

Úvod do molekulární medicíny

C7188



1. Definice, náplň a historie oboru

doc. Mgr. Jiří Šána, Ph.D.

podzim 2024

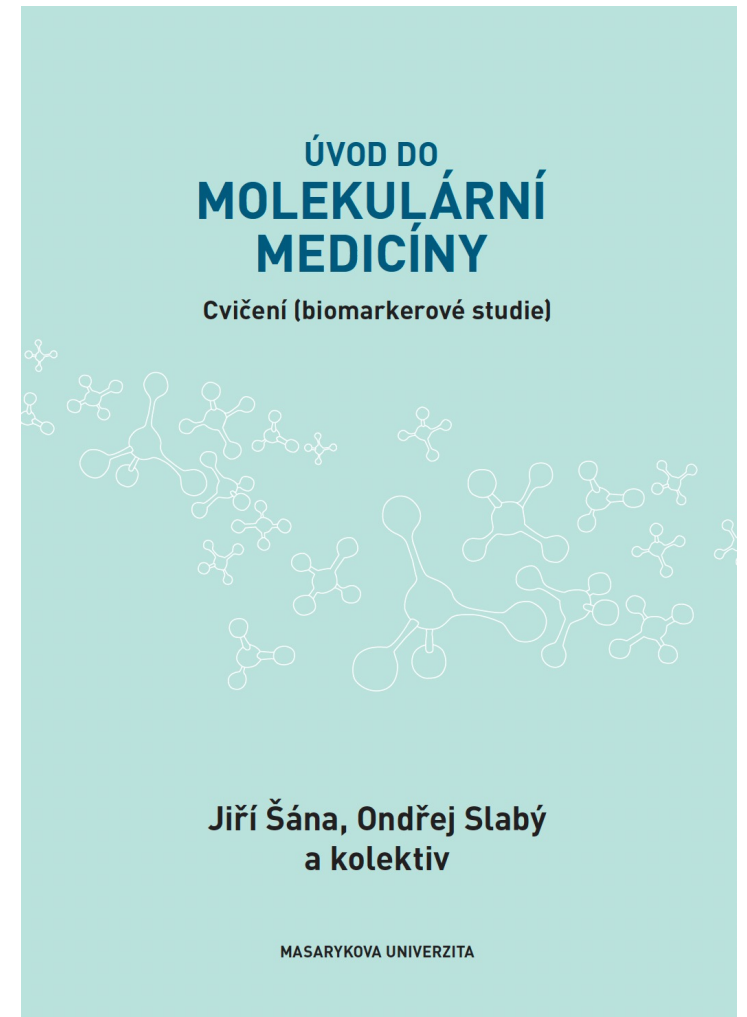
C7189 Úvod do molekulární medicíny – cvičení

Čtvrtek 10:00 – 12:50 (3 kredity)

Podmínky udělení zápočtu:

- 2 protokoly
- prezentace výsledků

1. Úvod, návrh grantových projektů, hodnotící proces AZV
2. Izolace RNA, měření koncentrace a kontrola kvality
3. Sekvenování nové generace, základy zpracování dat
4. qPCR
5. Biostatistika – GraphPad, JMP
6. Kultivace buněk a tvorba růstových křivek
7. Design *in vitro* studií & CRISPR/Cas9 & Bioinformatika
8. Transientní transfekce & Testy viability a migrace
9. Průtoková cytometrie – buněčný cyklus a apoptóza
10. Konzultační hodina
11. Prezentace



Vymezení pojmu MOLEKULÁRNÍ MEDICÍNA



**NATIONAL
CANCER
INSTITUTE**

Obor medicíny, který vyvíjí způsoby **diagnostiky a léčby** nemocí na základě poznání **fungování genů, proteinů a dalších buněčných molekul**. Molekulární medicína je založena na výzkumu, který ukazuje, jak mohou být určité geny, molekuly a buněčné funkce abnormální při onemocněních, jako je například rakovina.

překlad

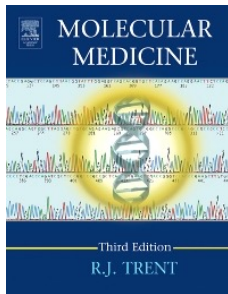


WIKIPEDIA
The Free Encyclopedia

Molekulární medicína je široký obor, v němž se používají fyzikální, chemické, biologické, bioinformatické a lékařské techniky k popisu **molekulárních struktur a mechanismů**, k identifikaci základních **molekulárních a genetických chyb nemocí a k vývoji molekulárních intervencí k jejich nápravě**. Perspektiva molekulární medicíny klade důraz na buněčné a molekulární jevy a intervence spíše než na dřívější koncepční a observační zaměření na pacienty a jejich orgány.

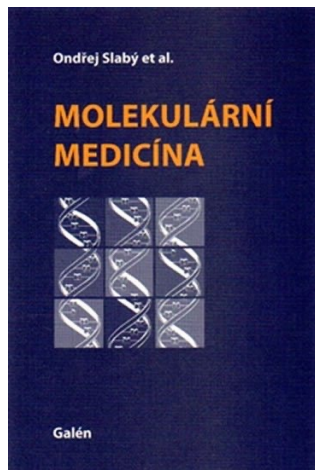
překlad

Vymezení pojmu MOLEKULÁRNÍ MEDICÍNA



Termín molekulární medicína se používá k popisu role, kterou hraje **DNA v lékařské praxi**. Vzhledem k širokému uplatnění DNA v medicíně nelze molekulární medicínu považovat za tradiční obor, protože DNA překračuje jak přirozené hranice, jako je druh, tak umělé hranice, jejichž příkladem jsou lékařské obory.

překlad



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.

