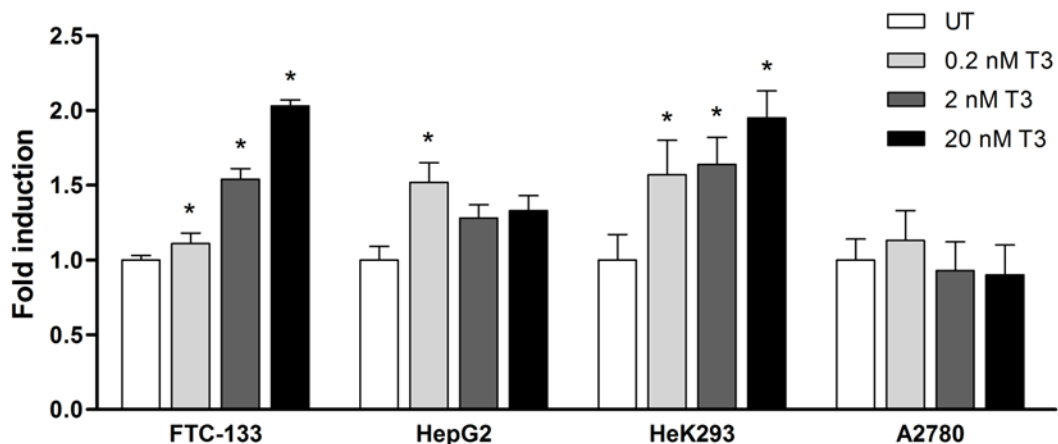
VÝBER BUNKOVEJ LÍNIE

Bunková línia	Pôvod
1. SK-HEP-1	Human liver adenocarcinoma
2. MIA-Pa-Ca-2	Human pancreatic carcinoma
3. HeK293T	Human embryo kidney
4. A2780	Human ovarian carcinoma
5. OACP4 C	Human gastric cardia adenocarcinoma
6. HOS	Human osteosarcoma
7. G-361	Human malignant melanoma
8. HeLa	Human cervix carcinoma
9. MCF-7	Human breast adenocarcinoma
10. A549	Human lung adenocarcinoma
11. HepG2	Human hepatocellular carcinoma
12. LNCaP	Human prostate adenocarcinoma
13. FTC-133	Human follicular thyroid carcinoma
14. U2OS	Human osteosarcoma
15. A-172	Human glioblastoma

