

# C7188 Úvod do molekulární medicíny 1/12

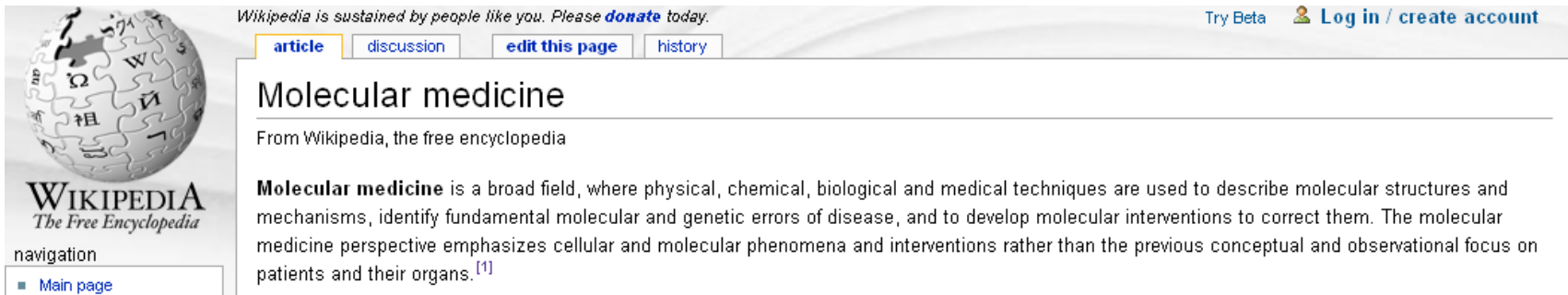


**Definice**  
**Historie**  
**Obsah kurzu**

**doc. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.**  
*Masarykův onkologický ústav*  
*Lékařská fakulta Masarykovy univerzity*  
**CEITEC**



# Vymezení pojmu MOLEKULÁRNÍ MEDICÍNA



The screenshot shows the Wikipedia page for 'Molecular medicine'. At the top, it says 'Wikipedia is sustained by people like you. Please [donate](#) today.' and has links for 'Try Beta', 'Log in / create account', 'article', 'discussion', 'edit this page', and 'history'. The article title is 'Molecular medicine' and it is described as 'From Wikipedia, the free encyclopedia'. The main text states: 'Molecular medicine is a broad field, where physical, chemical, biological and medical techniques are used to describe molecular structures and mechanisms, identify fundamental molecular and genetic errors of disease, and to develop molecular interventions to correct them. The molecular medicine perspective emphasizes cellular and molecular phenomena and interventions rather than the previous conceptual and observational focus on patients and their organs.<sup>[1]</sup>'

[1] Massoud TF, Gambhir SS, Trends in Molecular Medicine, 2007

## MOLECULAR MEDICINE is

a branch of medicine that develops ways to diagnose and treat disease by understanding the way genes, proteins, and other cellular molecules work. Molecular medicine is based on research that shows how certain genes, molecules, and cellular functions may become abnormal in diseases such as cancer.

*according to National Cancer Institute (NCI)*

**Molekulární medicína je obor založený na aplikaci poznatků a metod molekulární biologie do klinické medicíny vedoucí k cílené prevenci a vyššímu stupni integrace diagnózy a terapie.**

Molekulární medicína je širší pojem, nesprávně synonymicky používané pojmy:

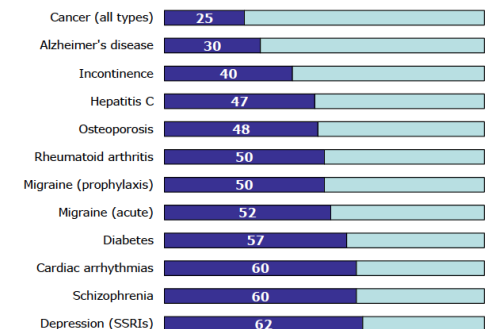
- ~ Personalizovaná medicína ~ individualizovaná medicína ~ „adresná“ medicína
- ~ Translační medicína („from bench to bedside“)

Zahrnuje obory jako farmakogenetika/genomika, nutrigenetika/genomika, ale také mikrobiologickou DNA diagnostiku, prenatální diagnostiku,...

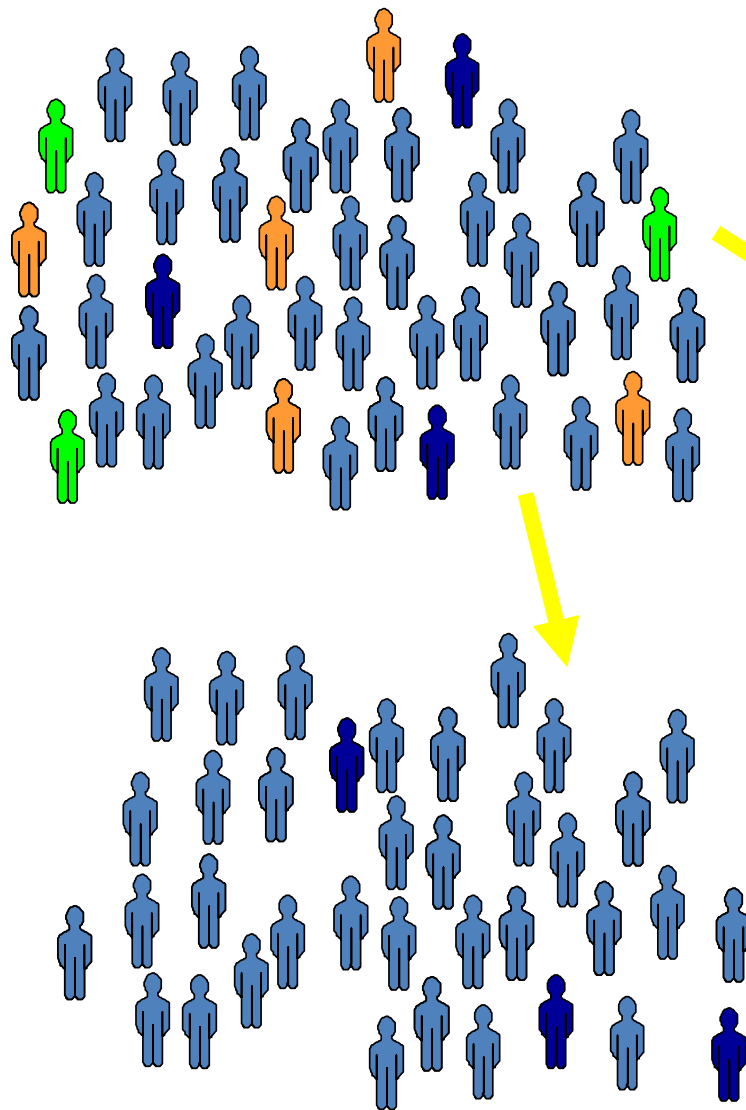
# Koncepce a hlavní náplň oboru MOLEKULÁRNÍ MEDICÍNA

