



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

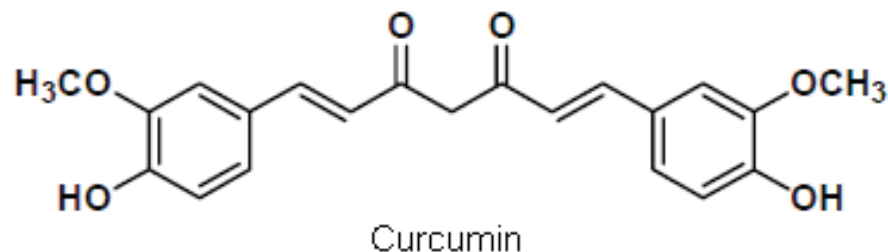
Modulation of the cytotoxic effects of synthetic analog of curcumin EF-24 by thiols

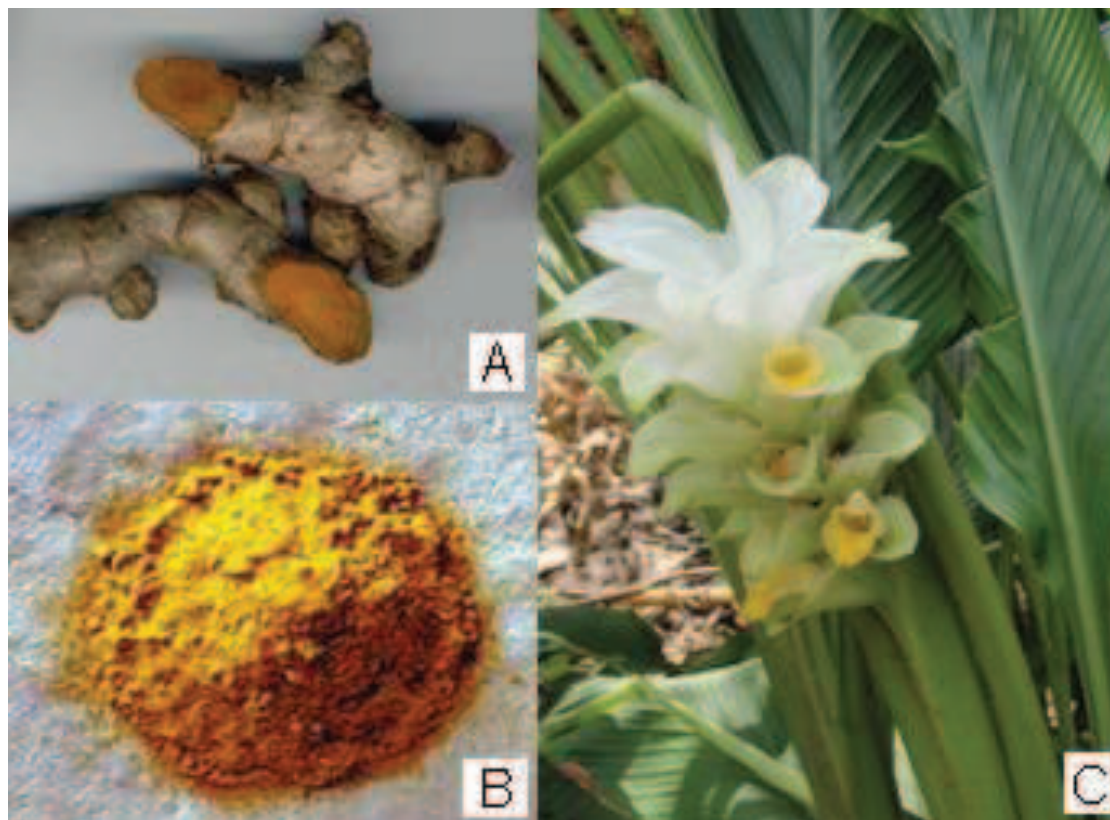
Nikola Skoupá

Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí OPVK
(CZ.1.07/2.2.00/28.0032)

Curcumin

- [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione]
- can be isolated from the rhizomes of *Curcuma Longa*
- various positive effects on the human body
- negative properties of curcumin: poor bioavailability in the body → begun to explore how its efficacy in the body to increase → formation of structural analogues of curcumin



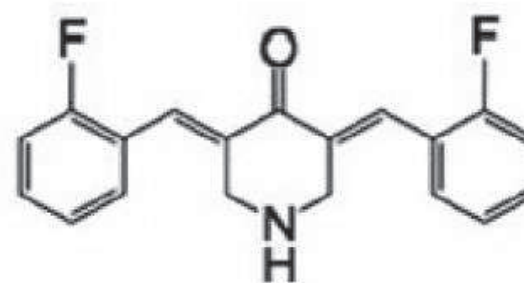


A- rhizomes of *Curcuma Longa*; B- the powder obtained after grinding the dried rhizomes, C- *Curcuma Longa*

Basnet et Skalko-Basnet, 2011; <http://www.inriodulce.com/links/Turmeric.html>

EF-24

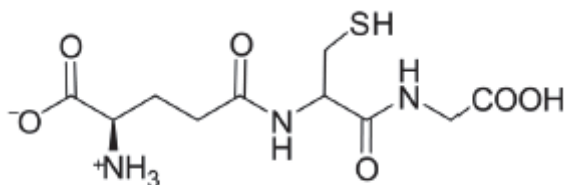
- 3,5–bis(2–fluorobenzyliden)piperidin–4–on
- Very positive results in the treatment of cancer