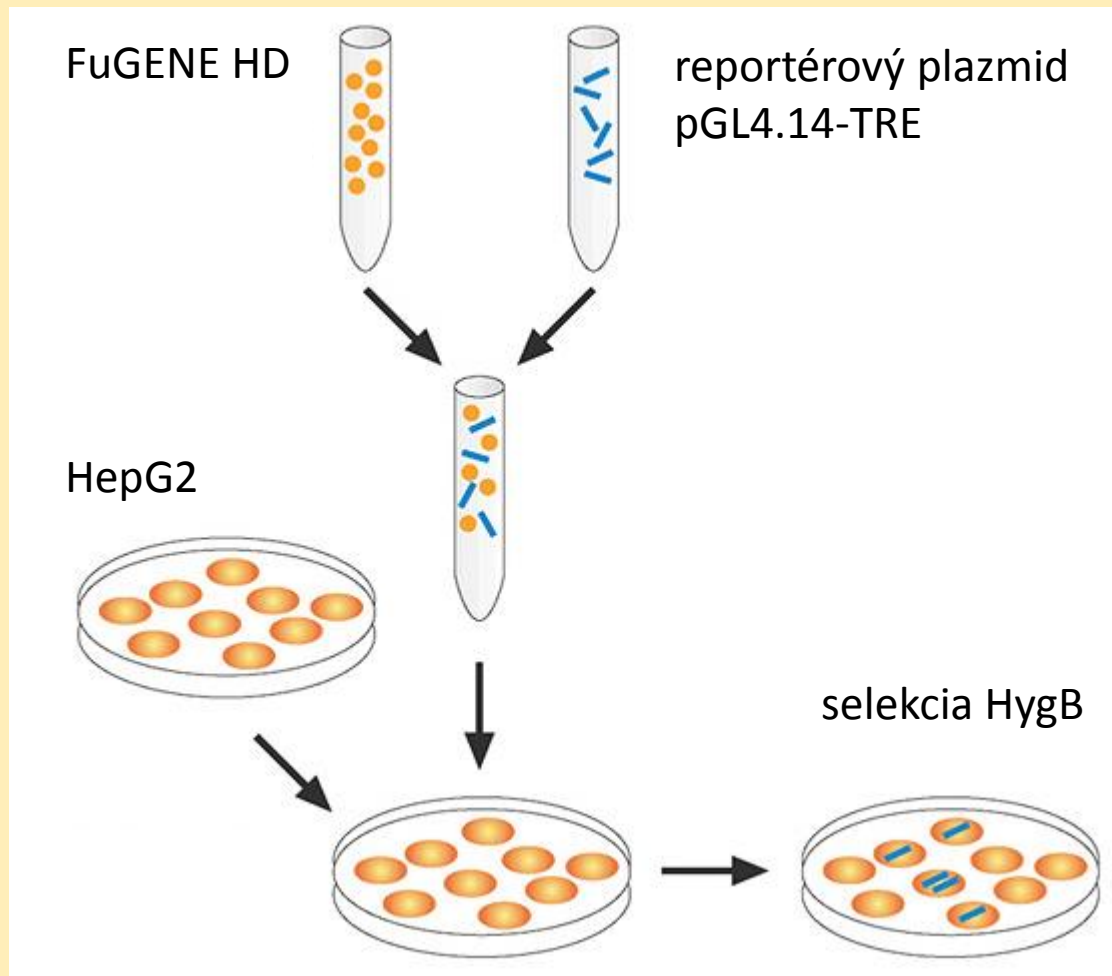
VÝBER BUNKOVEJ LÍNIE



Expression of human *Spot 14* gene