- 1) Identifikace individuálních genetických dispozic ke konkrétním chorobám a formulace preventivních opatření (molekulární epidemiologie, např. nutrigenomika)
- 2) Aplikace molekulárně-biologických metod do klinické diagnostiky (mikrobiologická DNA diagnostika, prenatální diagnostika,...)
- 3) Zdokonalení diagnostiky a přesnější formulace nozologických jednotek zohledňující jejich molekulární patologii
- 4) Identifikace nových terapeutických cílů (molekulárních struktur buňky) co nejvíce specifických pro dané onemocnění
- 5) Příprava léčiv nové generace (21st century therapeutics, cílená léčba, buněčná terapie, genová terapie,...)
- 6) Individualizace léčby na základě genetického pozadí jedince
- 7) Zdokonalení a zrychlení transferu technologií z laboratoří k lůžku pacienta (from bench to bedside)
- 8) Bioetika a právo

**INTEGRACE DIAGNÓZY A TERAPIE!!!**

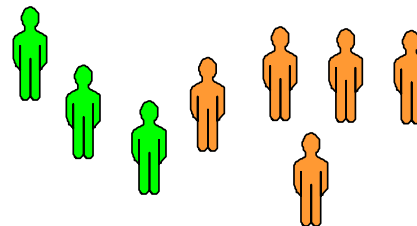


## Pacienti se stejnou diagnózou



## INTEGRACE DIAGNÓZY A TERAPIE

Pacienti odpovídající na léčbu  
bez znaků závažné toxicity



~~Dogma JEDNA NEMOC=JEDNA LÉČBA~~

Pacienti neodpovídající na léčbu  
nebo vykazující závažnou toxicitu

## Zrušení dogmatu JEDNA NEMOC=JEDNA LÉČBA

Nosologická jednotka je dnes definována jako **konkrétní příčina, která vede k rozvoji typického souboru příznaků**. Tato „konkrétní“ příčina ovšem v naprosté většině případů není definována na molekulární úrovni.

### Neexistují dva naprosto stejné případy těžé nemoci

Jen velmi malá část lidských nemocí má jednoduchou, dokonce jedinou příčinu (některé dědičné nemoci a závažné infekce)

I zde - hemofilie, tuberkulóza a AIDS kolísají individuální příznaky tak značně, že je nutné hovořit pouze o celkovém klinickém obrazu

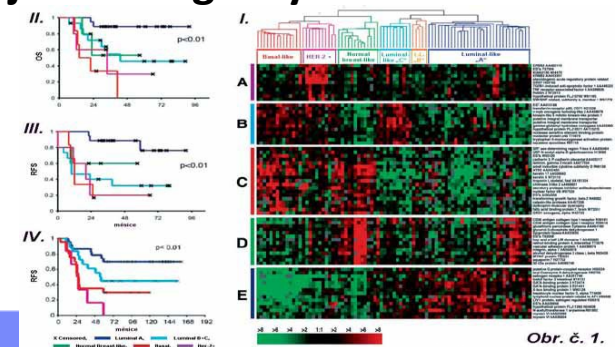
Sorlie et al, PNAS, 2001

### 1. Genetické dispozice ovlivňují průběh téměř všech nemocí

### 2. Mohou existovat rozdílné molekulární podtypy v rámci jedné diagnózy

Existuje pět molekulárních podtypů karcinomu prsu

Příklad molekulární klasifikace karcinomu prsu



## Zrušení dogmatu JEDNA NEMOC=JEDNA LÉČBA

**Nejsou dvě léčby stejné** = účinky jednoho léčiva se liší v závislosti na genetickém pozadí jedince = farmakogenetika, farmakogenomika

**Volba správné terapie nikoliv pouze na základě diagnózy, ale také vzhledem ke schopnosti organismu nakládat s příslušnou látkou** (vliv genetiky, vliv prostředí – interakce složek potravy)

Farmakokinetika – např. metabolická schopnost organismu (CYP2D6, DPD)

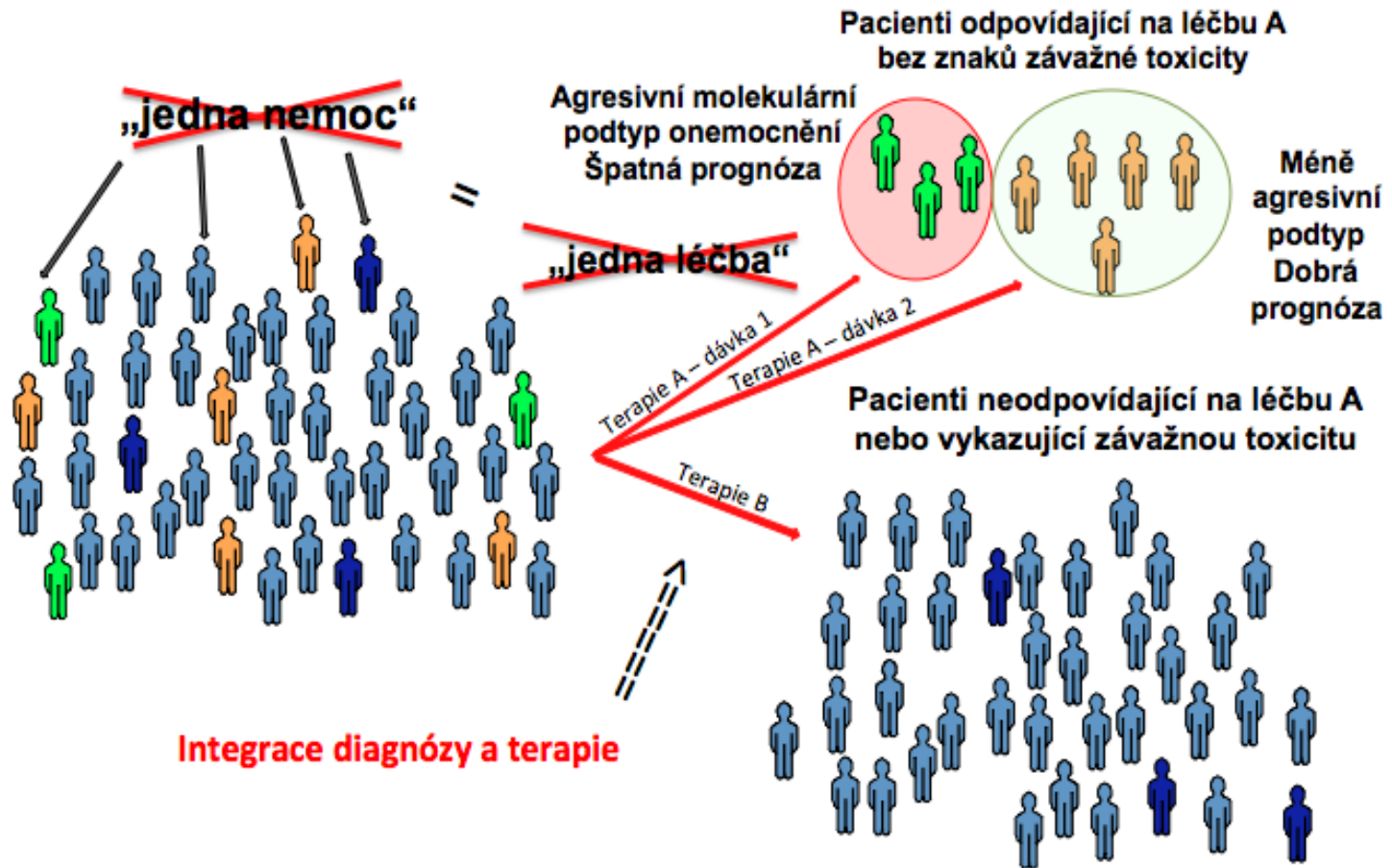
→ toxicita, rezistence

Farmakodynamika – přítomnost molekulárních změn

→ rezistence

Předpoklad farmakogenetiky a farmakogenomiky:

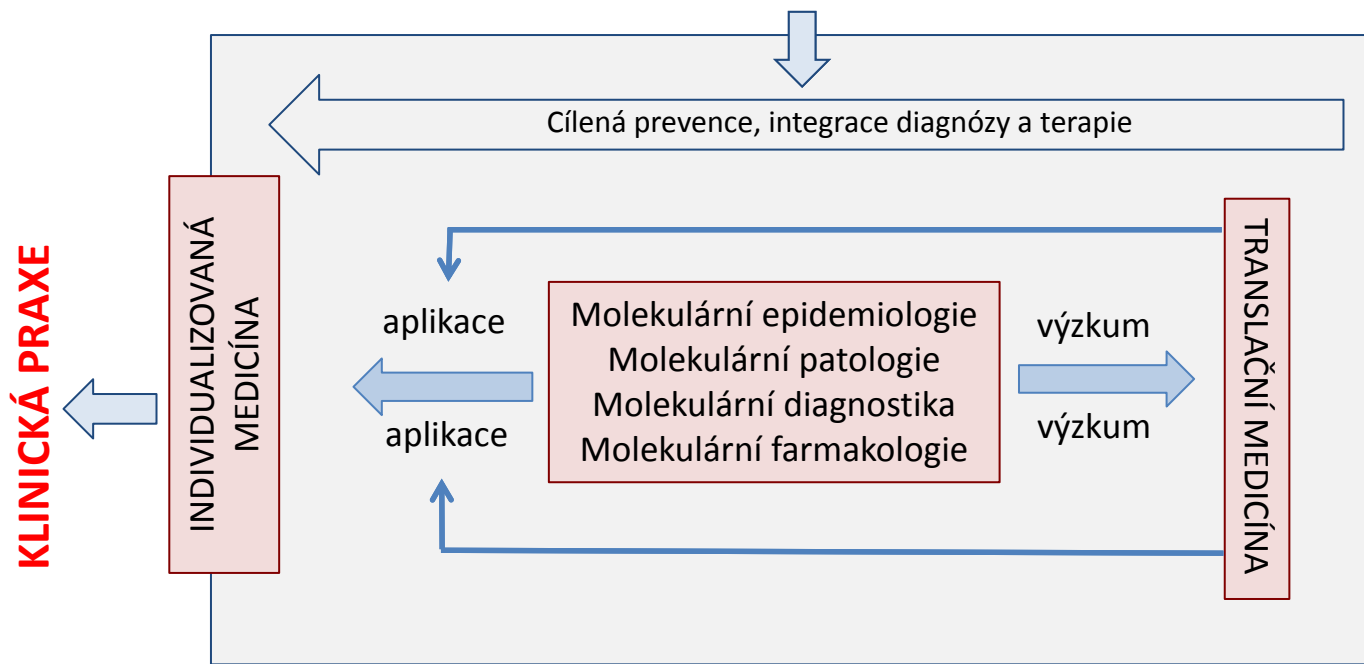
**Genetické změny (prediktivní markery) spojené s fenotypy toxicity a rezistence jsou předem identifikovatelné.**




Cíl tzv. **precizní medicíny** (precision medicine)



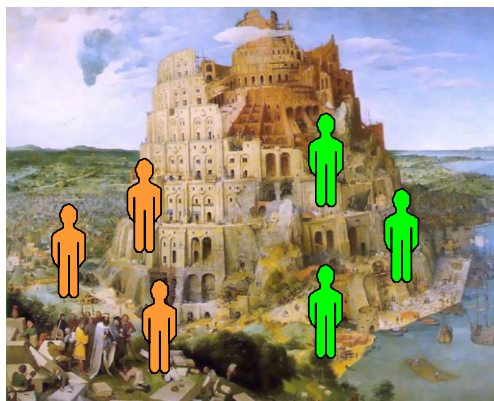
# MOLEKULÁRNÍ MEDICÍNA



Pouze ilustrace  
Myšleno pouze  
jako stavba,  
nikoliv  
EU parlament!

 molekulární biolog

 lékař





## INTEGRACE DIAGNÓZY A TERAPIE!!!



Copyright © 2005 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Drug Discovery

## Proč je investováno tolik financí do výzkumu a vývoje v oblasti MOLEKULÁRNÍ MEDICÍNY?

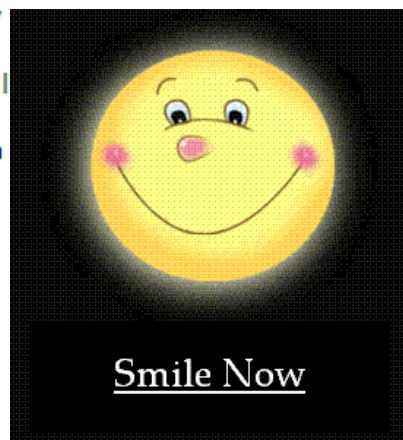


***„If it were not for the great variability among individuals,  
Medicine might be a Science not an Art“***

*Sir William Osler, The Principles and Practice of Medicine, 1892*

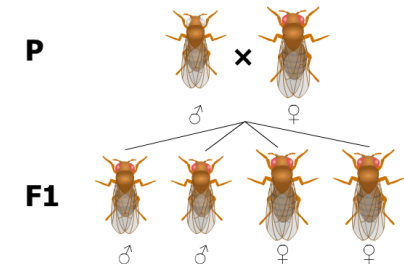
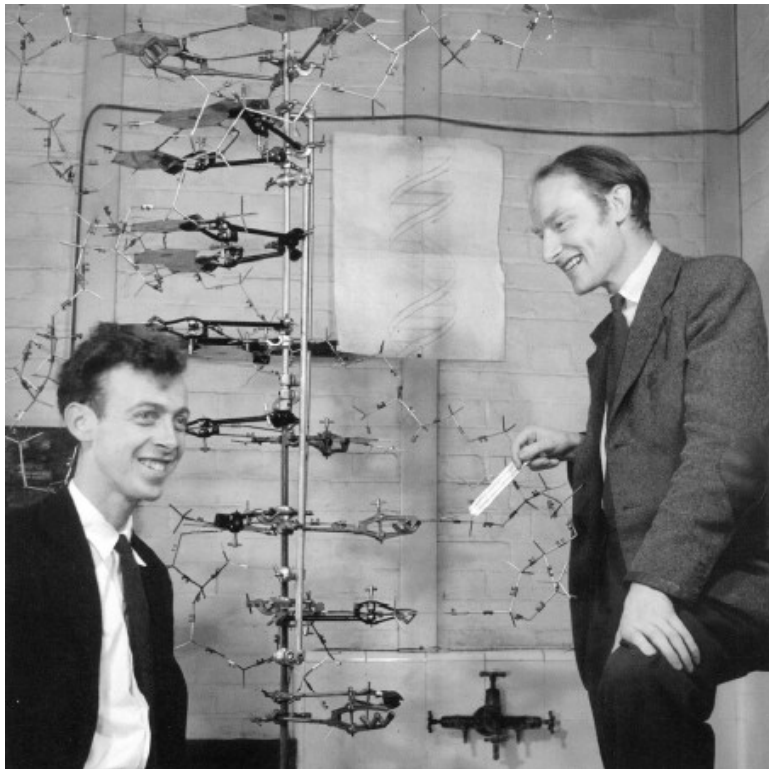
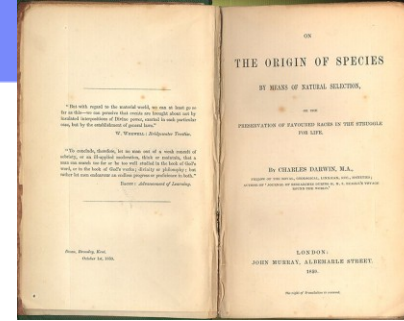
Table 1.2 Molecular medicine and some Nobel Prize winners (1958–2004)<sup>a</sup>

