

OBSAH

1 ÚVOD	<i>J. Stulík</i>	7
2 METODY MOLEKULÁRNÍ PATOLOGIE		9
2.1 Genomika	<i>P. Pallová</i>	9
2.1.1 Izolace nukleových kyselin		9
2.1.1.1 Izolace DNA		9
2.1.1.2 Izolace RNA		9
2.1.2 Restrikce DNA		10
2.1.3 Reverzní transkripce (RT)		11
2.1.4 Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain reaction, PCR)		11
2.1.4.1 Nested PCR		13
2.1.4.2 Asymetrická PCR		13
2.1.4.3 Multiplex PCR		13
2.1.4.4 Kvantitativní PCR v reálném čase (Real-time PCR)		13
2.1.5 Klonování DNA		16
2.1.6 Elektroforetické dělení nukleových kyselin		20
2.1.7 Hybridizační metody		21
2.1.7.1 Southernova transferová hybridizace (Southern blot)		21
2.1.7.2 <i>In situ</i> hybridizace		22
2.1.8 Sekvenování DNA		22
2.1.9 DNA čipy (DNA microarray)		24
2.2 Proteom a proteomická analýza	<i>J. Lenčo, L. Hernychová</i>	26
2.2.1 Hmotnostní spektrometrie		26
2.2.1.1 Popis hmotnostního spektrometru		28
2.2.1.1.1 Vstupní systémy		28
2.2.1.1.2 Iontové zdroje		28
2.2.1.1.3 Hmotnostní analyzátoři		32
2.2.2 Klasický proteomický přístup		37
2.2.2.1 Dvojměrná gelová elektroforéza (2D-PAGE)		37
2.2.2.2 Hmotnostně spektrometrické identifikační techniky následující po 2D-PAGE		39
2.2.3 „Shotgun“ proteomika		41
2.2.3.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie		41
2.2.3.2 Tandemová hmotnostní spektrometrie		42
2.2.3.3 Kvantifikační techniky pro „shotgun“ proteomiku		44
2.2.4 Jiné proteomické přístupy		46
2.2.4.1 „Top-down“ proteomika		46
2.2.4.2 Měření MS profilů směsí proteinů		47
2.3 Bioinformatika	<i>M. Hubálek, M. Brychta</i>	48
2.3.1 Sekvence DNA a proteinů		48
2.3.2 Biologické databáze		49
2.3.2.1 Primární nukleotidové databáze		50
2.3.2.2 Primární proteinové databáze		51
2.3.2.2.1 Složené proteinové databáze		51
2.3.2.3 Sekundární proteinové databáze		52
2.3.2.4 Terciární proteinové databáze		54
2.3.2.5 Databáze klasifikace proteinových struktur		54
2.3.3 Sekvenční porovnávání a vyhledávání podobnosti		55
2.3.4 Predikční programy		59
2.4 Fenotypizace živých systémů	<i>Z. Kročová</i>	61
2.4.1 Mikroskopické metody		62
2.4.2 Western blot		64
2.4.3 Průtoková cytometrie		64
2.4.3.1 Monitorování povrchových znaků		65
2.4.3.2 Průkazy bakterií, virů a parazitů		66
2.4.3.3 Monitorování intracelulárních znaků		67