STABILNÁ TRANSFEKCIA



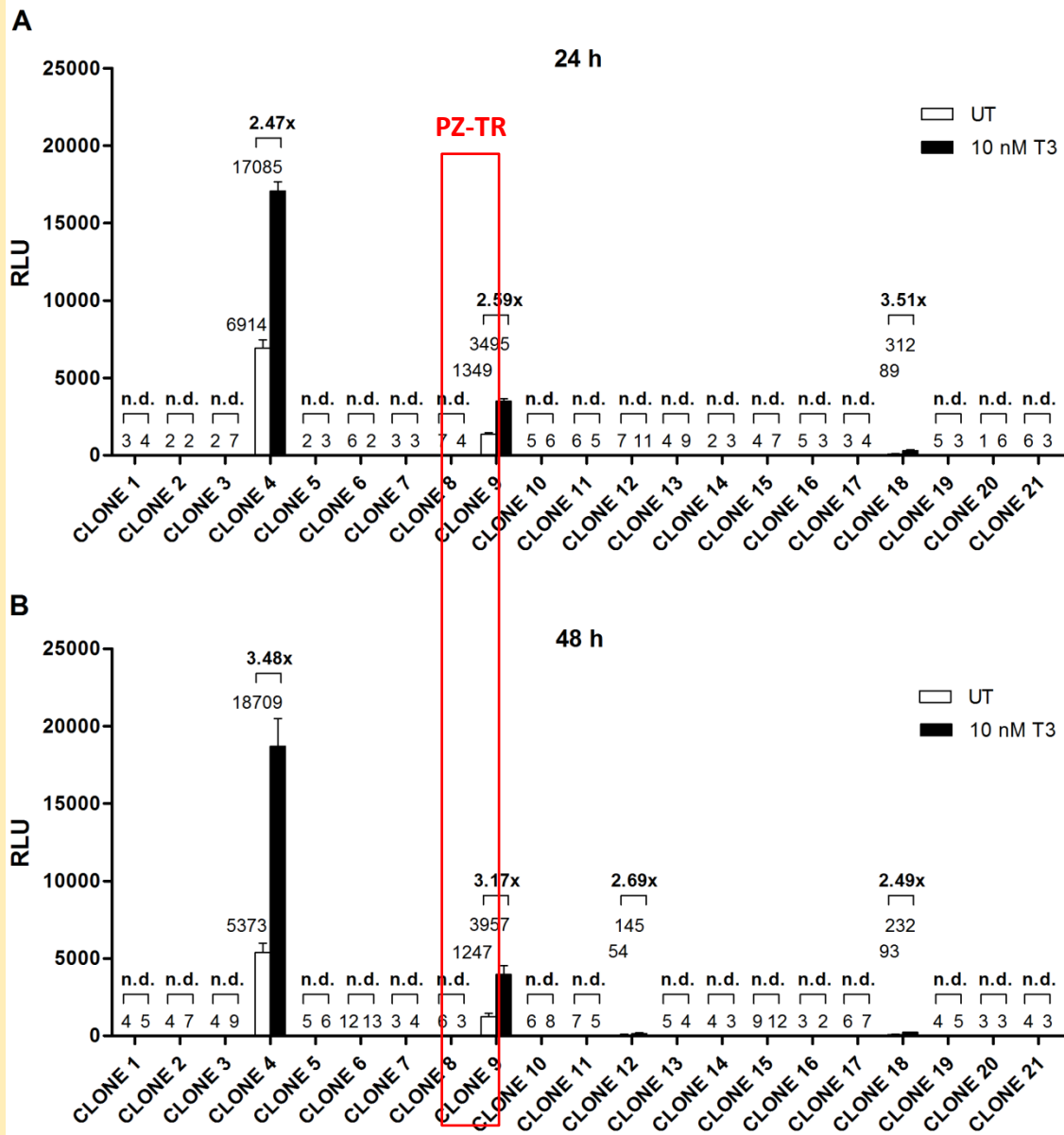
POLYKLONÁLNA POPULÁCIA