Vymezení pojmu MOLEKULÁRNÍ MEDICÍNA

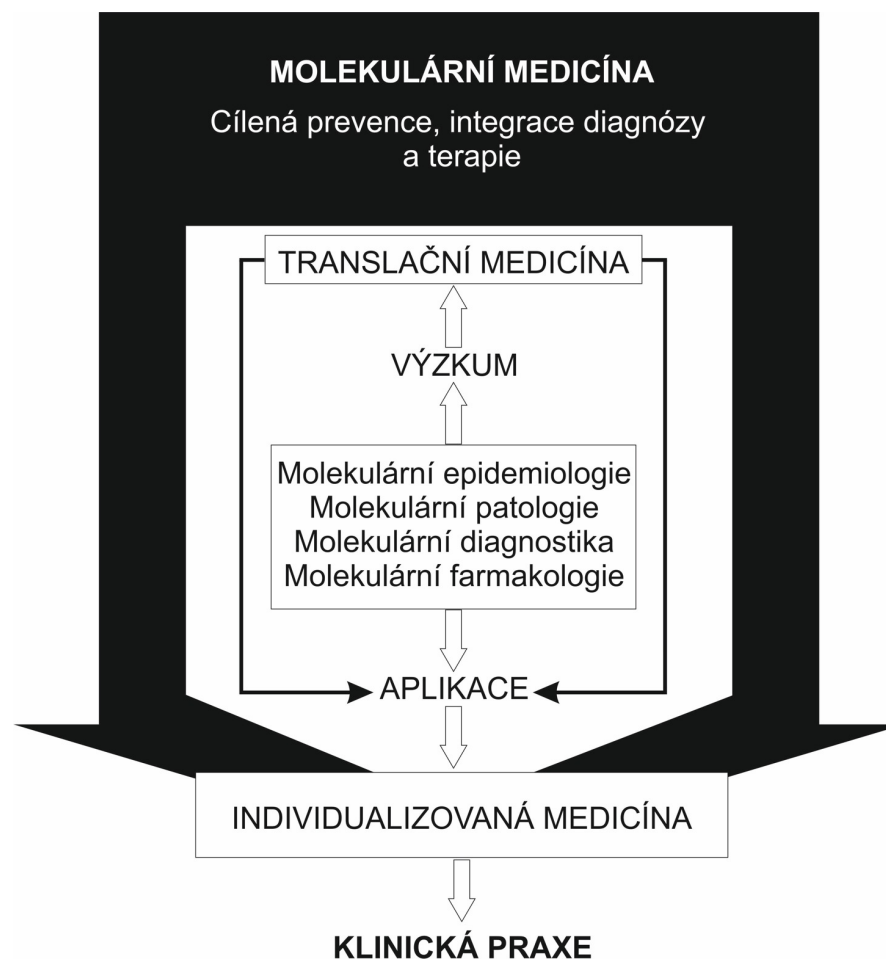
MOLEKULÁRNÍ MEDICÍNA bývá **nesprávně** synonymicky **zaměňována** s pojmy:

- **translační medicína** (“from bench to bedside” neboli “od laboratorního stolu k lůžku pacienta”)
 - Interdisciplinární obor biomedicíny, který se opírá o tři hlavní pilíře: laboratoř, lůžko pacienta a komunita. Cílem translační medicíny je spojit obory, zdroje, odborné znalosti a techniky v rámci těchto pilířů a podpořit tak zlepšení prevence, diagnostiky a terapie.

European Society for Translational Medicine, překlad
- **personalizovaná medicína** (individualizovaná či adresná medicína)
 - Personalizovaná medicína využívá informace o genech nebo proteinech konkrétního člověka k prevenci, diagnostice nebo léčbě nějakého onemocnění. Personalizovaná medicína se nejvíce uplatňuje v onkologii, kde využívá zjištěné informace o zhoubném nádoru konkrétního pacienta, které pomáhají stanovit diagnózu, naplánovat léčbu, zjistit, jak dobře léčba funguje, nebo stanovit prognózu.