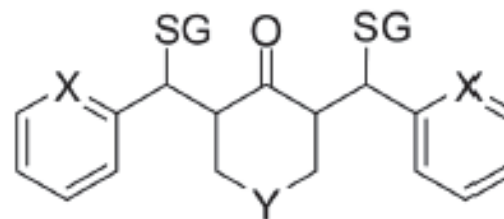
EF24

AIMS

- conjugate EF-24 with glutathione or N-acetylcysteine and study the effect on cells of CML (K562)

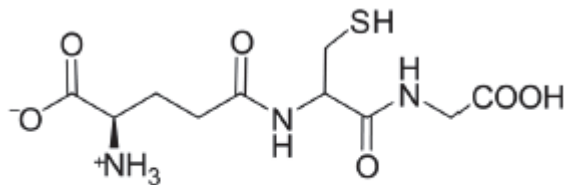


Glutathione (GSH)

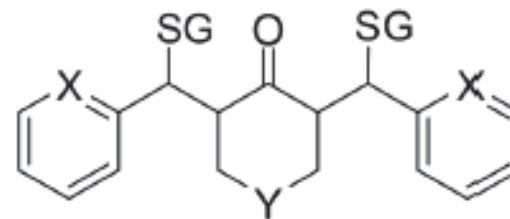


Why?

- EF24 is Michael's acceptor
- The adduct has the same cytotoxic effect as EF24?



Glutathione (GSH)





MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Methods

- MTT assay
- Flow cytometer
- Fluorescence microscop
- Spectrophotometer
- MS



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Sources

- Otori, H., Yamakoshi, H., Tomizawa, M., Shibuya, M., Kakudo, Y., Takahashi, A., Takahashi, S., Kato, S., Suzuki, T., Ishioka, C., Iwabuchi, Y., Shibata, H. (2006): Synthesis and biological analysis of new curcumin analogues bearing an enhanced potential for the medicinal treatment of cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* (5): 2563–2571
- Suna, A., Lub, Y. J., Hua, H., Shojib, M., Liotta, Snyderb, D. C. (2009): Curcumin analog cytotoxicity against breast cancer cells: Exploitation of a redox-dependent mechanism. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (19): 6627-6631
- Basnet, P., Skalko-Basnet, N. (2011): Curcumin: An Anti-Inflammatory Molecule from a Curry Spice on the Path to Cancer Treatment. *Molecules* (16): 4567–4598
- Liu, H., Liang, Y., Wang, L., Tian, L., Song, R., Han, T., Pan, S., Liu, L. (2012): *In vivo* and *in vitro* suppression of hepatocellular carcinoma by EF24, a curcumin analog. *Public Library of Science One* (7): e48075
- Dyson, H. J., Komives, E. A. (2012): Role of disorder in I κ B–NF κ B interaction. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (64): 499–505
- <http://www.inriodulce.com/links/Turmeric.html>



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ



Thank you for your attention!



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Searching for polymorphisms and mutations in Parkinson's disease patients using massive parallel sequencing

Kristýna Kolaříková

Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí OPVK
(CZ.1.07/2.2.00/28.0032)



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Parkinson's disease

- the second most common neurodegenerative disorder
- cause is unknown, but it's supposed role of genetics predispositions together with environmental agents which could be involved in mitochondrial dysfunction, oxidative stress, failure of protein degradation machinery



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Pathologic features

- selektive loss of dopamine neurons in substantia nigra
- presence of ubiquitinated protein deposits in the cytoplasm of neurons (Lewy bodies)
- depletion of dopamine initiates aberrant motor activities (rest tremor, rigidity, instability and mask face)



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Therapy

- Aim of therapy is keep the necessary amount of dopamine in brain by inhibiting enzymes which degrade dopamine (inhibitors of MAO)



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

- cooperation with the Neurological Clinic FN
- patients live in subregion near the White Carpathians, because there is high frequency of PD