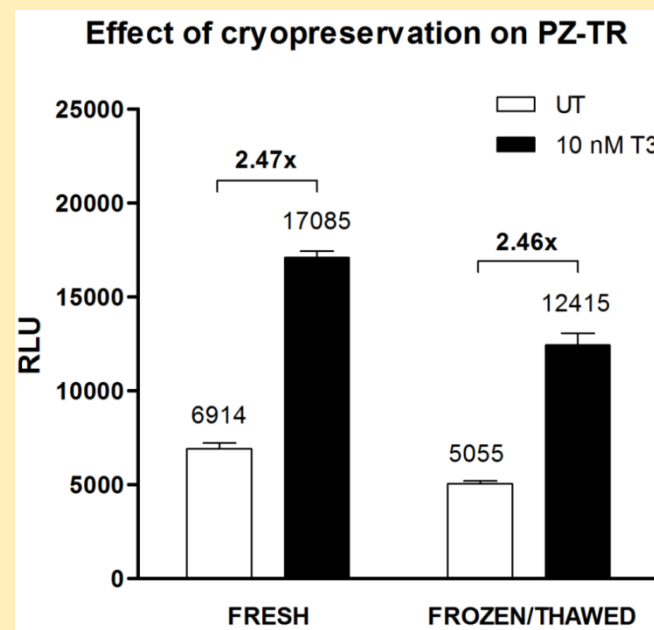
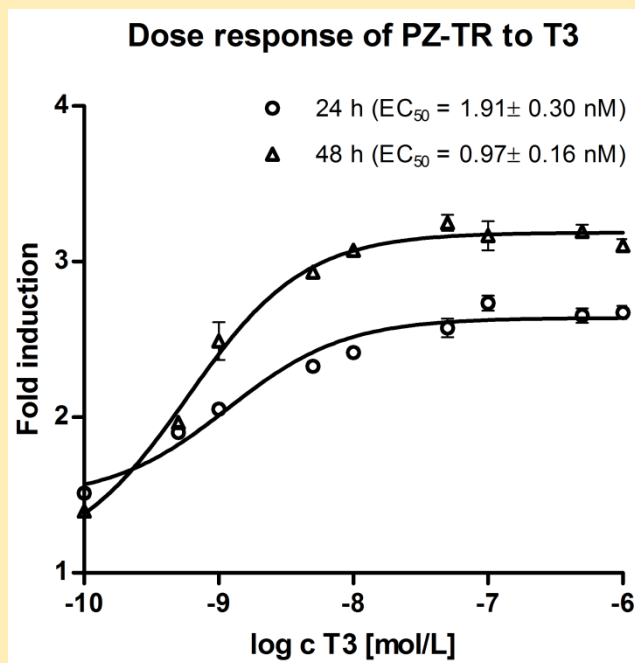
MONOKLONÁLNA POPULÁCIA