Year	Recipients	Subject
1958	G W Beadle, E L Tatum and J Lederberg	Regulation and genes, and genetic recombination in bacteria
1959	S Ochoa, A Kornberg	<i>In vitro</i> synthesis of nucleic acids
1962	J D Watson, F Crick, M H F Wilkins	Structure of DNA
1965	F Jacob, A L Woff, J Monod	Genetic control enzyme and virus synthesis
1968	R W Holley, H B Khorana, M W	of the genetic code
1975	D Baltimore, H Temin and R Dul	riptase and oncogenic viruses
1978	W Arber, D Nathans, H D Smith	lonucleases
1980 <sup>a</sup>	P Berg and W Gilbert, F Sanger	st recombinant DNA molecule and DNA sequencing
1989	J M Bishop, H E Varmus	
1989 <sup>a</sup>	S Altman, T R Cech	es
1993	R Roberts, P Sharp	
1993 <sup>a</sup>	K Mullis and M Smith	Polymerase chain reaction (PCR) and site directed mutagenesis
1995	E Lewis, C Nüsslein-Volhard, E Wieschaus	Genetic mechanisms in early embryonic development
2001	L H Hartwell, R T Hunt, P M Nurse	Key regulators of the cell cycle
2002	S Brenner, J E Sulston, H R Horvitz	Genetic regulation of organ development and programmed cell death
2004	R Axel, L B Buck	Sense of smell including the genes involved in the olfactory system

<sup>a</sup>Nobel Prize in Chemistry; all others Nobel Prize in Physiology or Medicine.

# Historie molekulární medicíny – „počátky“

1715 Giovanni Battista Morgagni, 1858 Rudolf Virchow  
1859 Charles Darwin, 1865 Gregor Mendel,  
1910 Thomas Hunt Morgan, 1944 Barbara McClintok



**1949 – Linus Pauling – pojem Molekulární onem.**

1953 – James D. Watson a Francis Crick  
– sekundární struktura DNA

Nobelova cena – 1962

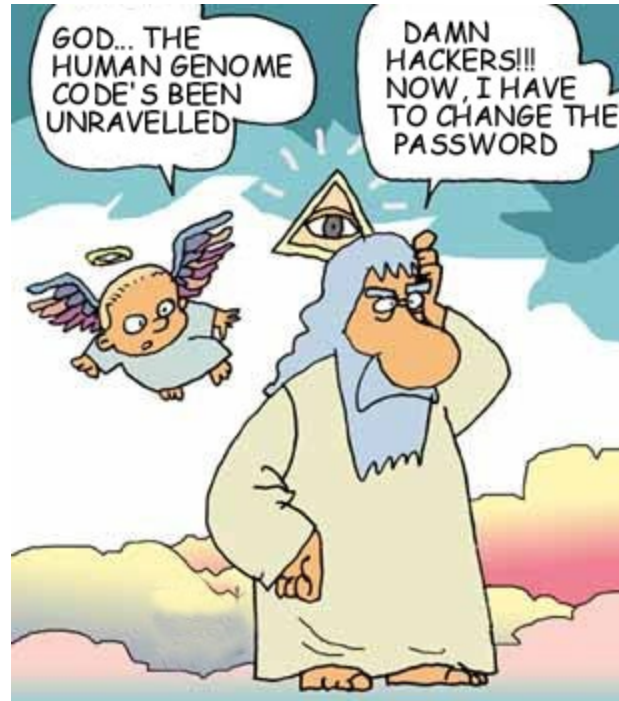
1957 – Francis Crick a George Gamov  
CENTRÁLNÍ DOGMA molekulární biologie

1966 – Marshall Nirenberg, Heinrich Mathaei a Severo Ochoa rozluštili genetický kód



Marshall Nirenberg

Nobelova cena 1968



Paul Berg

1970 David Baltimore izoloval enzym reverzní transkriptázu z RNA retroviru

1972 Paul Berg vytvořil první rekombinantní molekulu DNA

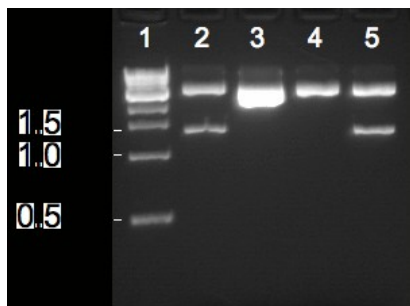
1974 Paul Berg navrhuje v Science dobrovolné moratorium na techniky rekombinantní DNA

1974 Frederick Sanger zavedl metodu sekvenace DNA

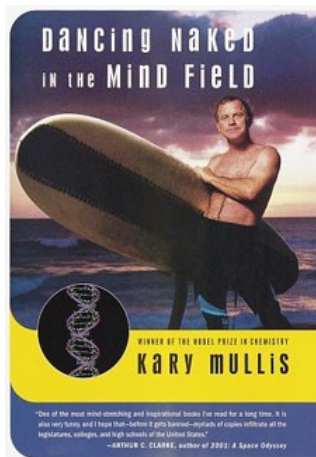
**1976 První biotechnologická společnost založená v Kalifornii GENENTECH, Inc – první lék připravený in vitro pomocí genového inženýrství – lidský inzulin uvedený na trh 1982**



1978 David Botstein zavedl metodu polymorfizmu délky restričních fragmentů (restriction fragment length polymorphisms-RFLP)  
 Zásadní metoda pro identifikaci jednonukleotidových polymorfizmů (SNPs)



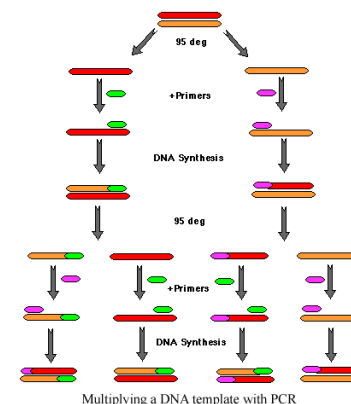
EcoR1 – GAATTC  
 Restriční endonukleázy