Aims of study

- MPS of patient's DNA and control samples in genes associated with parkinsonism



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ



Zdroj: commons.wikimedia.org



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

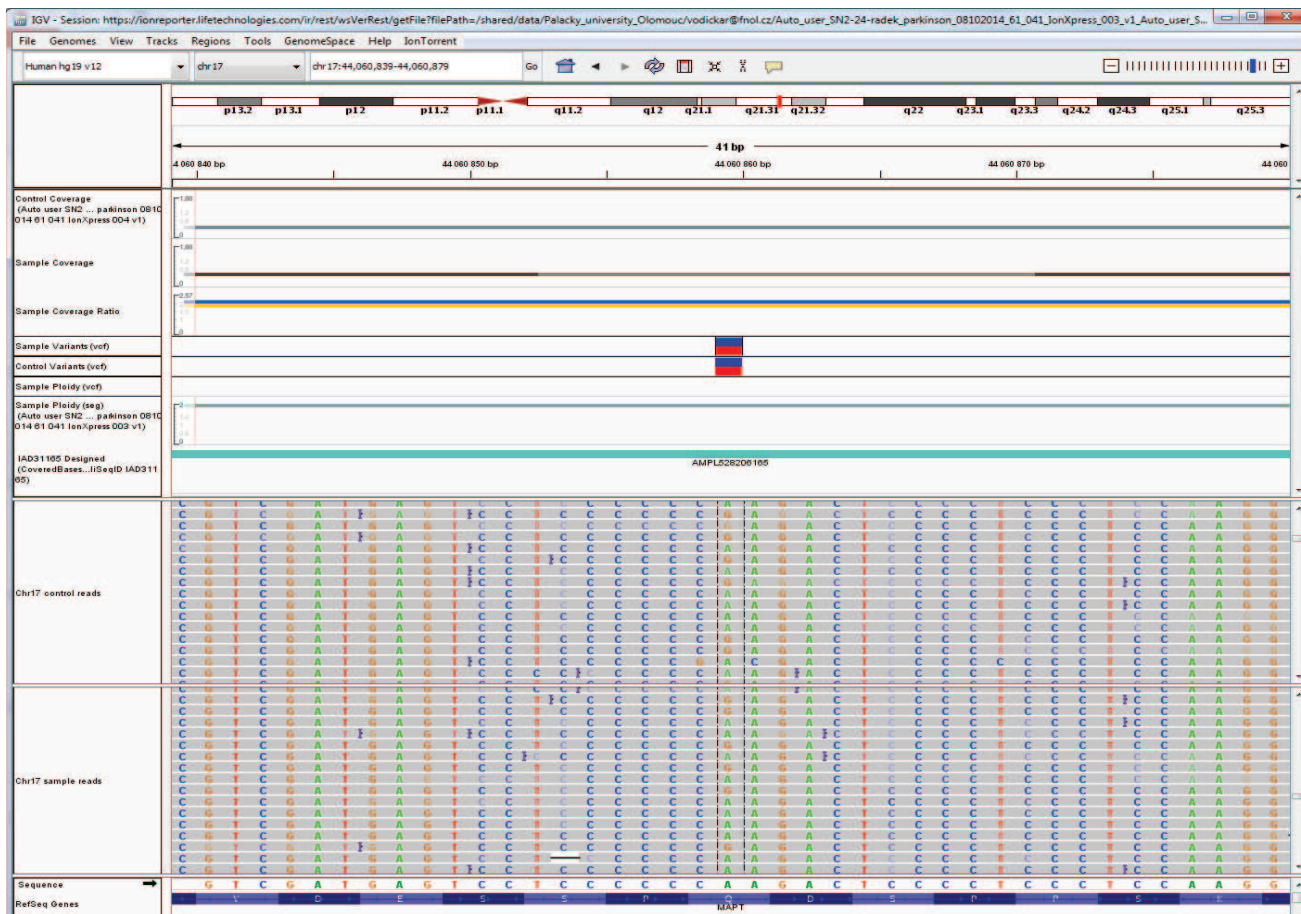
INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

- evaluation in two systems: Ion Reporter and Next Gene
- they are important for filtering and clipping errors
- annotation of our findings with clinic data in Illumina Variant Studio

Gene	Variant	Chr	Coordinate	Variant Length	Type	Genotype	Exonic	Filters	Quality	GIQ	Alternate Alleles	Inherited From	Alt Variant Freq	Read Depth
DDX13L3	C>T/A	3	13302	1	snv	het	yes	OffTarget	191	33	2			300
DDX13L3	CAG>CAAG/C	3	13656	2	deletion	het	yes	OffTarget	528	87	1			84.61
DDX13L3	C>C/A	3	13896	1	snv	het	yes	LowGQ;No...	1	0	1			50
WASHBP	C>G/T	2	14653	1	snv	het	yes	OffTarget	129	91	1			88.06
WASHBP	G>G/C	1	14679	1	snv	het	yes	LowGQ;Of...	2	0	1			25
WASHBP	G>G/A	1	14677	1	snv	het	yes	OffTarget	126	126	1			36.73
WASHBP	A>A/C	3	16948	1	snv	het	yes	OffTarget	159	159	1			38.14
WASHBP	G>G/T	2	16957	1	snv	het	yes	LowGQ;Of...	0	0	1			20.56
WASHBP	G>G/A	1	17020	1	snv	het	yes	LowGQ;Of...	15	15	1			24.04
WASHBP	G>G/A	1	17385	1	snv	het	yes	LowGQ;Of...	16	16	1			23.73
WASHBP	T>T/G	3	24871	1	snv	het	yes	LowGQ;Of...	0	0	1			300
WASHBP	T>T/G	3	24895	1	snv	het	yes	LowGQ;No...	2	0	1			300
WASHBP	T>T/G	3	24899	1	snv	het	yes	LowGQ;No...	2	0	1			300
OR4F5	T>T/A	1	69821	1	snv	het	yes	LowGQX	0	0	1			20
LRN00113	G>A/A	1	762273	1	snv	het	yes	PkIS	509	114	2			300
LRN00113	T>T/A	1	762546	1	snv	het	yes	LowGQX	0	0	1			20
LRN00113	T>A/A	1	762632	1	snv	het	yes	LowGQ;No...	57	10	3			300
FAM43C	A>A/T	1	882443	1	snv	het	yes	LowGQ;No...	2	0	1			300
FAM43C	A>A/T	1	889877	1	snv	het	yes	LowGQ;Of...	0	0	1			33.33
FAM43C	A>A/T	1	889907	1	snv	het	yes	LowGQ;Of...	0	0	1			33.33
SAMD11	A>A/T	1	874826	1	snv	het	yes	LowGQX	0	0	1			25