SELEKCIA KLONOV

Responsivity of clones to 10 nM T3



CHARAKTERIZÁCIA BUNKOVEJ LÍNIE PZ-TR

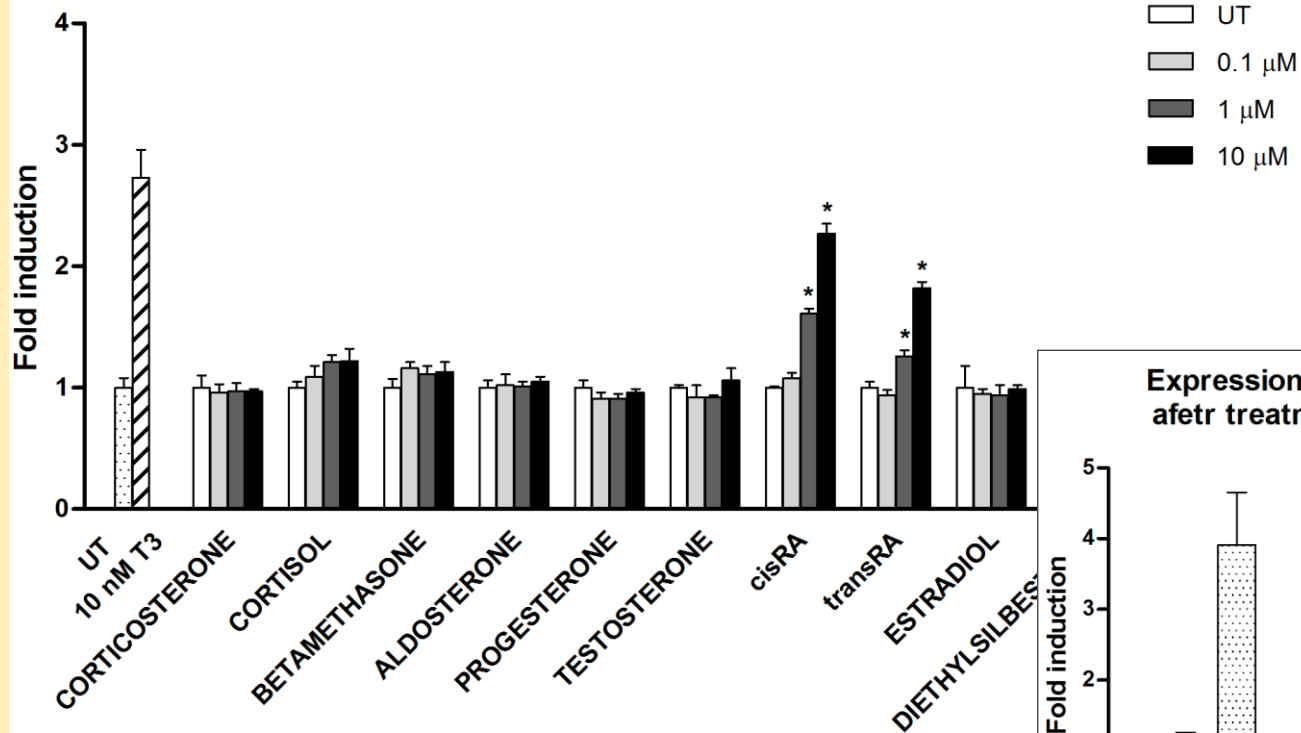


Maintenance of luciferase inducibility by 10 nM T3

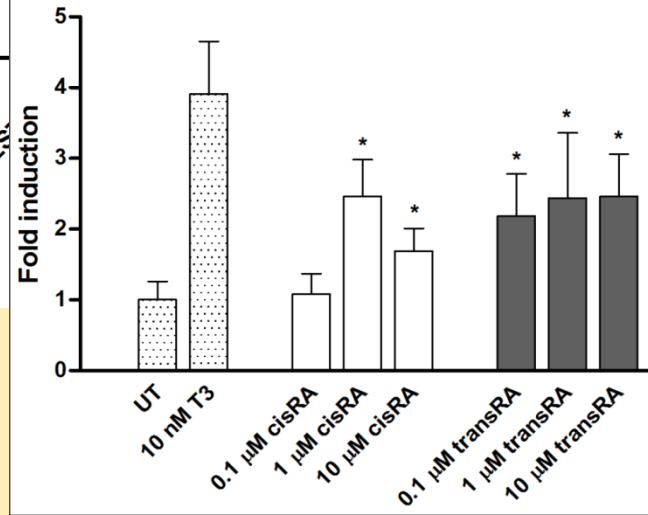
Passage number	Days in culture	RLU \pm SD	Fold
0	4	12415 \pm 1109	2,46
3	16	9205 \pm 68	2,57
6	29	11344 \pm 954	2,73
9	41	8944 \pm 520	2,42
12	54	8954 \pm 276	2,45