Národní zdravotnický informační portál

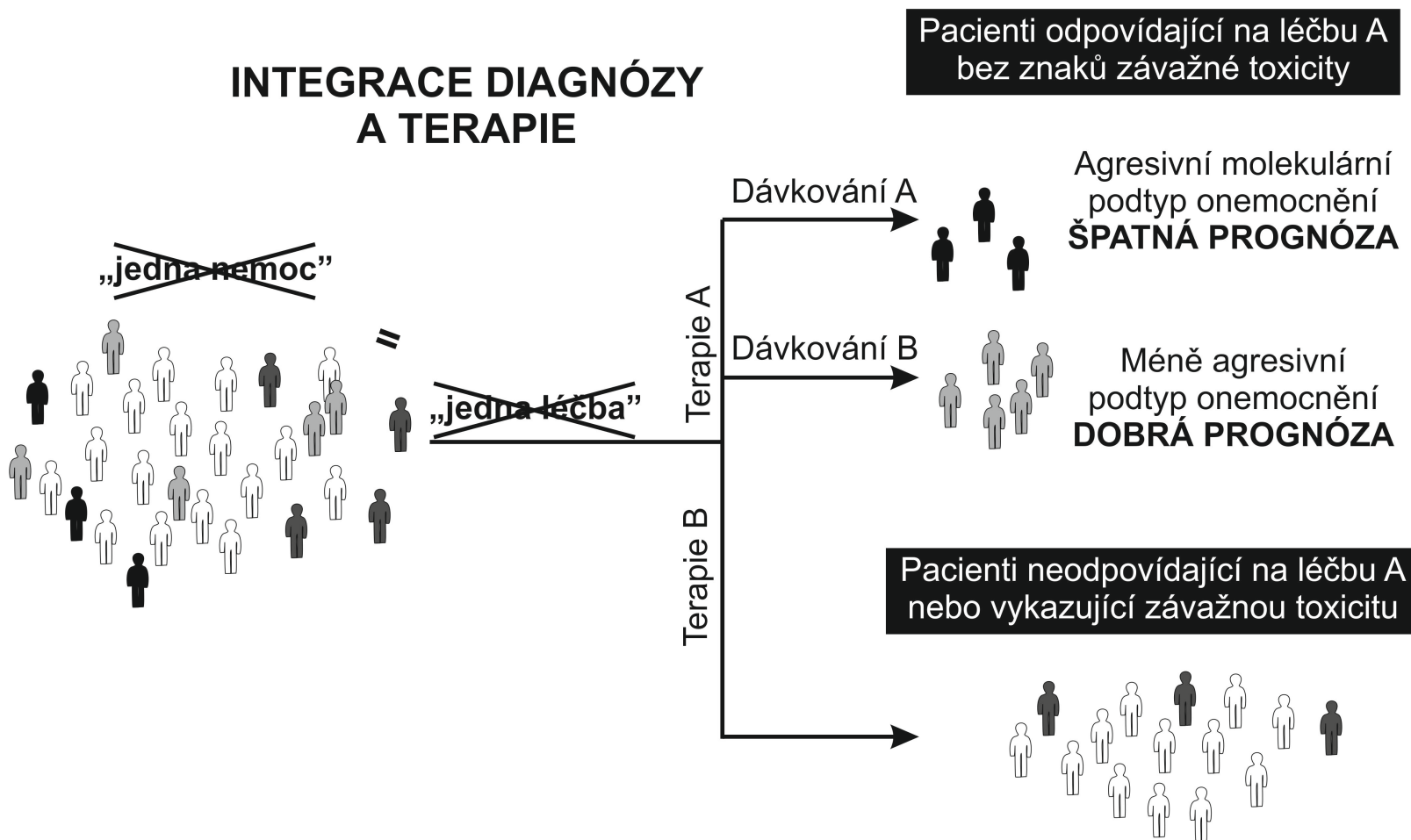
Vymezení pojmu MOLEKULÁRNÍ MEDICÍNA



Koncepce a hlavní náplň oboru MOLEKULÁRNÍ MEDICÍNA

- 1 identifikace individuálních genetických dispozic ke konkrétním chorobám a formulace preventivních opatření (molekulární epidemiologie, nutrigenomika, ...)
- 2 aplikace molekulárně-biologických metod do klinické diagnostiky (mikrobiologická DNA diagnostika, prenatální diagnostika, ...)
- 3 zdokonalení diagnostiky na základě přesnější formulace onemocnění zohledňující jejich molekulární patologii (např. molekulární taxonomie nádorů)
- 4 identifikace nových terapeutických cílů (molekulárních struktur buňky) co nejvíce specifických pro dané onemocnění
- 5 vytváření nových léčebných strategií (cílená léčba, buněčná terapie, genová terapie, ...)
- 6 individualizace léčby na základě genetického pozadí jedince (farmakogenetika/genomika)
- 7 zdokonalení a zrychlení transferu technologií z laboratoří k lůžku pacienta (translační medicína – „from bench to bedside“)
- 8 bioetika a právo

Vyvrácení dogmatu jedna nemoc = jedna léčba



Vyvrácení dogmatu jedna nemoc = jedna léčba

Neexistují dva naprosto stejné případy téže nemoci

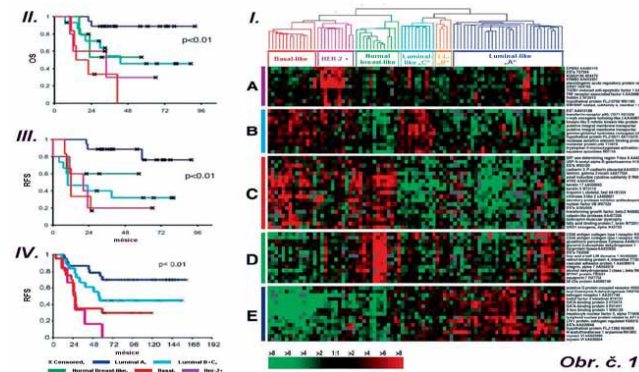
Jen velmi malá část lidských nemocí má jednoduchou, dokonce jedinou příčinu (některé dědičné nemoci a závažné infekce)

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

1. Genetické dispozice ovlivňují průběh téměř všech nemocí

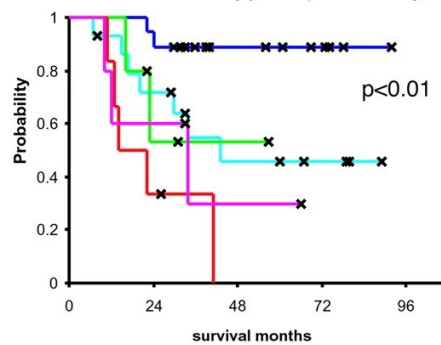
2. Mohou existovat rozdílné molekulární podtypy v rámci jedné diagnózy

Příklad molekulární klasifikace karcinomu prsu:
- existuje šest molekulárních podtypů

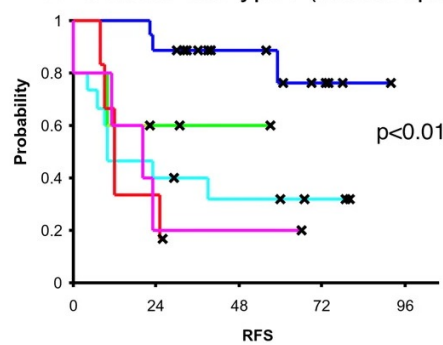


Vyvrácení dogmatu jedna nemoc = jedna léčba

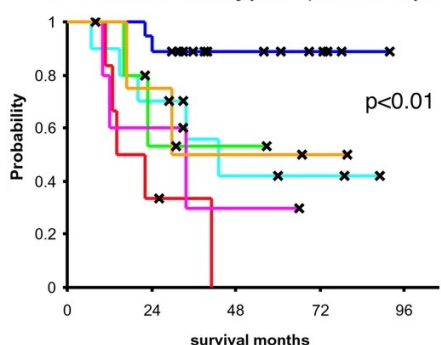
A 5 tumor subtypes (based upon Fig 1)



