



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Stabilisation of PCR reagents for storing at room temperature

Hana Crlíková

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

Main aims

- Suitable mixtures
- Tablets
- Stabilisation of reagents



**OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Substances used

- Pullulan - polysacharide
- Trehalose - disacharide
- Xanthan - polysacharide



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

procedure

- Dissolving of substances
- Dilution series
- RT PCR
- Drying of pullulan, xanthan, trehalose
- Combination of pullulan, xanthan, trehalose



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

sources

- Zagon, Jutta, et al. (2012): "Preservation of primer and probes on "ready-to-use" 96-well microtiter plates: A step forward towards enhancing throughput and harmonization of real-time PCR applications in food and feed control." Food Control 25.2: 709- 716.
- JahanshahiAnbuhi, Sana, et al. (2014): "Pullulan Encapsulation of Labile Biomolecules to Give Stable Bioassay Tablets." Angewandte Chemie International Edition 53(24):6155-8.



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

- Rombach, Markus, et al. (2014):
"Benchmarks. Real-time stability testing of air-dried primer and fluorogenic hydrolysis probes stabilized by trehalose and xathan"
BioTechniques 57: 151-155.



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

Identification of protein factors specifically binding to the p16 promoter region under replication stress conditions

Martin Liptay

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

Replication stress?

= alterations of the dynamics of the DNA replication
(slow, inefficient)



Genome instability



DNA damage



Oncogenic transformation



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Senescence?

- irreversible growth arrest, morphology of the cells is changed (flat, enlarged shapes), cells become resistant to apoptosis
- Program triggered by a variety of stresses, including DNA damage, telomere erosion, oncogenic activation...
- Triggered through the activation of expression of cdk inhibitors like p16 and p21
- Normal physiological process, important tumor suppressor mechanism!



**OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

p16

- Cdk4/6 inhibitor, tumor suppressor activity
- Cellular senescence



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Hyperproliferation



Replication stress



p16 expression



Senescence

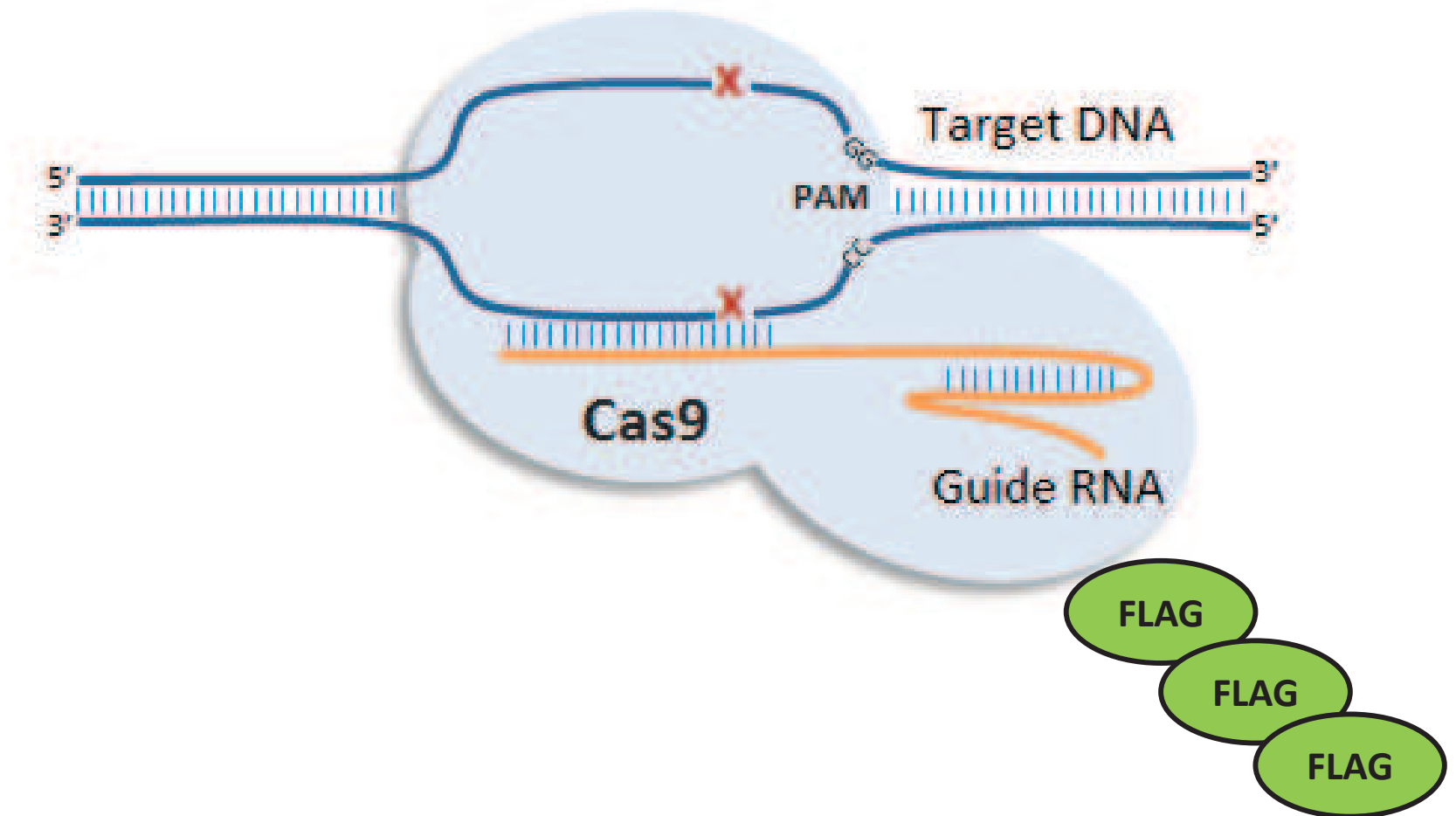


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

enCHIP

- ENgineered DNA-binding molecule-mediated CHromatin ImunoPrecipitation
- For purification of specific genomic regions using engineered DNA-binding molecule – FLAG tagged TALE protein, catalytically inactive CRISPR/Cas9; retains molecular interactions *in vivo*





MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

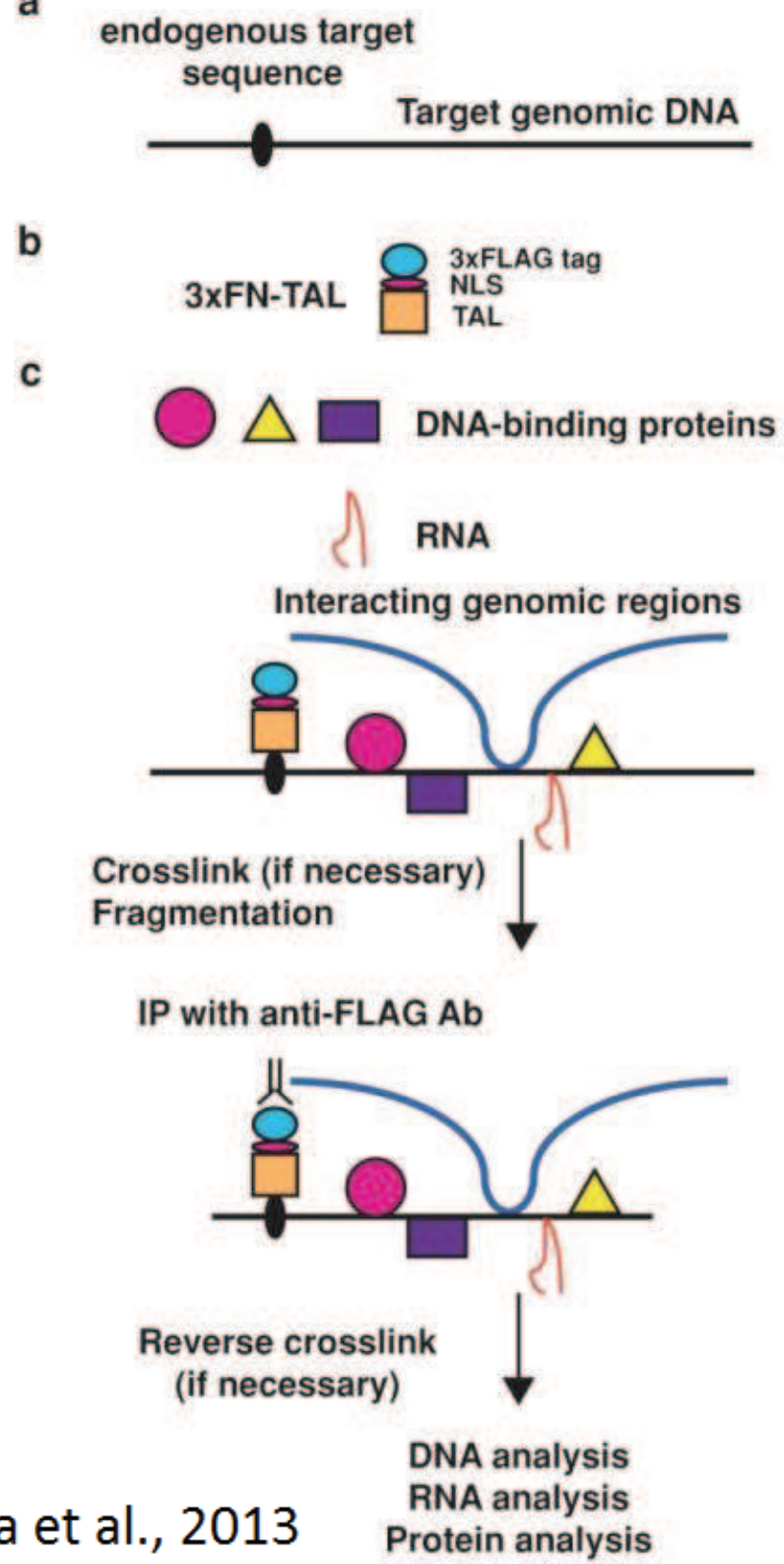
- Flag tagged CRISPR/Cas9
specific to p16 promoter