1983 Kary Mullis v Cetus Corporation zavedl polymerázovou řetězovou reakci (PCR)

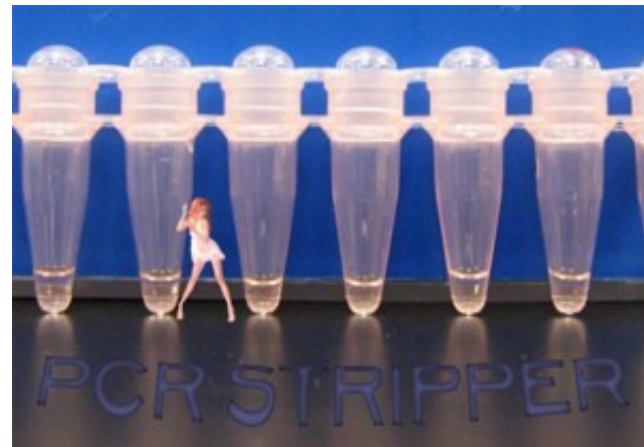


Kary Mullis s hvězdou seriálu CSI: Las Vegas  
 Marg Helgenberger



## The PCR Song

There was a time when to amplify DNA,  
You had to grow tons and tons of tiny cells.  
Then along came a guy named Dr. Kary Mullis,  
Said you can amplify in vitro just as well.  
Just mix your template with a buffer and some primers,  
Nucleotides and polymerases, too.  
Denaturing, annealing, and extending.  
Well it's amazing what heating and cooling and heating will do.  
PCR, when you need to detect mutations.  
PCR, when you need to recombine.  
PCR, when you need to find out who the daddy is.  
PCR, when you need to solve a crime.  
(repeat chorus)





# Historie molekulární medicíny – moderní éra 1980s-2000s

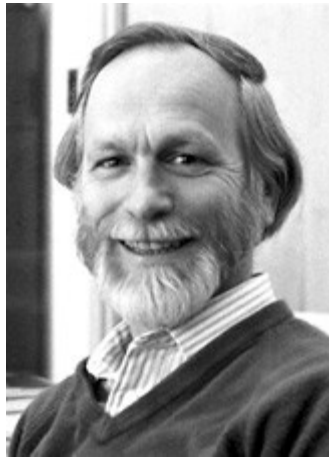
## Geny a nádorová onemocnění

1910 Peyton Rous popsal význam viru v etiologii sarkomu kuřat  
**Rous Sarcoma Virus (RSV)**

Počátkem osmdesátých let, byl klonován segment DNA z nádorové linie močového měchýře, který vykazoval schopnost indukovat neoplastickou transformaci v jiných buňkách

=**ONKOGEN**

Nobelova cena, 1989



J. Michael Bishop



Harold E. Varmus

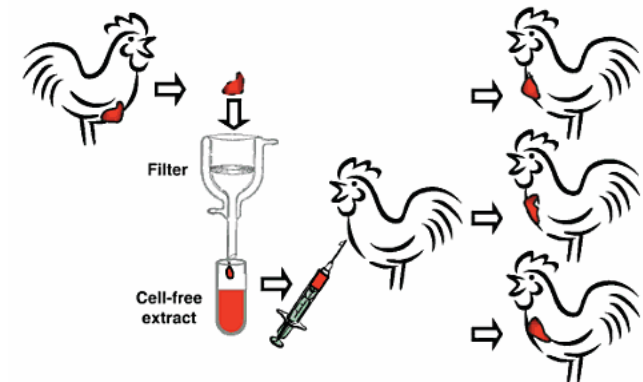
Onkogeny jsou defektní formy proto-onkogenů (RSV)

## Nádorové supresory

2001- Nobelova cena  
 L Hartwell, R Hunt, P Nurse  
 regulátory buněčného cyklu



Peyton Rous,  
 Nobelova cena 1966



# Historie molekulární medicíny – moderní éra 1980s-2000s

## Mutační analýza

**Počátkem devadesátých let se objevují automatické sekvenátory (příliš nákladné)**

**Nejpoužívanější jsou stále metody založené na PCR**

**RFLP – polymorfismus délky restrikčních fragmentů**

**SSCP – polymorfismus konformace jednořetězcové DNA**

**DGGE – elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu**

**Na trhu se objevují komerční DNA kity – diagnostika**

## Genová terapie

**1987 – první rekombinantní DNA vakcína pro hepatitidu B, vytvořená inzercí segmentu virové DNA do kvasinkového vektoru**

**1990 – první podání genové terapie (retrovirové vektory s funkčním enzymem) u pacientky s ADA imunodeficiencí**

**Klinická studie se SCID X1 imunodeficiencí u 14 dětí (u 2 došlo k rozvoji ALL)**

## Vývoj nových virových i nevirálních vektorů

**S. Altman a T. Cech – objev Ribozymů**

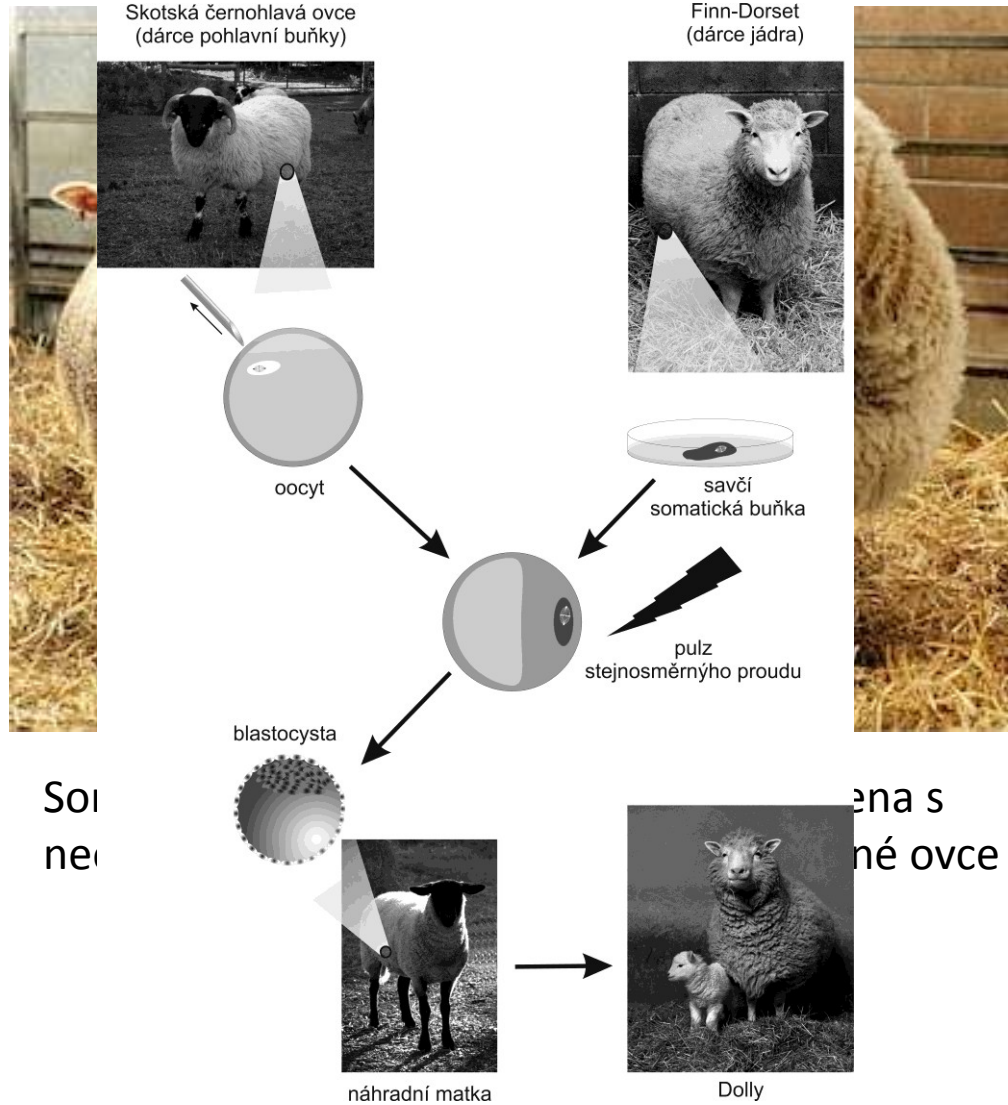
# 1997 – Ian Wilmut – TVŮRCE DOLLY



Ovečka Dolly (1997-2004)