CHARAKTERIZÁCIA BUNKOVEJ LÍNIE PZ-TR

Responsivity of PZ-TR to hormonal treatments

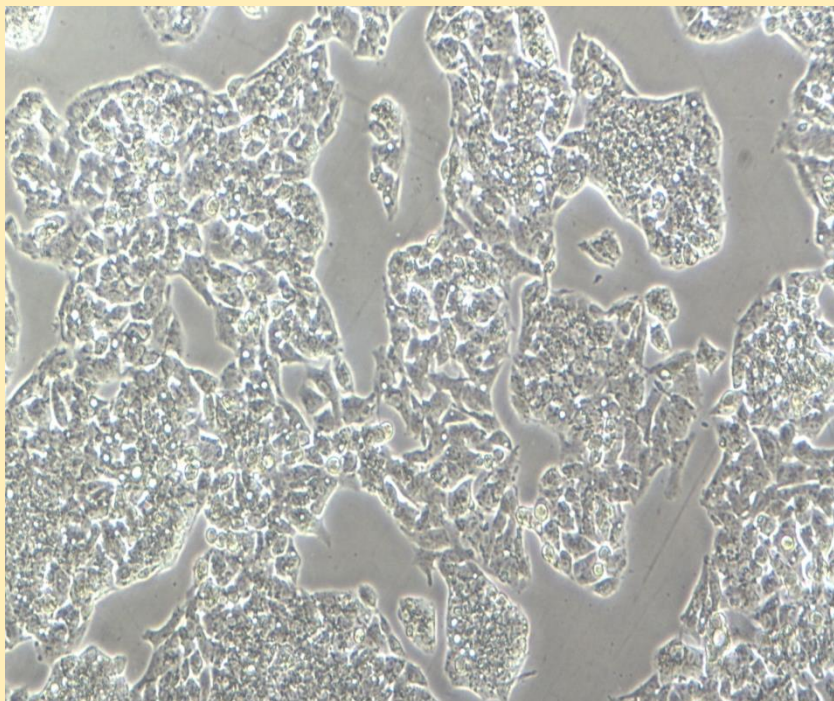


Expression of human *Spot 14* gene after treatment with retinoic acids

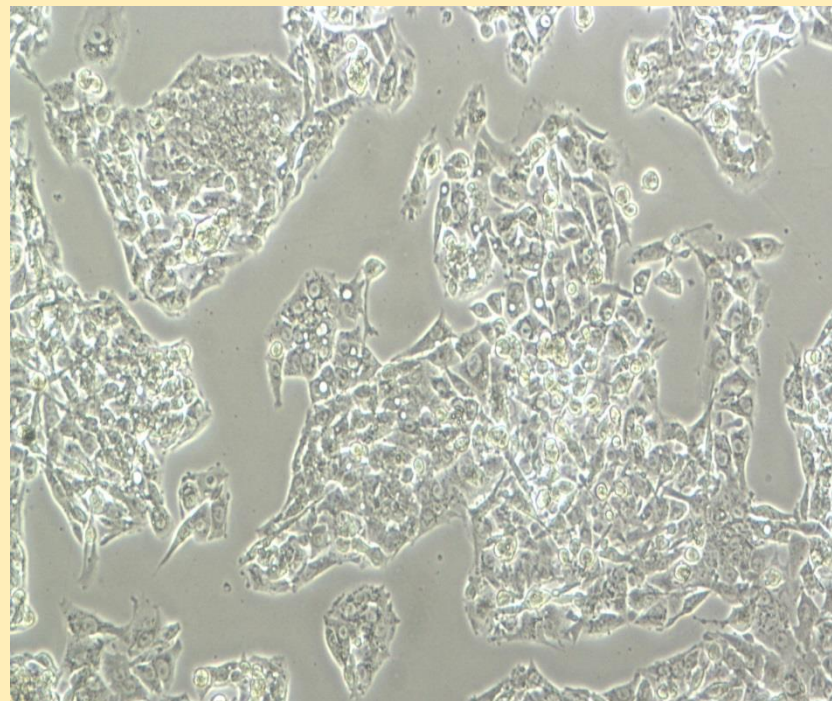


CHARAKTERIZÁCIA BUNKOVEJ LÍNIE PZ-TR

HepG2 (10. pasáž)



PZ-TR (10. pasáž)

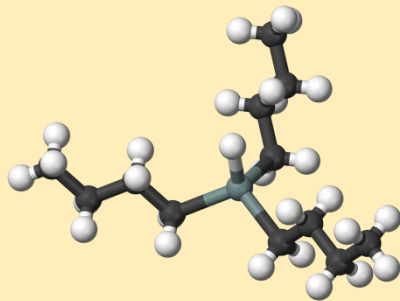


VPLYV ORGANICKÝCH ZLÚČENÍN CÍNU NA TRANSKRIPČNÚ AKTIVITU TYROIDNÉHO RECEPTORU

- enviromentálne polutanty, toxické pre živočíšne bunky
- použitie: ochranné nátery lodí, antikorozívne nátery, fungicídy, pesticídy, prípravky na konzervovanie dreva
- nerozpustné v H_2O , akumulácia v sedimentoch a pôde, pomalá degradácia
- vplyv na endokrinný systém už pri nízkych koncentráciách, aktivácia RXR receptoru

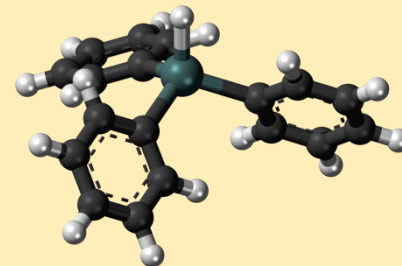
SKUPINA I - deriváty tributylcínu

(TBTC, TBTB, TBTI, TBTOH)