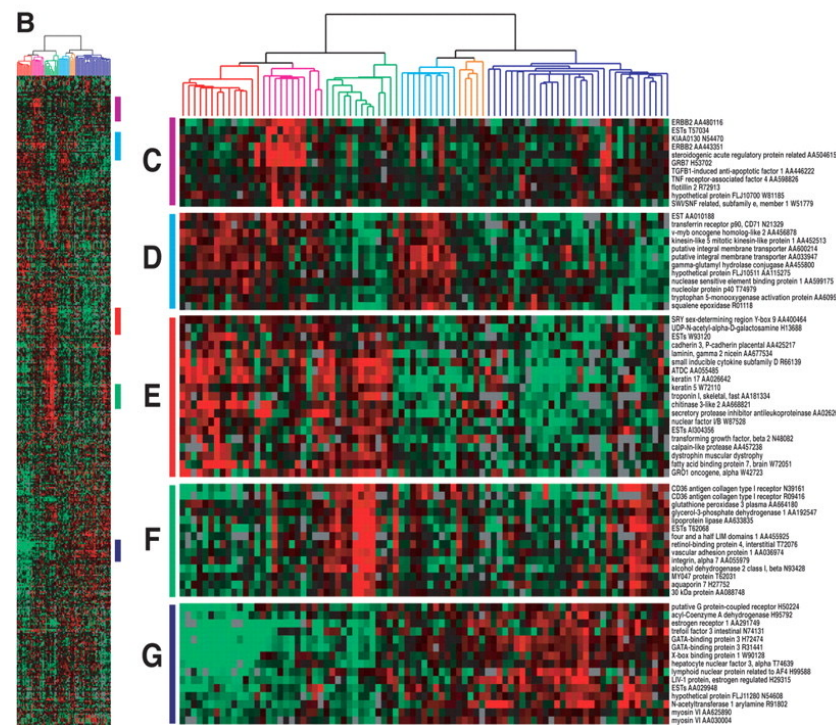
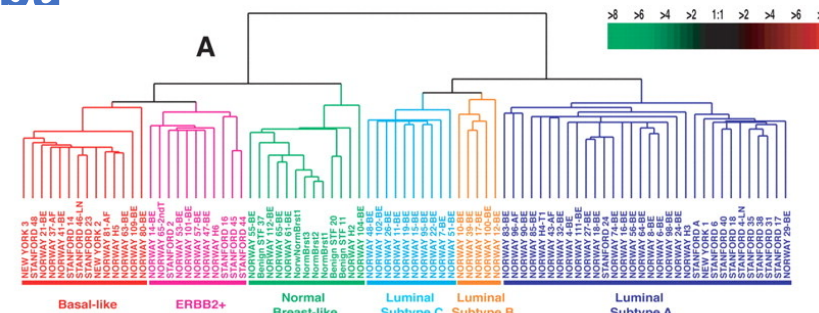
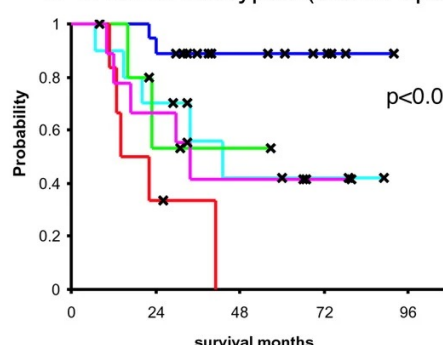
B 5 tumor subtypes (based upon Fig 1)



C 6 tumor subtypes (based upon Fig 1)



D 5 tumor subtypes (based upon Fig 5)



Vyvrácení 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 a CYP2C19 – metabolizují 30 % léků nebo kapacita organismu odbourávat cytostatikum 5-fluorouracil pomocí enzymu dihydropyrimidin dehydrogenázy. Přibližně 0,2 % pacientů vykazují jeho úplnou ztrátu

→ toxicita, rezistence

Cytochrom je protein, který slouží ke katalýze přenosu elektronů během metabolických reakcí.

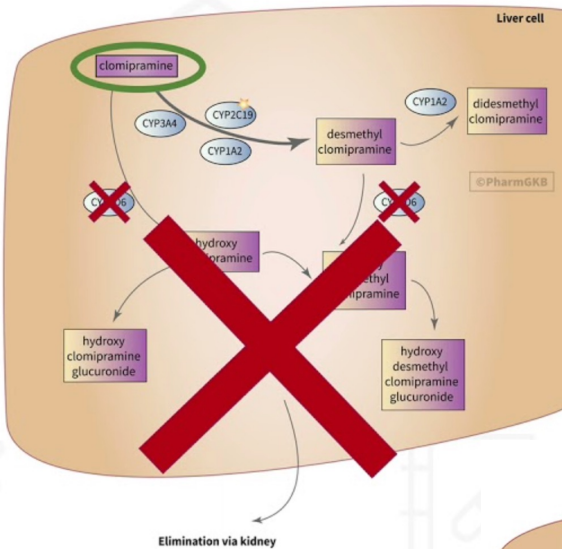
Podílejí se na reakci metabolismu léků, která určuje bezpečnost a účinnost léku u člověka.