Makak Neti a Ditto  
Autor Don Wolf, 1997



# Historie molekulární medicíny – moderní éra 1980s-2000s

## Polymorfizmy DNA

Za geneticky polymorfní je považován znak s nejméně dvěma geneticky podmíněnými variantami v jedné populaci, které se nachází v takových frekvencích, že i zřídka má frekvenci alespoň 1%.

Mezi lidmi je přibližně 99,9% shoda v sekvenci DNA

Zbývajících 0,1% nás činí jedinečnými (jak vypadáme, nemoci, kterými budeme trpět, ...)

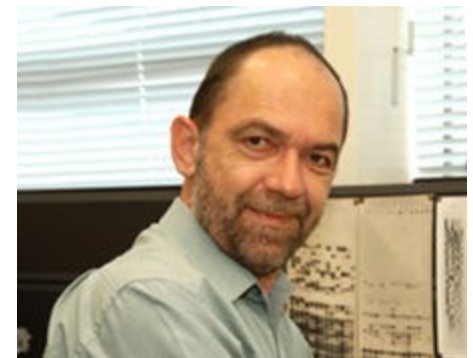
Bodové (single-nucleotide polymorphism SNP, vyslovuj *snip*)

Frekvence přibližně jeden 1 SNP na 1kb DNA sekvence

Repetitivních sekvencí (satelity, mikrosatelity – počty repetice)

1985 – **DNA fingerprinting** – komplexnost polymorfizmů satelitů umožňuje vytvořit unikátní DNA profil jedince

1987 – poprvé uznán DNA fingerprinting jako důkaz u soudu  
počátek forezní molekulární biologie

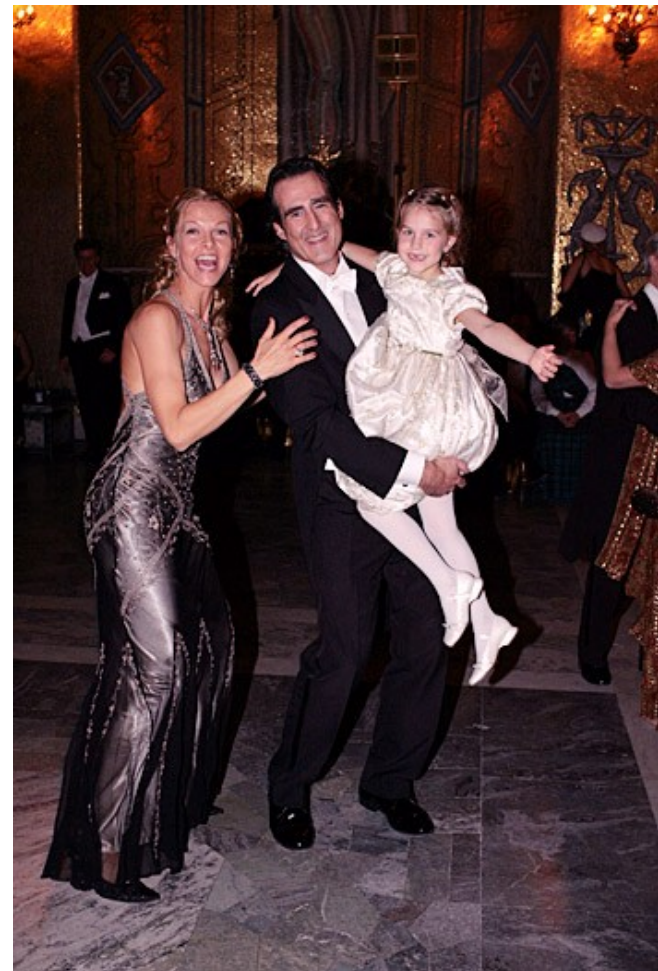
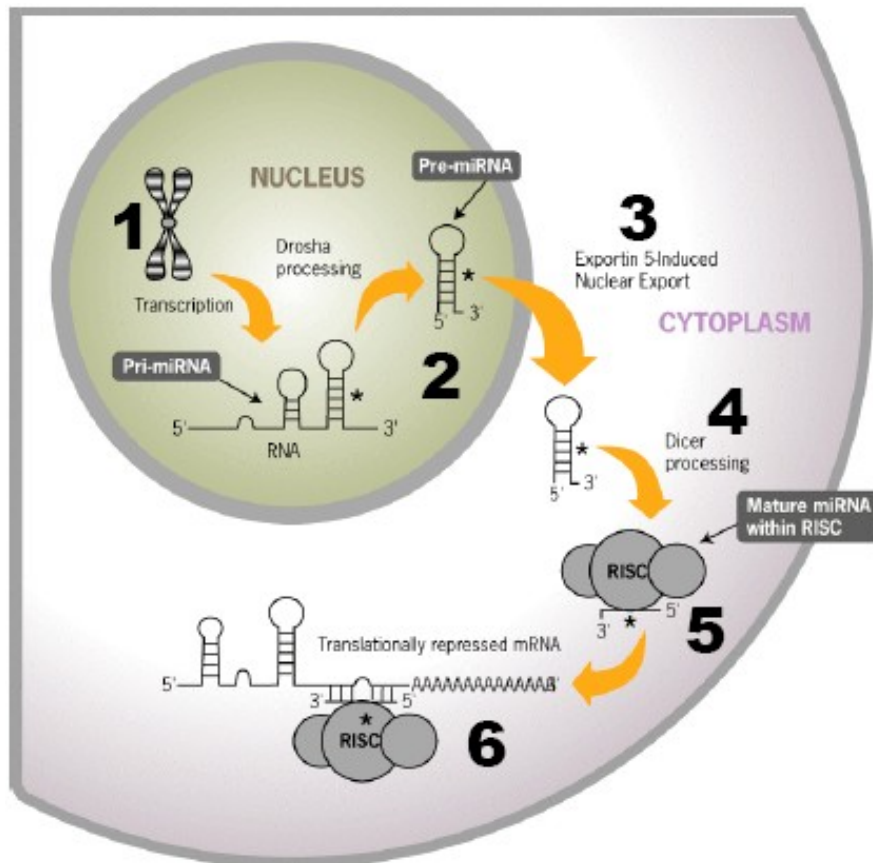


Sir Alec Jeffreys

**DNA polymorfizmy jsou genetickým pozadím souvisejícím mimo jiné také s dispozicemi k civilizačním chorobám a léčebnou odpovědí .**



## 1998 – objev RNA INTERFERENCE Craig Mello a Andy Fire u C. Elegans –NOVÝ NÁSTROJ GENOVÉ TERAPIE



Craig Mello na slavnostním banketu po udělení Nobelových cen za rok 2006.