- Crosslinking (keeps complex
together)

- Fragmentation of DNA by
sonication

- Immunoprecipitation

- Identification of promoter
associated molecules via MS





evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Sources

- Kong Y, Cui H, Ramkumar C, Zhang H. Regulation of Senescence in Cancer and Aging. *Journal of Aging Research*. 2011;2011:963172. doi:10.4061/2011/963172.
- Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International Journal of Cancer*. *Journal International du Cancer* 2012;130(8):1715-1725. doi:10.1002/ijc.27316.
- Fujita T, Asano Y, Ohtsuka J, Takada Y, Saito K, Ohkiet R, Fujii H. Identification of telomere-associated molecules by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP). *Sci. Rep.* **3**. 2013



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

The analysis of NOD2/CARD15 polymorphisms in patients with acute myocardial infarction

**Department of Pathological Physiology,
Laboratory of cardiogenomic**

**Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University
and University Hospital Olomouc**

Karolína Světlíková



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

What is it ...?

- **NOD2** (nucleotide-binding-oligomerization domain-2) - structure responsible for microbial sensing
- **CARD15** (caspase activation recruitment domain family-15) – the gene coding for NOD2 protein
- **NOD2/CARD15** - gene involved in the innate immune response and inflammation



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

- **Accute myocardial infarction (AMI)** - heart attack → the patient directly life-threatening → rupture of an atherosclerotic plaque
- Inflammation and immune response → an important role in the pathogenesis of atherosclerosis



INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Aims of the practical part of the thesis:

- **Genotyping** of SNPs (TNF-308, R702W, G908R, 1007 Ins C) of NOD2/CARD15 gene
- **Verify of genetic association** of the SNPs with increased risk of the AMI in the patients
- **Statistical evaluation** of allelic and genotypic frequencies in the patients + analysis of the Hardy-Weinberg equilibrium



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Methods:

- **Microisolation of DNA** from peripheral blood of patients
- **PCR reactions**
 - Preamplification
 - SAP reaction
 - iPLEX reaction
- Preparation of the **microarray**
- **Mass spectrometry** (MassArray analysis)





evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ



Figure 1: MassARRAY nanodispenser and Compact MALDI-TOF Mass Spectrometer



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

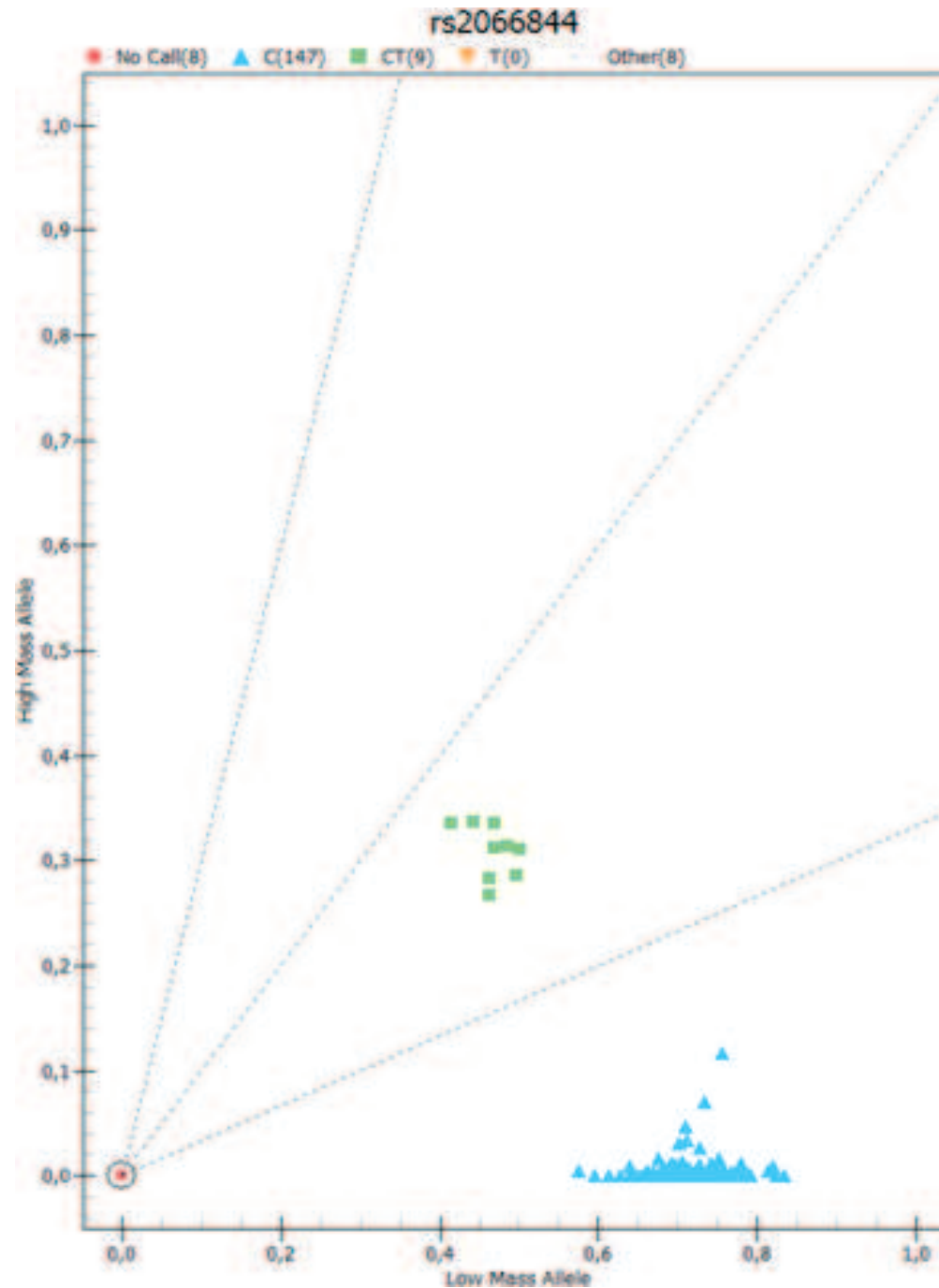


Figure 2: Diagram of the genotypes for rs2066844



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Sources

<http://galleryhip.com/blood-test-tubes.html>

www.sequenom.com

www.relax.lidovky.cz

Liu, H.Q., Zhang, X.Y., Edfeldt, K., Nijhuis, M.O., Idborg, H., Bäck, M., Roy, J., Hedin, U., Jakobsson, P.J., Laman, J.D., de Kleijn, D.P., Pasterkamp, G., Hansson, G.K., Yan, Z.Q. (2013): NOD2-Mediated Innate Immune Signaling Regulates the Eicosanoids in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*; 33: 2193-2201

Yazdanyar, S., Nordestgaard, B.G. (2010): NOD2/CARD15 genotype, cardiovascular disease and cancer in 43 600 individuals from the general population. *Journal of Internal Medicine*; 268: 162-170



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!





**OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Typing of systemic amyloidosis by mass spectrometry-based proteomics

Lucie Broskevičová

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

Typing of systemic amyloidosis ..

- from paraffin embedded tissue using laser microdissection (LMD) and mass spectrometric-based proteomic analysis
- determination of the minimum amount of deposits of amyloidogenic tissue
- from adipose tissue using MS-based proteomics



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Amyloidosis

- a rare group of diseases characterized by deposition of abnormal (misfolded) proteins in various tissues of the body
- more than 28 types of amyloid
- localized and systemic
- systemic amyloidosis affect more than one organ or tissue

Type	Fibril Protein	Main Clinical Settings
Systemic	Immunoglobulin light chains	Plasma cell disorders
	Transthyretin	Familial amyloidosis, senile cardiac amyloidosis
	A amyloidosis	Inflammation-associated amyloidosis, familial Mediterranean fever
	Beta2 -microglobulin	Dialysis-associated amyloidosis
	Immunoglobulin heavy chains	Systemic amyloidosis
Hereditary	Fibrinogen alpha chain	Familial systemic amyloidosis
	Apolipoprotein A1	Familial systemic amyloidosis
	Apolipoprotein AII	Familial systemic amyloidosis
	Lysozyme	Familial systemic amyloidosis
Central nervous system	Beta protein precursor	Alzheimer syndrome, Down syndrome, hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch)
	Prion protein	Creutzfeldt-Jakob disease, Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease, fatal familial insomnia, kuru
	Cystatin C	Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Icelandic)
	ABri precursor protein	Familial dementia (British)
	ADan precursor protein	Familial dementia (Danish)

Figure 3: The major types of human amyloid
(taken from <http://emedicine.medscape.com/article/335414-overview#aw2aab6b2>).



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

- treatments are available for many types but they are type specific
- typing of amyloid is essential before starting treatment

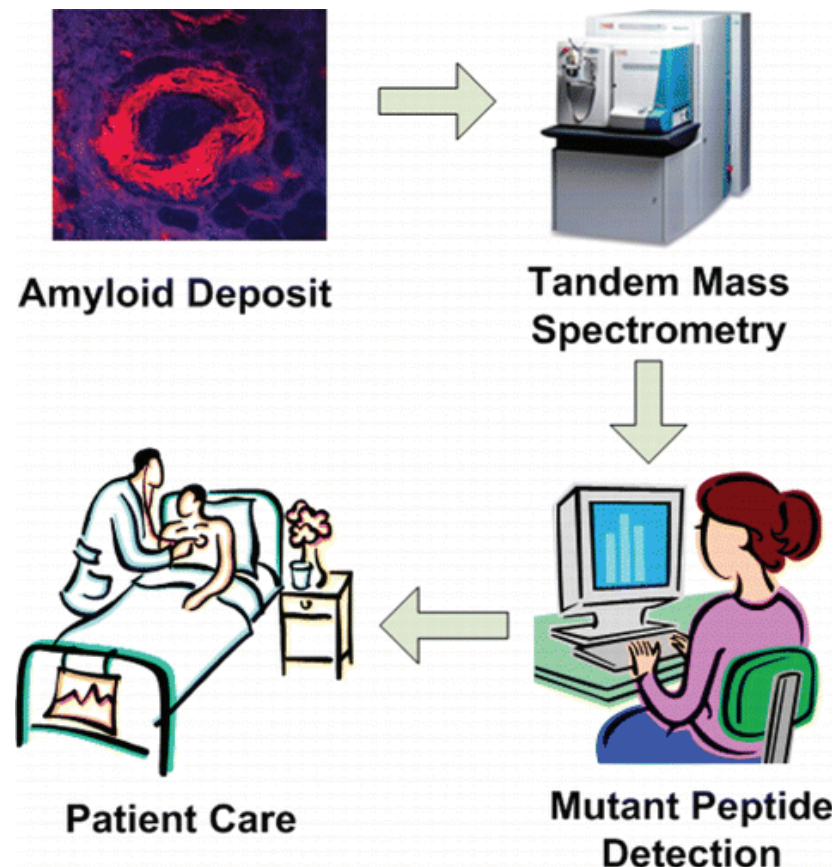


Figure 2: Detection workflow (taken from Dasari *et al*, 2014).