Vyvrácení dogmatu jedna nemoc = jedna léčba

Metabolism of clomipramine by CYP2D6 → formation of less active metabolites

CYP2D6 ultrarapid metabolizers → decreased concentrations of clomipramine → increased probability of pharmacotherapy failure

CYP2D6 poor metabolizers → increased concentrations of clomipramine → increased probability of side effects

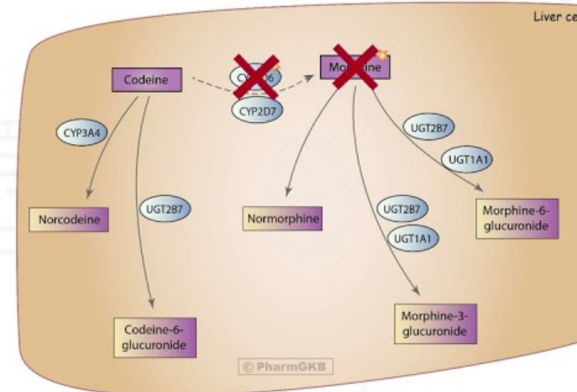


Inhibitory zpětného vychytávání noradrenalinu a serotoninu
- léčba obsedantně kompulsivní poruchy a deprese

Metabolism of codeine by CYP2D6 → formation of morphine

CYP2D6 ultrarapid metabolizers → increased formation of morphine → increased risk of toxicity

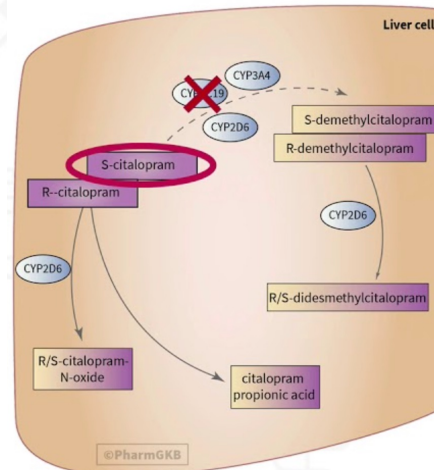
CYP2D6 poor metabolizers → greatly reduced formation of morphine → inadequate pain relief



Metabolism of S-citalopram by CYP2C19 → reduces drug activity

CYP2C19 ultrarapid metabolizers → increased metabolism of S-citalopram → lower plasma concentrations

CYP2C19 poor metabolizers → reduced metabolism of S-citalopram → higher plasma concentrations and risk of side effects.



Vyvrácení 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

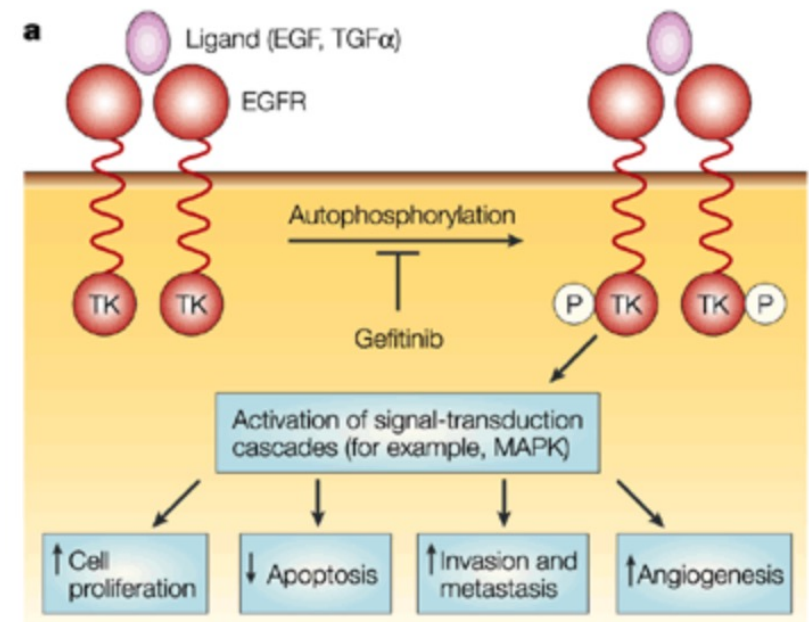
(vliv genetiky, vliv prostředí – interakce složek potravy)

Farmakokinetika

→ toxicita, rezistence

Farmakodynamika – přítomnost molekulárních změn
(např. mutace v genu KRAS => necitlivost na anti-EGFR léčbu – gefitinib, erlotinib)

→ rezistence



Vyvrácení 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

→ toxicita, rezistence

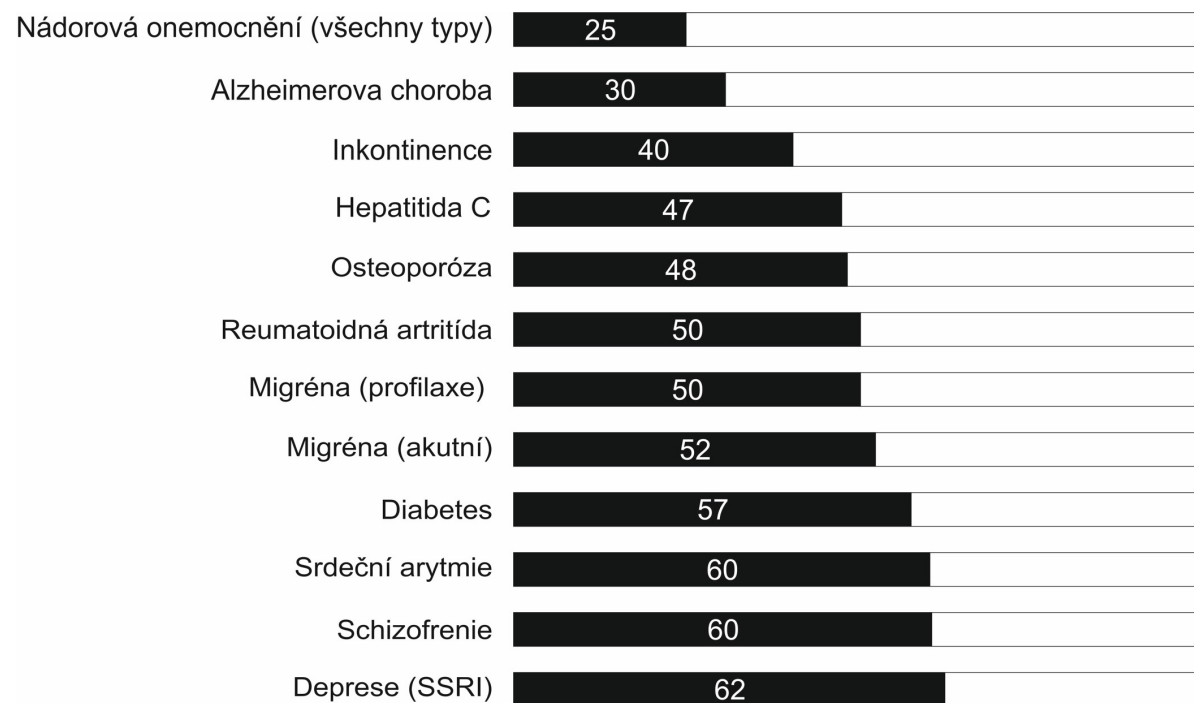
Farmakodynamika

→ rezistence

Předpoklad farmakogenetiky a farmakogenomiky:

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

Vyvrácení dogmatu jedna nemoc = jedna léčba



Průměrné procento léčebné odpovědi u nejčastějších onemocnění

„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

Historie molekulární medicíny – Buněčná teorie

Jan Evangelista Purkyně
(1787, Libochovice – 1869, Praha)

Základy buněčné teorie

1837

pražské Karolinum -
přisoudil buňkám jejich stěžejní
význam pro život

1839 - protoplazma

*“O primitivní substanci ve
vezikulech (buňkách)
rostlinného a živočišného
embryonálního těla”*

ALE

“... buňky vznikají z neživé hmoty ...”



**Matthias Schleiden a
Theodor Schwann**

1838 a 1839

Formulovali buněčnou teorii

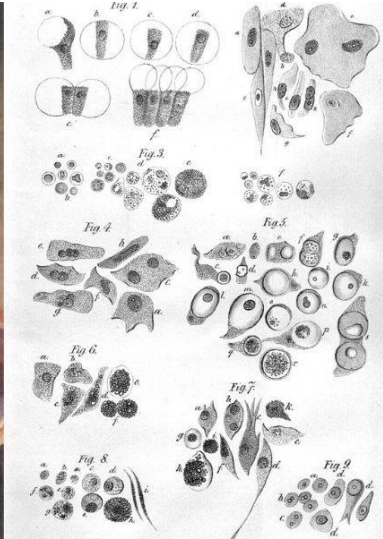
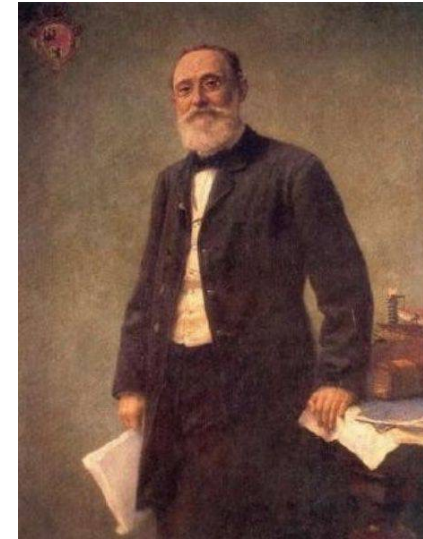
*“... veškeré živé organizmy
jsou tvořeny jednou či více
buňkami a ta je základní
strukturní jednotkou všech
organism ...”*

ALE

*“... všechny buňky vznikají z
blastému ...”*



Rudolf Ludwig Karl Virchow
(1821 – 1902)



1855

Potvrdil buněčnou teorii

“Omnis cellula e cellula”

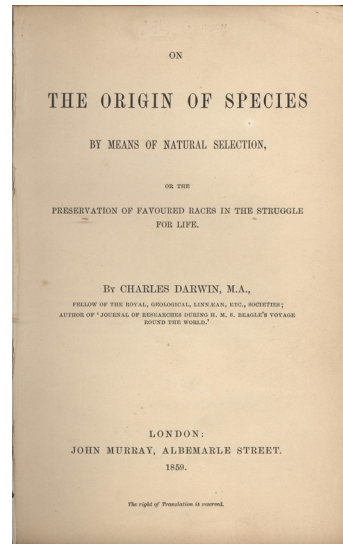
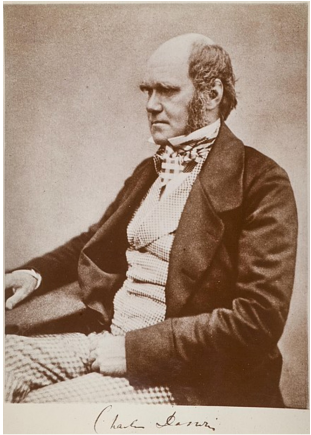
Každá buňka pouze z buňky



Heinrich Schliemann, Trója

Historie molekulární medicíny – Evoluční teorie

Charles Darwin
(1809 – 1882)



1859

On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life

O vzniku druhů přírodním výběrem, neboli uchováním prospěšných plemen v boji o život

1858 - Alfred Russel Wallace
(Wallecova linie, Malajsie)

1871

„Pohlavní výběr závisí na převaze určitých jedinců nad druhými stejného pohlaví, což se týká propagace druhů; zatímco přírodní výběr závisí na vítězství obou pohlaví, v každém věku, za normálních podmínek života.“

1831 – 1836

1742 dnů trvající výzkumná cesta kolem světa na lodi HMS Beagle



druhá expedice lodi HMS Beagle

Historie molekulární medicíny

Johan Gregor Mendel

(1822, Hynčice – 1884, Brno)