# HUMAN GENOME PROJECT

**1985-1990: diskuse o sekvenování lidského genomu**

– “nebezpečné” - “nesmyslné” - “nemožné”

**1988-1990: Založen HUMAN GENOME PROJECT (HGP)**

20 laboratoří z USA, Velké Británie, Japonska, Francie, Německa a Číny

Asi 2800 lidí, vedoucí: Francis Collins, NIH

**Mezinárodní spolupráce: HUGO (Human Genome Organisation)**

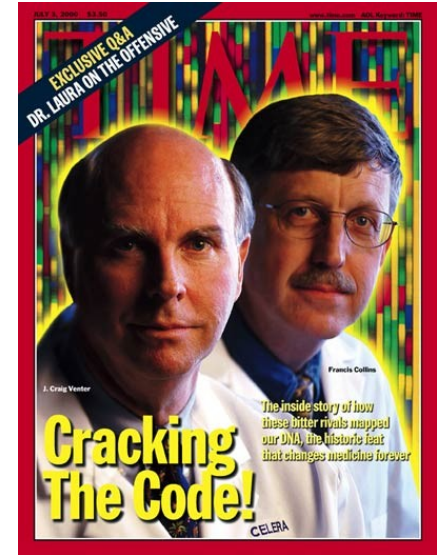
**Cíle:**

- genetická mapa lidského genomu
- fyzická mapa: marker každých 100 kbp
- sekvenování modelových organismů (E. coli, S. cerevisiae, C. elegans, Drosophila, myš)
- objevit všechny lidské geny (předpokl. 60-80 tisíc)
- sekvenování celého lidského genomu (3000 Mbp) do r. 2005 s rozpočtem 3 bil. USD



**Květen 1998** „Discovery can't wait“

- **Craig Venter zakládá soukromou biotechnologickou společnost CELERA GENOMICS, Inc. a vyhláší záměr sekvenovat celý lidský genom za 3 roky a 300 mil. USD metodou *whole-genome shotgun*, několik desítek zaměstnanců (sponzorováno Applied Biosystems)**
- **V té době výsledek práce HGP: sekvenováno cca 4 % lidského genomu.**



**Celera Genomics & akad. spolupracovníci publikují draft genomu *Drosophila melanogaster* (cca 2/3 z 180 Mbp)**

- **... *whole-genome shotgun* lze použít i pro velké genomy**
- **... Lidský genom: závod mezi Human Genome Project a Celera Genomics**

**Únor 2001 - Remíza**

**HGP publikuje draft lidského genomu v časopisu Nature 15.2.2001.**

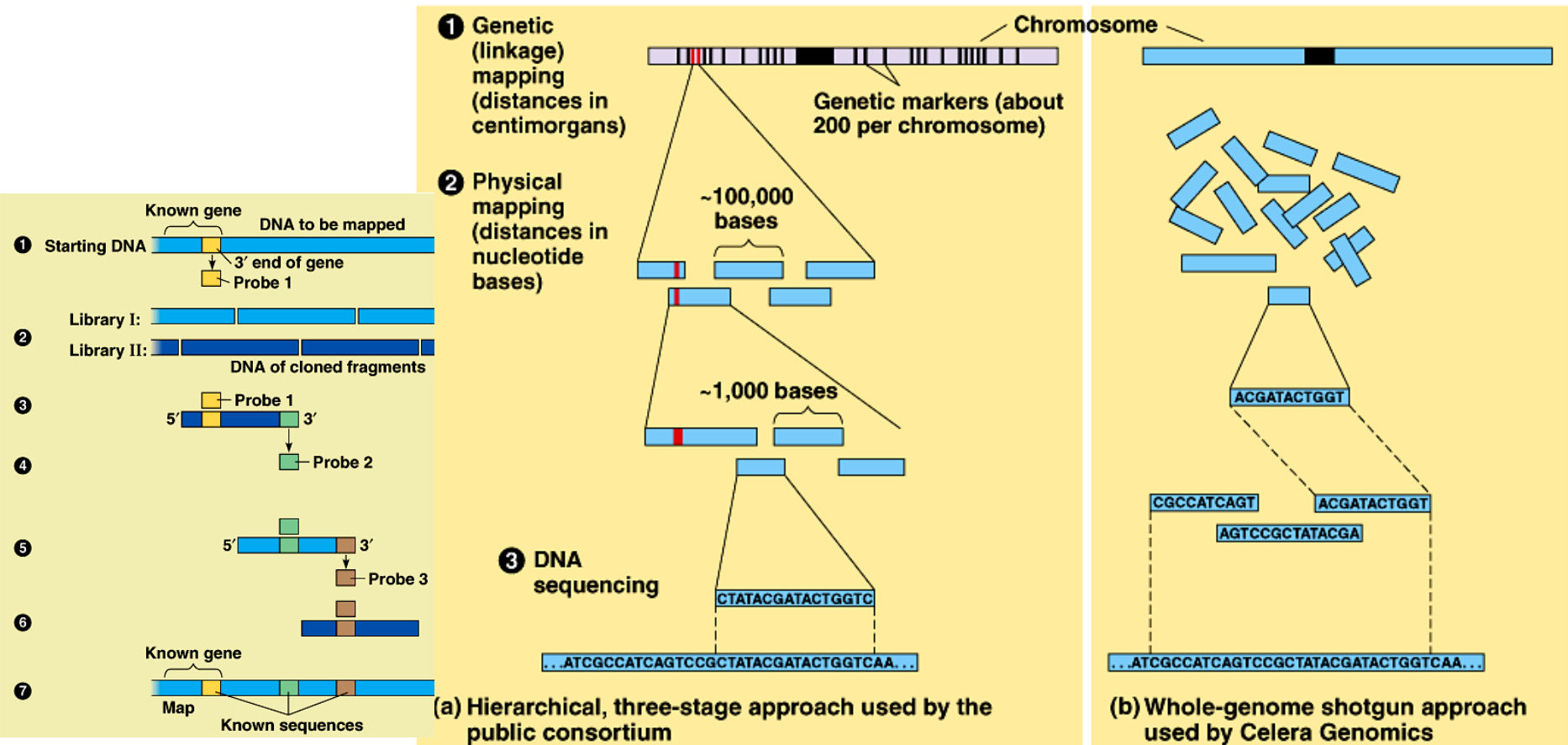
**Celera Genomics publikuje svou sekvenci lidského genomu v Science 16.2.2001.**



# Srovnání přístupu veřejného konsorcia a Celera Genomics

## Clone-by-clone

## Whole-genome shotgun



Pracovníci veřejného konsorcia byli zavázáni tzv. Bahamskou deklarací, která stanovila, že se výsledky sekvenování musí do 24 hod. vystavit veřejně na internetu, aby všechna pracoviště mohla využít výsledků ostatních. Tato data ovšem využívali i pracovníci Celery, kteří ovšem nebyli Bahamskou deklarací vázáni a své výsledky nezveřejňovali.