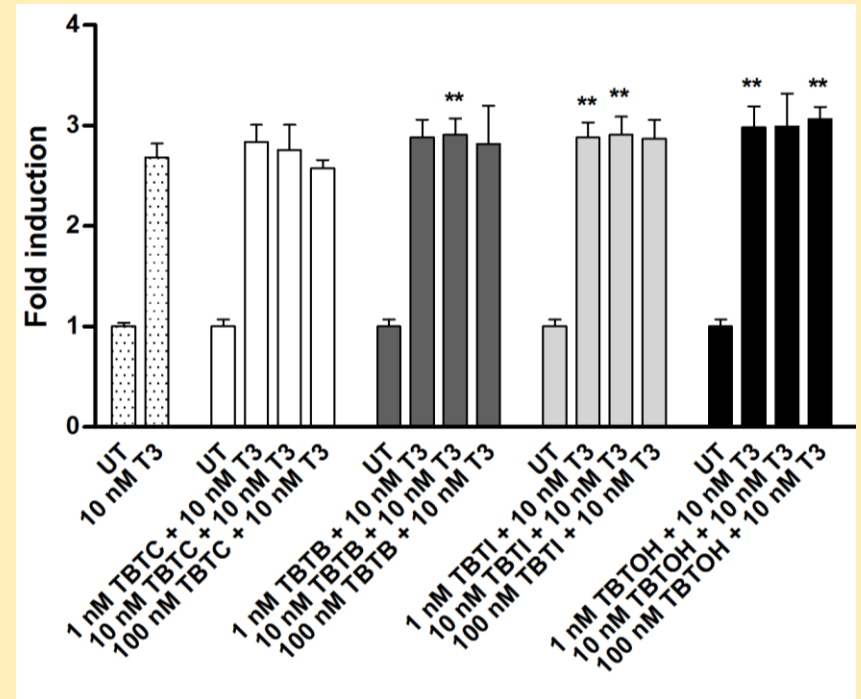
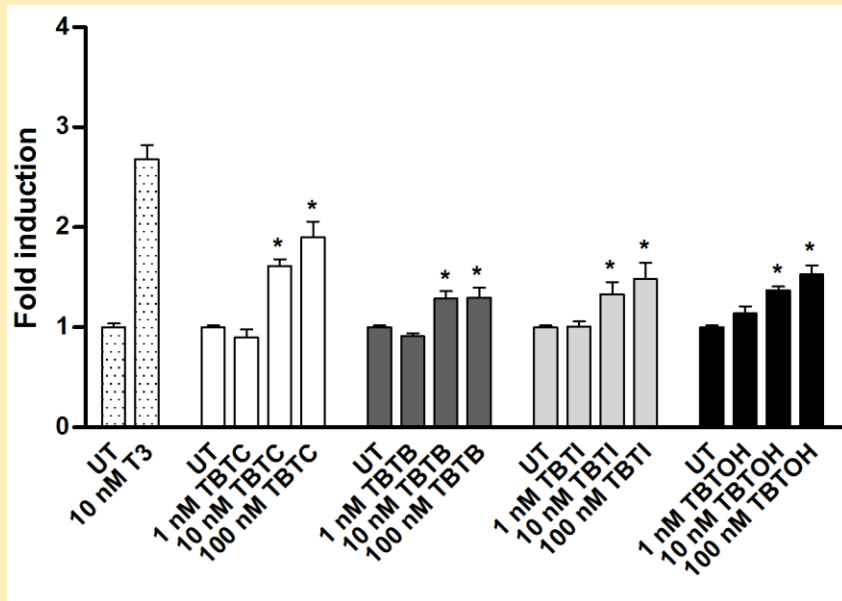
SKUPINA II - deriváty trifenylocínu

(TPTC, TPTH, TPTOH)