Zdroj: <http://www.illumina.com/informatics/research/sequencing-data-analysis-management/basespace/basespace-apps/variantstudio-app.html>

- for control we use IGV (for control of reads, whether there aren't homopolymers, control of coverage)
- specific NM-number in NCBI





evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



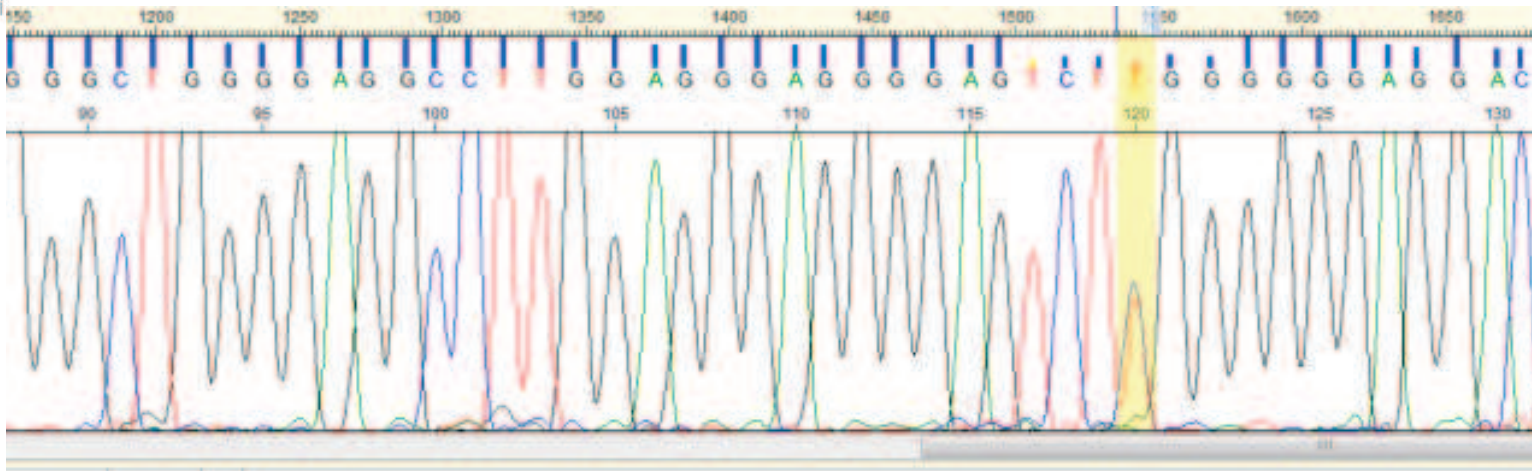
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

- suspect results will be sequenced using Sanger sequencing





MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Thank you for your attention

Resources



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Dauer, W., Przedborski, S. (2003): Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* (39): 889 - 909

Lesage, S., Brice, A. (2009): Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Human molecular genetics* (18): 48 - 59

Jankovic J. (2008): Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* (79): 368 - 376

Fujioka, S., Sundal, C., Uitti, R., J. et al. (2012): Autosomal dominant Parkinson's disease. *Parkinsonism and related disorders* (18): S7 - 10



Exosomal microRNA and mRNA in the lung diseases

Autor: Šustalová Klára

Vedoucí práce: Mgr. Zdenka Navrátilová, Ph.D.

Pracoviště: Ústav patologické fyziologie

Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí OPVK
(CZ.1.07/2.2.00/28.0032)



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

What is ...?

◎ Exosomes

- > Exosomal microRNA
- > Exosomal mRNA

◎ Lung diseases

- > Pulmonary sarcoidosis
- > other ... ?



Exosomes

- small nano-sized (50-150 nm) membrane vesicles
- cell-to-cell communication
- contain mRNAs, microRNAs and other non-coding RNAs and DNA



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

mRNA and microRNA

- mRNA → product of DNA transcription
- microRNA → small (21-24 nt) non-coding RNA molecule



Pulmonary sarcoidosis

- multisystem granulomatous disorder of unknown etiology
- granulomas comprise of epithelioid cells, macrophages, and multinucleated giant cells surrounded by lymphocytes, mast cells, monocytes and fibroblasts



Pulmonary sarcoidosis

- prevalence in Czech Republic
→ over 70/100'000 population
- affects younger and middle aged individuals, more often women than men



Pulmonary sarcoidosis

○ Manifestations:

- > intrathoracic disabilities bilateral hilar lymphadenopathy with and / or pulmonary infiltrates
- > ocular and cutaneous lesions may also be affected by the liver, spleen, lymph nodes, salivary glands, heart, nervous system, muscles and bones, and rarely other organs