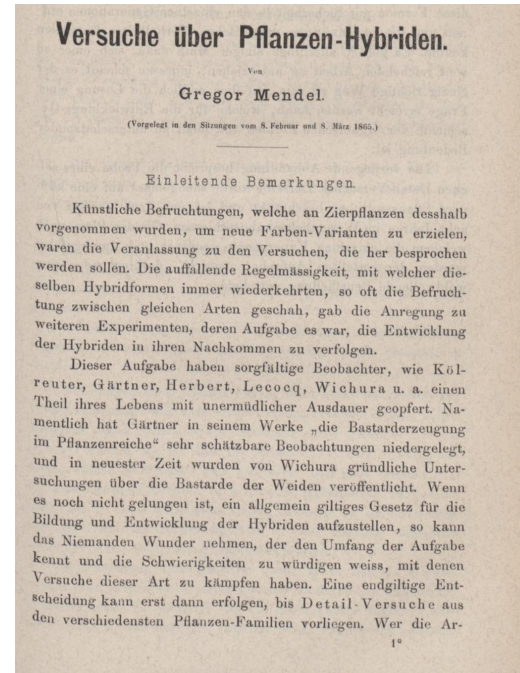


Zákon o uniformitě F1

Zákon o náhodné segregaci alel do gamet

Zákon o nezávislé kombinovatelnosti alel

semeno		květ	plod		stonek	
tvár	dělohy	barva	tvár	barva	umístění květů	velikost
kulatý	žluté	bílá	klenutý	žlutý	úžlabní	vysoké rostliny
hranatý, svraskalý	zelené	fialová	zaškrcovaný	zelený	vrcholové	nízké rostliny
1	2	3	4	5	6	7



1869 - jestřábník



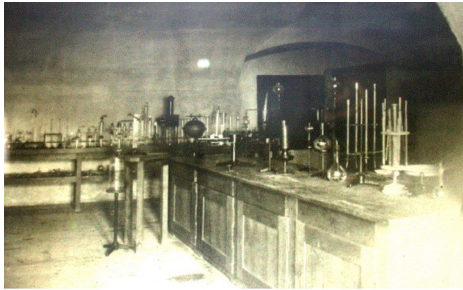
Pokusy s rostlinnými hybridy
1865 (publikováno 1866)



Historie molekulární medicíny

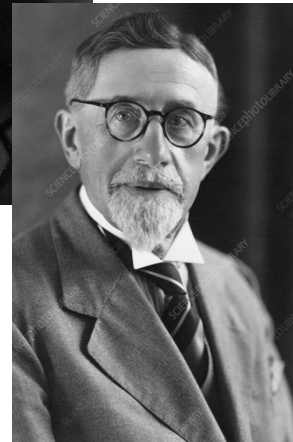
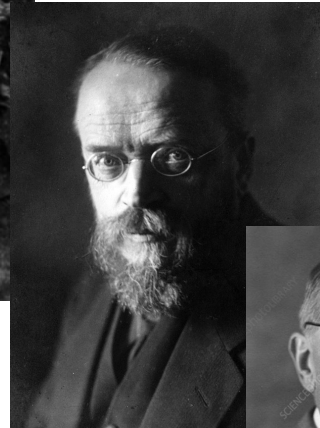
1869 – Friedrich Miescher

izolace nukleové kyseliny - **nuklein**
- z jader bílých krvinek

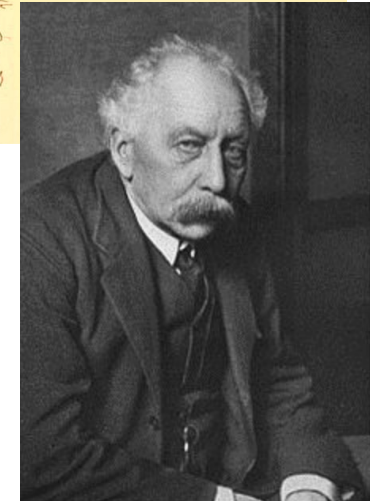
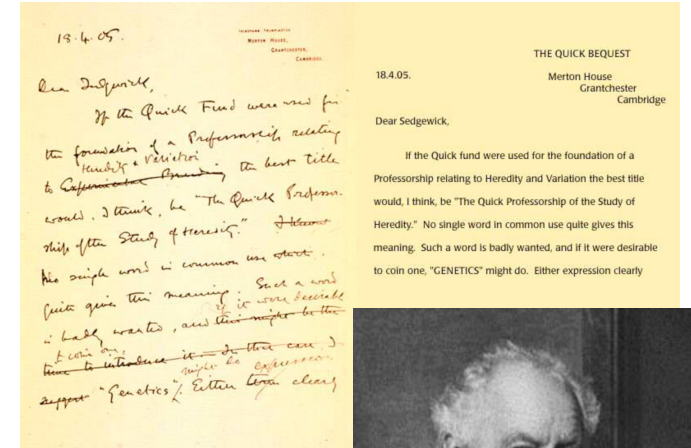


1900 – Huga de Vries

Carl Correns
Erich von Tschermak



1902 – William Bateson



genetika
homozygot
heterozygot
alelomorfa

Historie molekulární medicíny

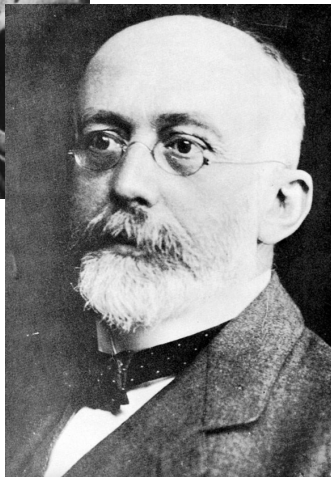
1908 – Godfrey H. Hardy
Wilhelm Weinberg

frequency of
homozygous dominant
genotype

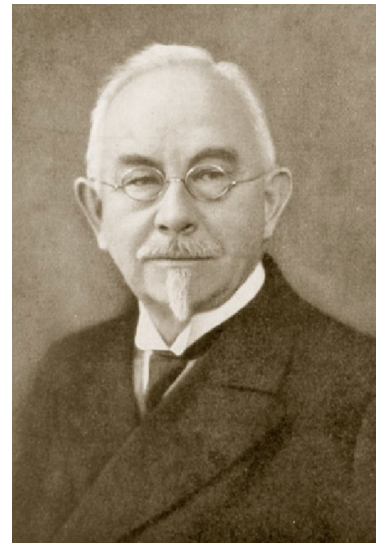
frequency of
heterozygous recessive
genotype