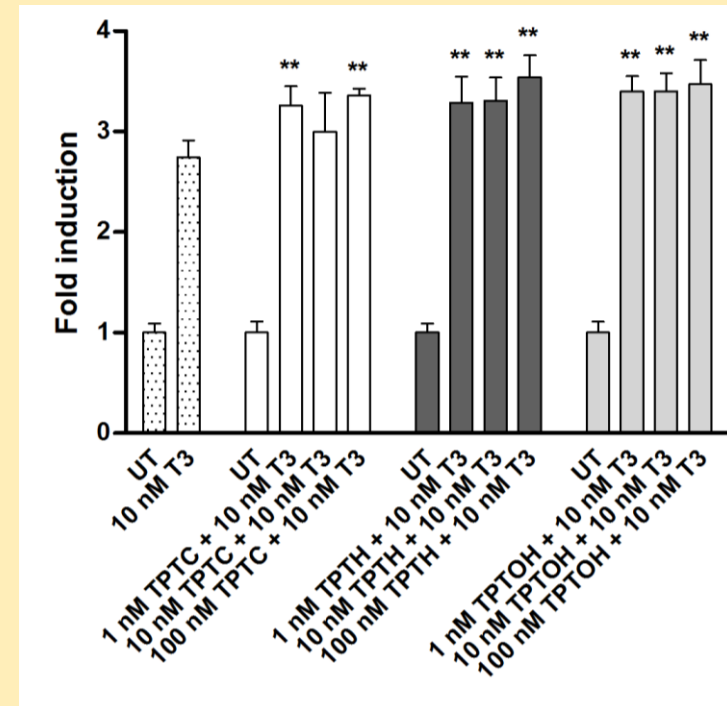
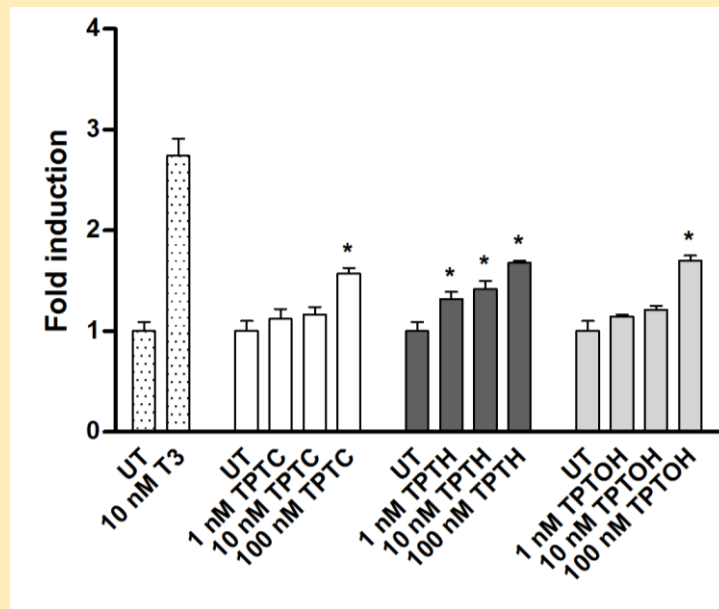
VPLYV ORGANICKÝCH ZLÚČENÍN CÍNU NA TRANSKRIPČNÚ AKTIVITU TYROIDNÉHO RECEPTORU

SKUPINA I - deriváty tributylcínu



VPLYV ORGANICKÝCH ZLÚČENÍN CÍNU NA TRANSKRIPČNÚ AKTIVITU TYROIDNÉHO RECEPTORU

SKUPINA II - deriváty trifenylocínu



ZÁVER

- vyvinuli a charakterizovali sme novú, stabilne transfekovanú reportérovú líniu PZ-TR – vysoká senzitivita, špecificita, možnosť súčasne prevádzať množstvo experimentov, dobrá reproducibilita výsledkov
- exkluzívne ľudský systém derivovaný z ľudských HepG2 buniek endogénne exprimujúcich obe izoformy TR
- nie je potreba dodatočne kotransfekovať TR expresný vektor – zachovanie stochiometrického pomeru medzi TR receptorom a ostatnými transkripčnými regulátormi
- deriváty organických zlúčenín cínu majú schopnosť interferovať s reguláciou génovej expresie sprostredkovanej TR – vplyv na fyziologickú aktivitu TH
- PZ-TR – potenciálny nástroj na preklinické testovanie liečiv a „screening“ prírodných a syntetických disruptorov TH