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



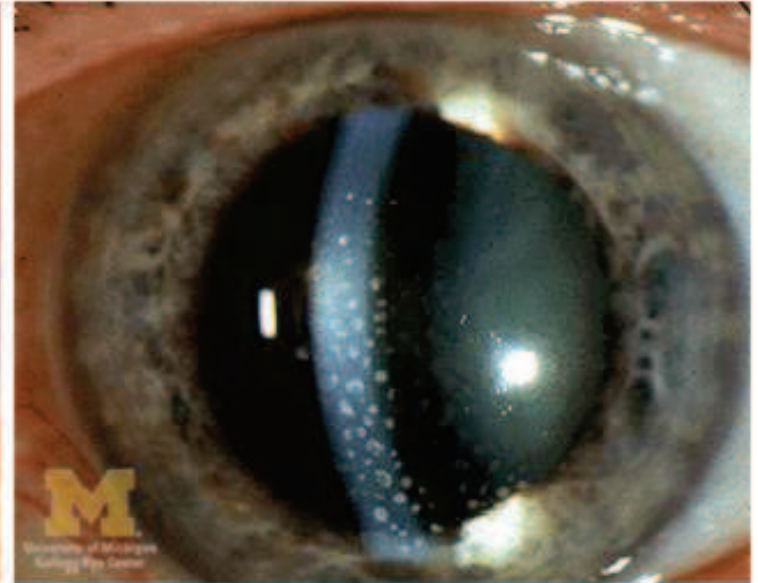
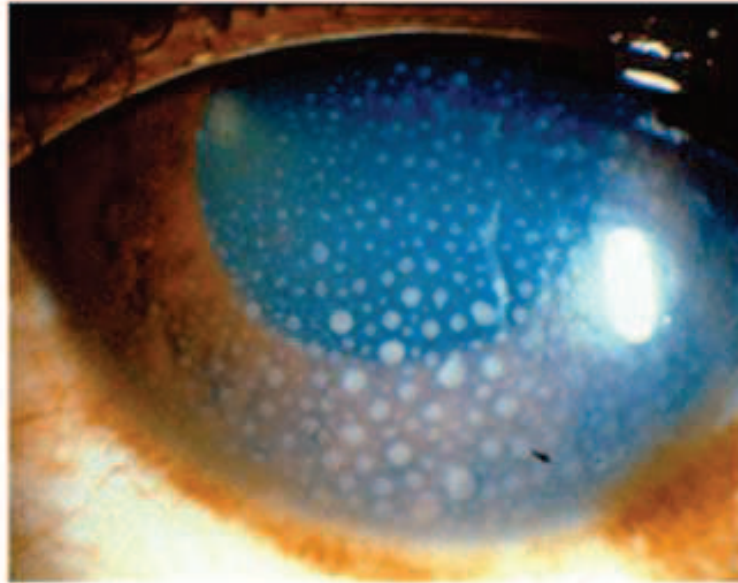
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Pulmonary sarcoidosis



Granulomatous uveitis is the most common ocular condition found in patients with sarcoidosis.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Pulmonary sarcoidosis



Sarcoidosis: multiple lesions on the perioral skin



Sarcoidosis: Posterior neck and upper back



Pulmonary sarcoidosis

○ Diagnosis:

- > certificate of non-caseification granulomas in affected organs
- > identifying typical clinical findings
- > exclusion of all other diagnostic possibilities



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

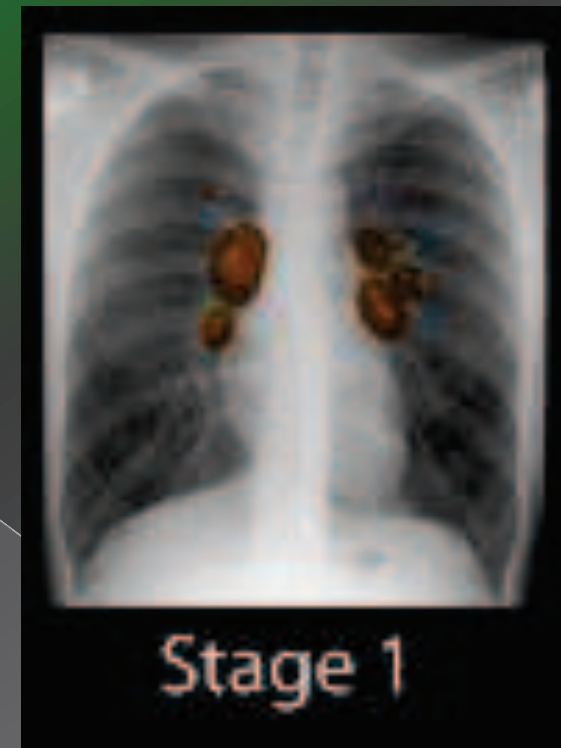
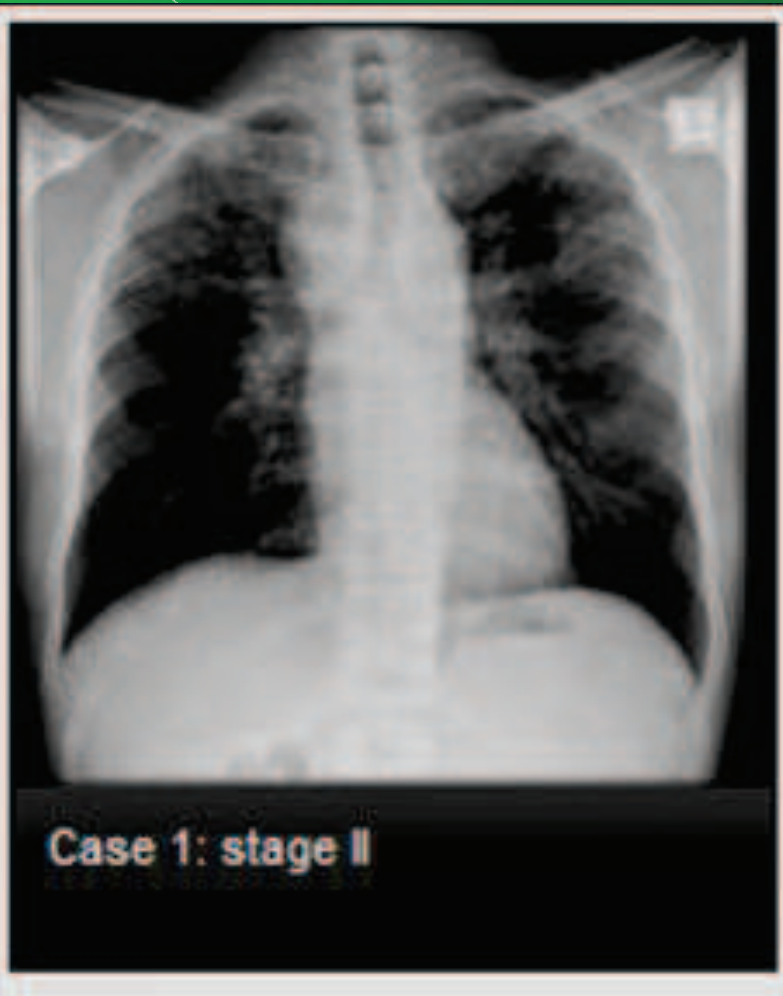