2.4.3.3.1	Stanovení intracelulárních cytokinů		67
2.4.3.3.2	Cytometrická DNA analýza buněčného cyklu		67
2.4.3.4	Funkční testy		68
2.4.3.4.1	Buněčná smrt		68
2.4.3.4.2	Test blastické transformace		69
2.4.3.4.3	Cytotoxická aktivita NK-buněk		69
2.4.3.4.4	Metoda ADCC		69
2.4.3.4.5	Stanovení intracelulárního vápníku		69
2.4.3.4.6	Měření fagozomálního pH.		69
2.4.3.4.7	Měření membránového potenciálu		70
2.4.3.4.8	Oxidativní vzplanutí		70
2.4.3.4.9	Fagocytární aktivita		70
2.5	Histologické metody molekulární patologie	J. Österreicher	71
2.5.1	Imunohistochemie		71
2.5.2	In situ hybridizace		73
2.5.3	In situ PCR		73
2.5.4	Vyhodnocení histologické detekce		74
3	APLIKACE		75
3.1	Účinek léčiv na molekulární úrovni	L. Červený	75
3.1.1	Rozdělení mechanismů účinku léčiv podle specifity		75
3.1.2	Rozdělení recipienčních cílových struktur:		75
3.1.2.1	Interakce léčiva s receptorem		76
3.1.2.2	Typy receptorů		78
3.1.2.2.1	Typ 1: Receptory spážené s iontovými kanály (ionotropní receptory)		79
3.1.2.2.2	Typ 2: Receptory napojené na intracelulární efektorový systém prostřednictvím G-proteinu (metabotropní receptory)		80
3.1.2.2.3	Typ 3: Receptory s proteinkinázovou aktivitou		83
3.1.2.2.4	Typ 4: Nukleární receptory		85
3.1.2.3	Iontové kanály jako recipienční molekuly		86
3.2	Ionizující záření	J. Vávrová	88
3.2.1	Přímý a nepřímý účinek záření		88
3.2.2	Časná odpověď na ozáření		90
3.2.3	Autofosforylace ATM kinasy a zástava buněčného cyklu v klíčových kontrolních bodech		92
3.2.4	Check point kinasy 1 a 2		94
3.2.5	Strážce genomu – protein p53		95
3.2.6	Význam mitochondrií v indukci apoptózy		96
3.2.7	Morfologické změny		98
3.2.8	Cesta pro přežití buňky inhibující indukci apoptózy		99
3.2.9	Bystander efekt		100
3.2.10	Deterministické a stochastické účinky ionizujícího záření		101
3.2.10.1	Stochastické účinky		101
3.2.10.2	Deterministické účinky		101
3.3	Interakce hostitel patogen	A. Macela, Z. Kročová	102
3.3.1	Co je to patogen		102
3.3.2	Nespecifická obrana		103
3.3.2.1	Anatomická bariéra infekce		104
3.3.2.1.1	Mechanické faktory		104
3.3.2.1.2	Chemické faktory		104
3.3.2.1.3	Biologické faktory		104
3.3.2.2	Humorální bariéra infekce		105
3.3.2.3	Buněčná bariéra infekce		107
3.3.2.4	Fagocytóza a intracelulární zabíjení		107
3.3.2.4.1	Fagocytující buňky		107
3.3.2.4.2	Reakce fagocytujících buněk na infekci		108
3.3.2.4.3	Zahájení fagocytózy		108

3.3.3	Adaptivní obrana	109
3.3.3.1	Molekuly hlavního histokompatibilitního systému (MHC)	110
3.3.3.2	TcR – receptor pro antigen na T lymfocytech	111
3.3.3.3	Buňkami zprostředkovaná adaptivní imunitní odpověď	112
3.3.3.4	Humorální (protilátkami zprostředkovaná) adaptivní imunitní odpověď	112
3.3.3.4.1	Izotypy protilátek	113
3.3.3.4.2	Tvorba protilátek	116
3.3.4	Typy interakcí	116
3.3.4.1	Symbiotické vztahy	117
3.3.4.2	Patogenní vztahy	117
3.3.5	Faktory virulence	117
3.3.5.1	Kolonizace hostitelských povrchů:	118
3.3.5.2	Invazivita	119
3.3.5.3	Únik před obrannými mechanismy hostitele	120
3.3.5.4	Získávání nutrice a „údržba“ buňky patogena ve změněném prostředí	121
3.3.6	Sekreční systémy	122
3.3.6.1	Transport proteinů přes bakteriální buněčnou membránu	122
3.3.6.1.1	Translokáza - obecný transportní systém (sec systém)	123
3.3.6.2	Sekreční systémy Gram-negativních bakterií	123
3.3.6.2.1	Sekreční systém typu I	123
3.3.6.2.2	Sekreční systém typu II	124
3.3.6.2.3	Sekreční systém typu III	125
3.3.6.2.4	Sekreční systém typu IV	126
3.3.6.2.5	Autotransportéry – sekreční systémy typu V	127
3.3.6.2.6	„Two-partner secretion“ systém (TPS)	127
3.3.7	Fenotypová proměna a patogenicitá mikroba	128
3.3.8	Regulace genů pro faktory virulence	129
3.3.8.1	Dvousložkové signální systémy	129
3.3.8.2	Čtyřsložkové fosforylační kaskády	130
3.3.8.3	Quorum sensing – vnímání četnosti populace	130
3.3.8.3.1	Quorum sensing systémy Gram-negativních bakterií.	130
3.3.8.3.2	Quorum sensing systémy Gram-pozitivních bakterií	131
3.3.8.4	Sigma faktory a alternativní sigma faktory	131
3.3.9	Vakcíny	<i>A. Macela</i> 132
3.3.9.1	Historie vakcinace a vývoje vakcín	132
3.3.9.2	Vakcíny	133
3.3.9.3	Požadavky a předpoklady pro konstrukci nových vakcín	134
3.3.9.3.1	Klinické hodnocení vakcín	134
3.3.9.3.2	Konstrukce nových vakcín	134
3.3.9.3.3	Nová terapeutika jako doplněk vakcín	135
3.4	Klinické aplikace proteomiky	<i>J. Stulík</i> 136
3.4.1	Proteinové MS profilování	139
3.4.2	Kombinace 2D-PAGE a MS	140
3.4.3	Kombinace LC a MS/MS tzv. „shotgun“ proteomika	142

4	DOPORUČENÁ LITERATURA	144
----------	------------------------------	------------