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Method

- Congo Red staining of paraffin-embedded tissue biopsy
- Congo red-positive areas are dissected by laser microdissection
- trypsin digestion
- LC-MS analysis
- identification proteins that form the amyloid



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

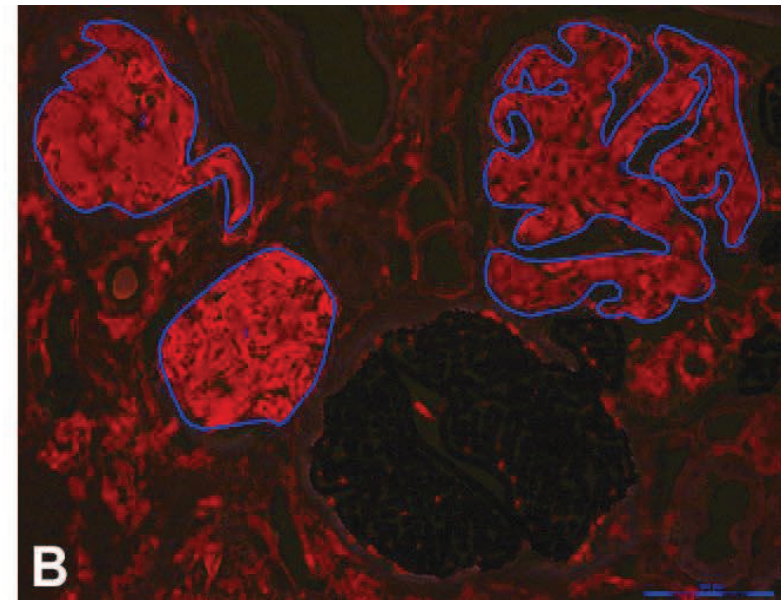
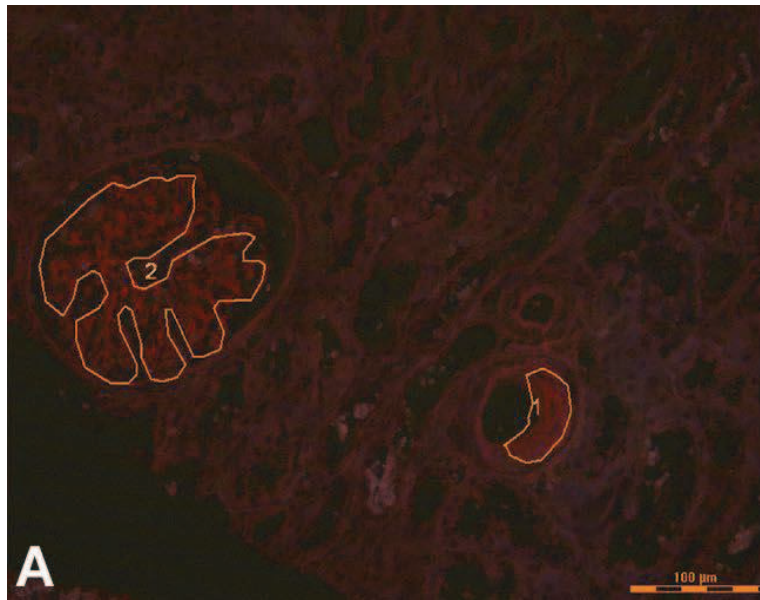


Figure 3: Laser microdissection. Congo red positive (taken from Leung *et al*, 2012).



INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Sources

Dasari, S., Theis, J. D., Vrana, J. A., Zenka, R. M., Zimmermann, M. T., Kocher, J. P. A., Dogan, A. (2014): Clinical proteome informatics workbench detects pathogenic mutations in hereditary amyloidoses. *Journal of proteome research* 13(5): 2352-2358.

Leung, N., Nasr, S. H., Sethi, S. (2012): How I treat amyloidosis: the importance of accurate diagnosis and amyloid typing. *Blood* 120(16): 3206-3213.

www.medscape.com



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Thank you for your attention