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Pulmonary sarcoidosis

Stage 1: bihilar lymphadenopathy





evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

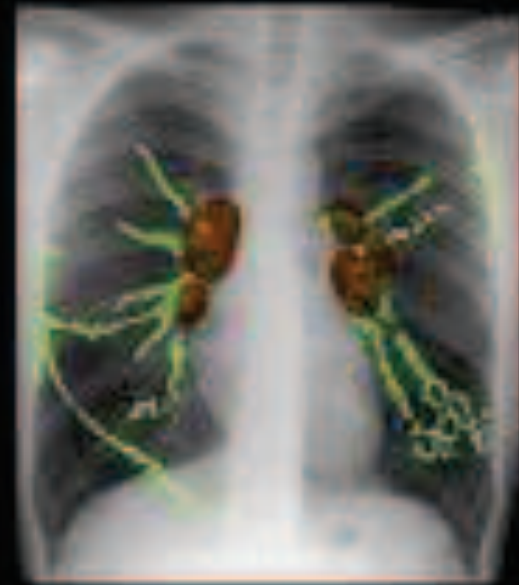
INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Pulmonary sarcoidosis

Stage 2: bihilar lymphadenopathy and
reticulonodular infiltrates



Case 2: stage II



Stage 2



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

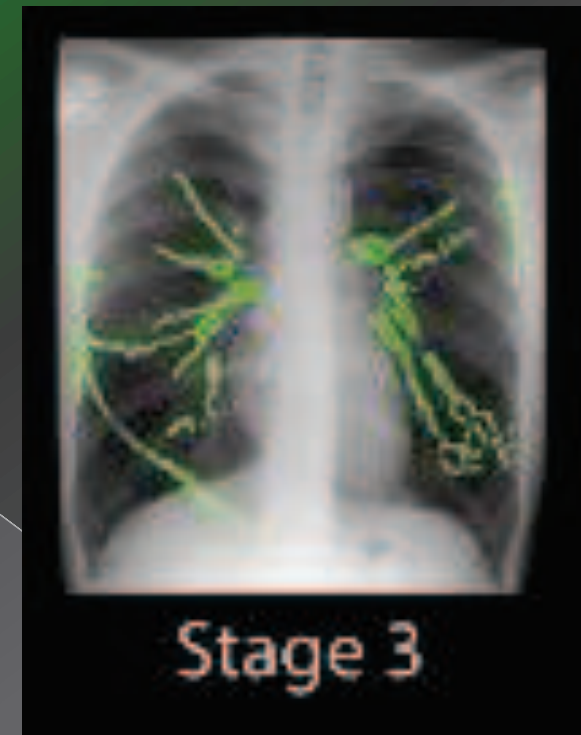
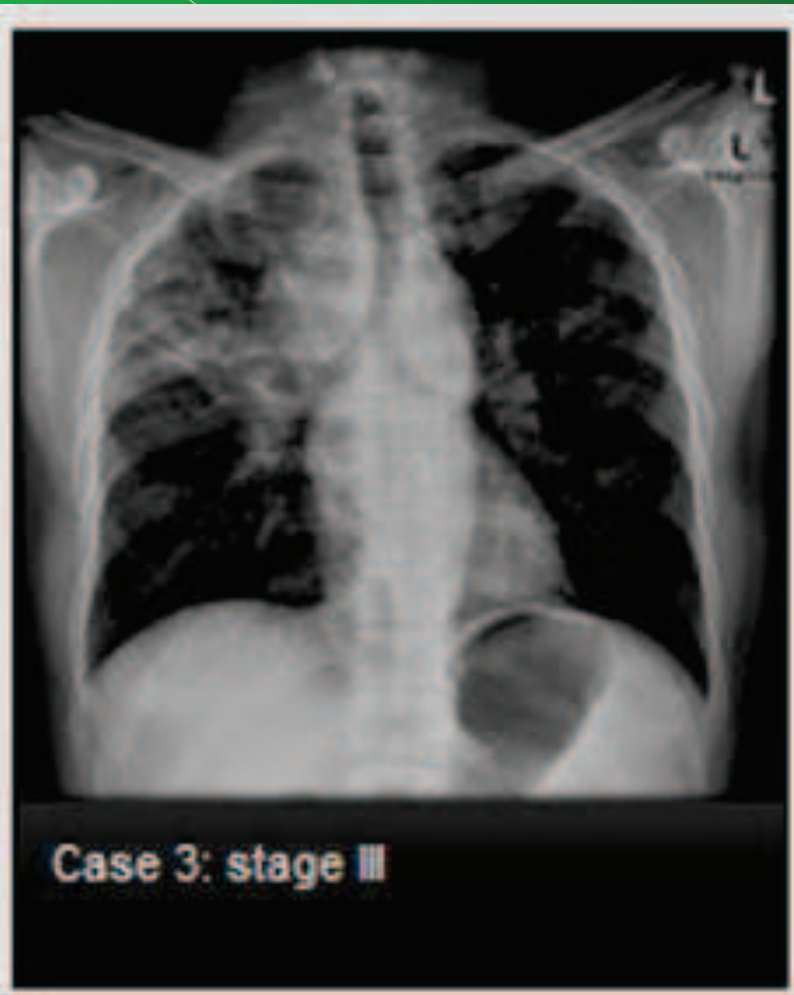