## Craig Venter

Září 2007, 10 mil. USD

32 million DNA fragmentů, 20 billionu bazí

Total variants: 4.1 million

3.1 million SNPs

4000 genů mělo pozměněné proteinové produkty

Venter netrpí CF ani Huntigtonovou chorobou

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS BIOLOGY

## The Diploid Genome Sequence of an Individual Human

Samuel Levy<sup>1\*</sup>, Granger Sutton<sup>1</sup>, Pauline C. Ng<sup>1</sup>, Lars Feuk<sup>2</sup>, Aaron L. Halpern<sup>1</sup>, Brian P. Walenz<sup>1</sup>, Nelson Axelrod<sup>1</sup>, Jiaqi Huang<sup>1</sup>, Ewen F. Kirkness<sup>1</sup>, Gennady Denisov<sup>1</sup>, Yuan Lin<sup>1</sup>, Jeffrey R. MacDonald<sup>2</sup>, Andy Wing Chun Pang<sup>2</sup>, Mary Shago<sup>2</sup>, Timothy B. Stockwell<sup>1</sup>, Alexia Tsiamouri<sup>1</sup>, Vineet Bafna<sup>3</sup>, Vikas Bansal<sup>3</sup>, Saul A. Kravitz<sup>1</sup>, Dana A. Busam<sup>1</sup>, Karen Y. Beeson<sup>1</sup>, Tina C. McIntosh<sup>1</sup>, Karin A. Remington<sup>1</sup>, Josep F. Abril<sup>4</sup>, John Gill<sup>1</sup>, Jon Borman<sup>1</sup>, Yu-Hui Rogers<sup>1</sup>, Marvin E. Frazier<sup>1</sup>, Stephen W. Scherer<sup>2</sup>, Robert L. Strausberg<sup>1</sup>, J. Craig Venter<sup>1</sup>

1 J. Craig Venter Institute, Rockville, Maryland, United States of America, 2 Program in Genetics and Genomic Biology, The Hospital for Sick Children, and Molecular and Medical Genetics, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada, 3 Department of Computer Science and Engineering, University of California San Diego, La Jolla, California, United States of America, 4 Genetics Department, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain



## James D. Watson

Říjen 2007

Méně než 1 mil. USD

Publikován v GeneBank

Trvalo méně než 2 měsíce

Následovaly sekvenační analýzy dalších jedinců z různých etnik, které přinesly podstatné informace o interpersonálních rozdílech ve struktuře genomů.

# Nové technologie založené na principu masivního paralelního sekvenování *next-generation* DNA sequencing technology



**Roche**  
**454 Genome/  
Sequencer**  
platform

## Srpen 2009

*Nature Biotechnology*

Published online: 10 August 2009 | doi:10.1038/nbt.1561

### Single-molecule sequencing of an individual human genome

Dmitry Pushkarev<sup>1,2</sup>, Norma F Neff<sup>1,2</sup> & Stephen R Quake<sup>1</sup>

**Recent advances in high-throughput DNA sequencing technologies have enabled order-of-magnitude improvements in both cost and throughput. Here we report the use of single-molecule methods to sequence an individual human genome. We aligned billions of 24- to 70-bp reads (32 bp average) to ~90% of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) reference genome, with 28× average coverage. Our results were obtained on one sequencing instrument by a single operator with four data collection runs. Single-molecule sequencing enabled analysis of human genomic information without the need for cloning, amplification or ligation. We determined ~2.8 million single nucleotide polymorphisms (SNPs) with a false-positive rate of less than 1% as validated by Sanger sequencing and 99.8% concordance with SNP genotyping arrays. We identified 752 regions of copy number variation by analyzing coverage depth alone and validated 27 of these using digital PCR. This milestone should allow widespread application of genome sequencing to many aspects of genetics and human health, including personal genomics.**

top ↗



**Solexa  
Illumina**



**SOLiD  
Applied  
Biosystems**

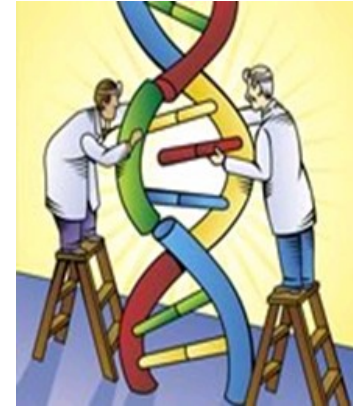
Délka projektu: 8 týdnů

**48 000 USD** (Venter 10 MUSD -> HUGO: 3 000 MUSD)

Paralelní sekvenování miliónů sekvencí, celkem 100 – 3000 Mb/run, jednotlivé sekvence dlouhé 20 – 400 bp

## Take home

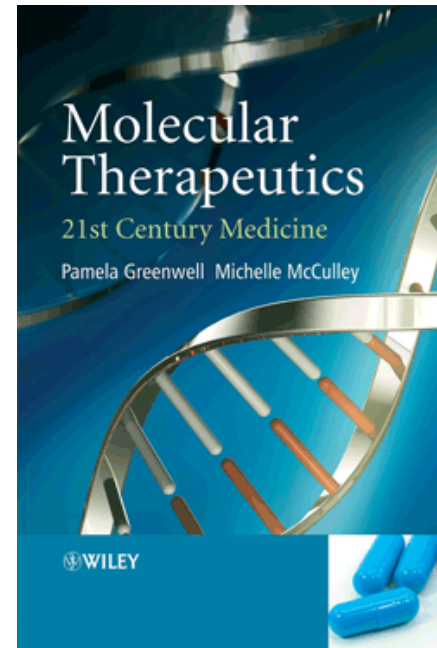
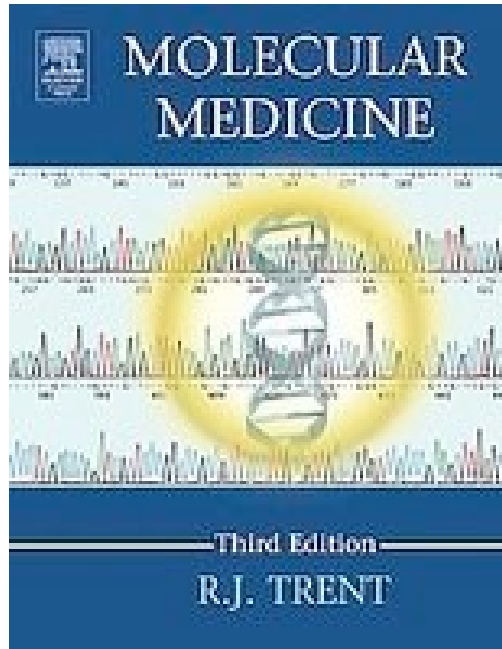
- 1) Co je molekulární medicína?
- 2) Co znamená spojení „integrace diagnózy a terapie“?
- 3) Jaké jsou důvody a následky individualizace léčby?
- 4) Jaké milníky v historii molekulární biologie umožnily vznik oboru molekulární medicína a jaké nejnovější poznatky její rychlý vývoj v posledních letech?



## Náplň příští přednášky

**Molekulární patologie nádorových onemocnění – buněčný cyklus, apoptóza, genetická nestabilita nádorů, rizikové faktory, angiogeneze, tvorba metastáz, mikroRNA, nádor jako komplexní tkáň, histopatologická klasifikace nádorů, mechanismus účinku vybraných léčiv, invazivita/chemorezistence – příklady kolorektálního karcinomu, mamárního karcinomu a glioblastomu**

## Doporučená literatura



## Dotazy?