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Pulmonary sarcoidosis

Stage 3: bilateral pulmonary infiltrates





evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

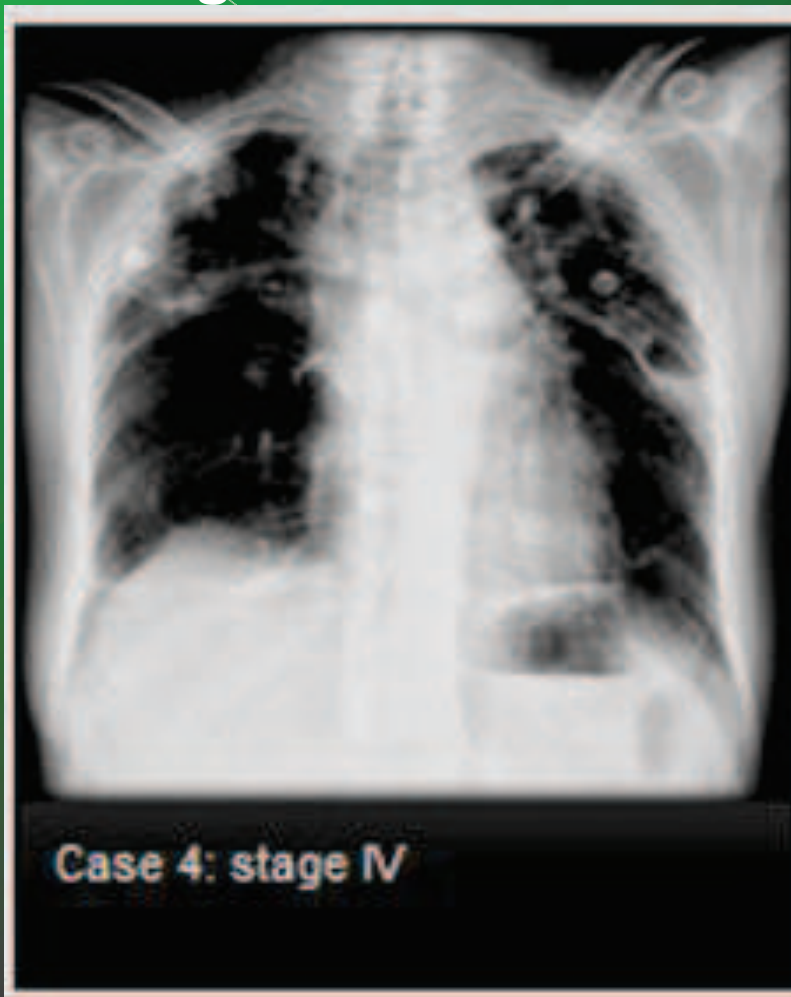


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Pulmonary sarcoidosis

Stage 4: fibrocystic sarcoidosis typically with upward hilar retraction, cystic and bullous changes





evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Thank you for your attention





evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Sources

- Batagov, A. O., Kurochkin, I. V. (2013): Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions. *Biology Direct*.
- Pratap Singh, P., Li, L., Scott Schorey, J. (2015): Exosomal RNA from *Mycobacterium tuberculosis* infected cells is functional in recipient macrophages. *Traffic*.
- Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., Mi, S. (2015): Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*.
- Gregory, R. I., Yan, K-p, Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., Shiekhattar, R. (2004): The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* (432): 235–240



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Sources

- Kishore, A., Petrek, M. (2013): Immunogenetics of Sarcoidosis. International Trends in Immunity (1): 43-53
- Loke, W. S. J., Herbert, C., Thomas, P. S. (2013): Sarcoidosis: Immunopathogenesis and Immunological Markers. International Journal of Chronic Diseases.
- Vladimíra Lošťáková et V.K., Martina Vašáková, Sarkoidóza - doporučený postup diagnostiky, terapie a sledování vývoje onemocnění. Sekce intersticiálních plicních procesů, ČSFP, 2011. 1: p. 1-16.
- en.wikipedia.org



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Biological characterization of potential inhibitors of p21-activated kinases (PAKs)

Supervisor: Mgr. Radek Jorda, Ph.D.

Laboratory of Growth Regulators & Department of Chemical Biology and Genetics

Agáta Kubíčková



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

PAKs

- serine/threonine protein kinases
- oncogenic signalling effects in cells:
 1. acquisition of growth signal autonomy,
 2. evasion of apoptosis
 3. the promotion of invasion and metastasis
- often upregulated in human tumours. Tumour cells are dependent on PAK signalling.
- positively regulate key proliferative signalling pathways: ERK, AKT and WNT



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

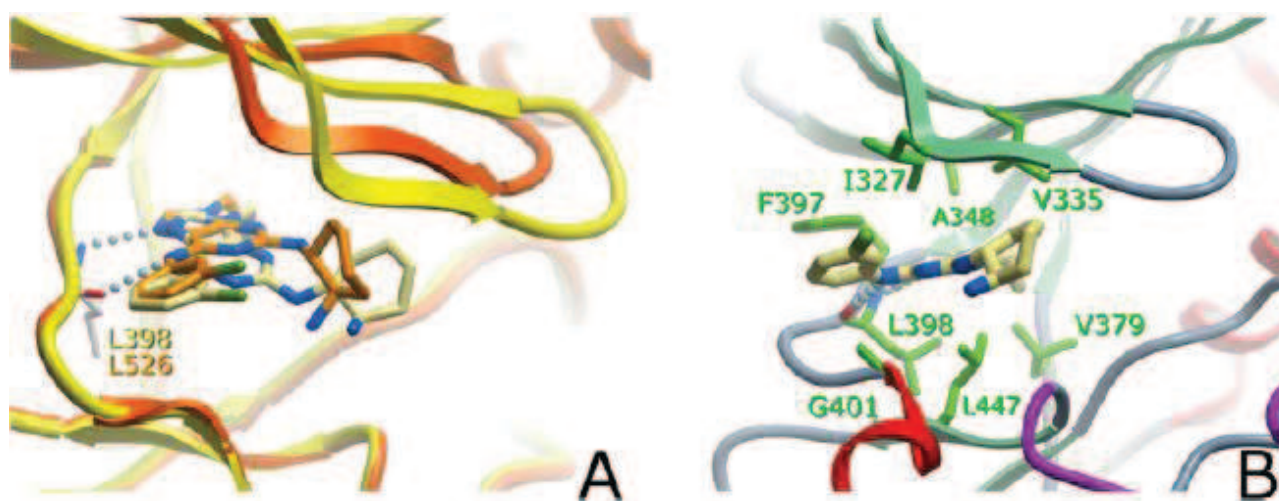
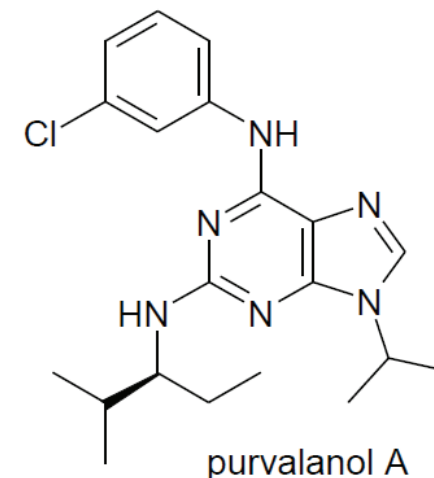
INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

PAKs

- PAK4 is a mediator of filopodia formation and reorganizer of the actin cytoskeleton
- stimulates cell survival by phosphorylating the BCL2 antagonist of cell death BAD + inhibits apoptosis by preventing caspase-8 binding to death domain receptors
- play a role in cell-cycle progression by controlling levels of p21 and by phosphorylating RAN

Biological characterization of potential inhibitors of PAK: VM 129, VM 132, VM 134

- C2-, C6-, N9-trisubstituted purines structurally related to purvalanol A
- ATP-competitors
- small-molecule inhibitors





evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Methods

- Flow cytometry: propidium iodide and bromdeoxyuridin
- Western blotting and immunodetection analysis of changes in expression of :
 - cyklins D, B, A
 - markers of apoptosis
 - function of mitogenic pathways ERK1/2, MEK1/2
 - levels of PAK4, 5, 6 expression in cell line MCF7
 - comparisons of levels of expression of PAK4, 5, 6 in pancreatic cell lines PANC-1, CFPAC, BxPC3, AsPC1.
- Cytotoxicity assays performed on 8 cell lines, which are derived from different types of tissues.
- Migration assay



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

What types of cancers might benefit from PAK inhibitors?

- Breast, ovarian, pancreatic cancer and most colon cancers.
- PAK inhibitors will prove to be most useful in combination with other targeted drugs.



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Resources:

- Radu, M., Semenova, G., Kosoff, R., Chernoff J. (2014): Pak Signaling in the Development and Progression of Cancer. *Nat Rev Cancer*. 14(1): 1325.
- Staben, S.T., Feng, J.A., Lyle, K. (2014): Back pocket flexibility provides group II p21-activated kinase (PAK) selectivity for type I 1/2 kinase inhibitors. *J Med Chem*. 57(3):1033-1045.
- Tyagi, N., Bhardwaj, A., Singh, A.P. (2014): p-21 activated kinase 4 promotes proliferation and survival of pancreatic cancer cells through AKT- and ERK-dependent activation of NF-kB pathway. *Oncotarget*. 5(18):8778-8789.



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Thank you for your attention.