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

frequency of
heterozygous
genotype



1909 – Wilhelm Johannsen



gen, genotyp, fenoty

1909 – Thomas Hunt Morgan



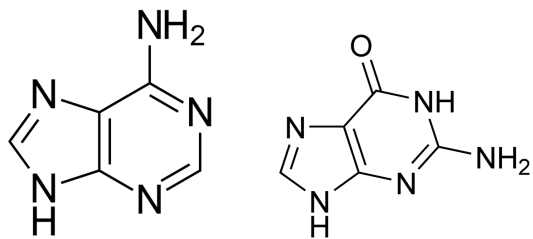
1933 – Nobelova cena

Historie molekulární medicíny

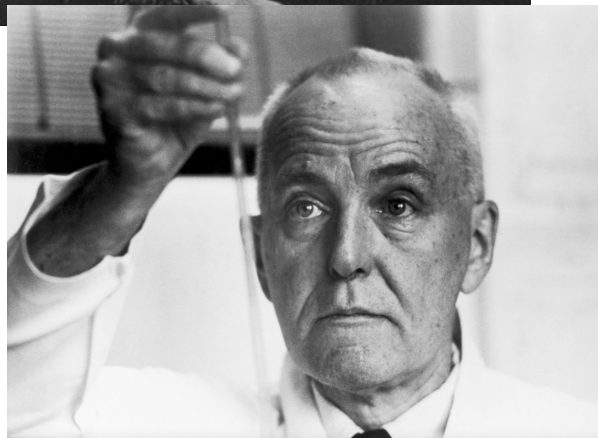
1910 – Albrecht Kossel



1910 – Nobelova cena

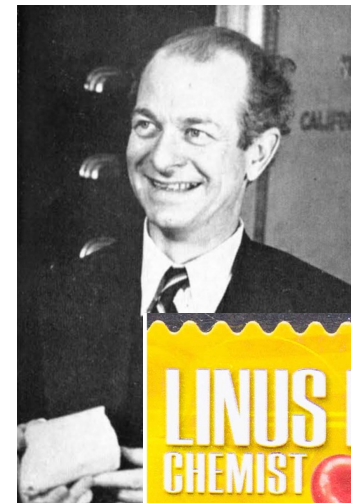


1911 – Peyton Rous



1966 – Nobelova cena

1949 – Linus Pauling



příčinou anémie srpkovitých buněk je
“nenormálnost” hemoglobinu
-> cesta ke zkoumání geneticky získaných
mutací na molekulární úrovni

beta-řetězec 6. pozice - k. glutamová -> valin

Historie molekulární medicíny

1950 – 1959

Stanley Cohen

Rita Levi-Montalcini



1986 – Nobelova cena

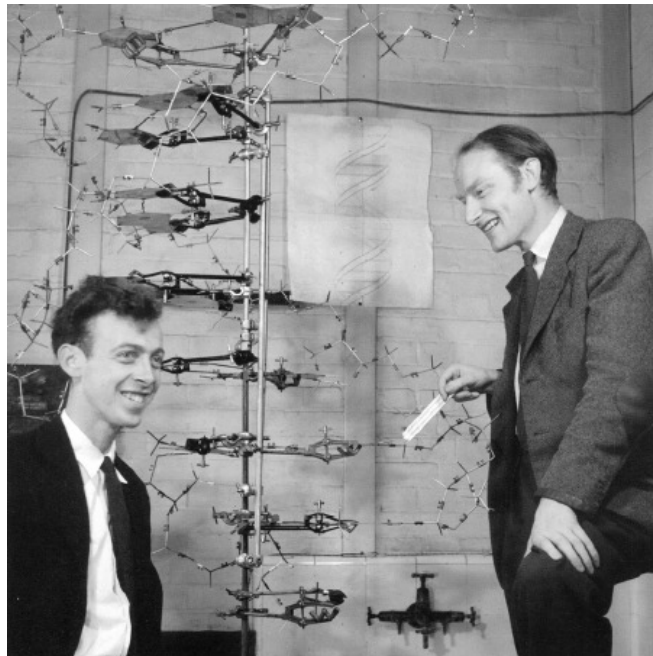
Izolace nervového růstového faktoru

1953 – James D. Watson

Francis H. C. Crick

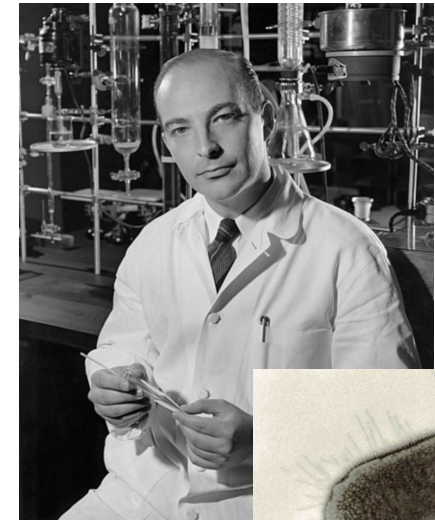
Rosalind Franklinová

Maurice Wilkins



1962 – Nobelova cena

1957 – Arthur Kornberg



DNA polymeráza

Severo Ochoa a Arthur Kornberg
za objev mechanismu biosyntézy
RNA a DNA

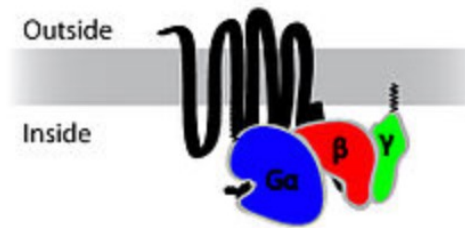
1959 – Nobelova cena

Historie molekulární medicíny

1957 – Francis Crick
George Gamow

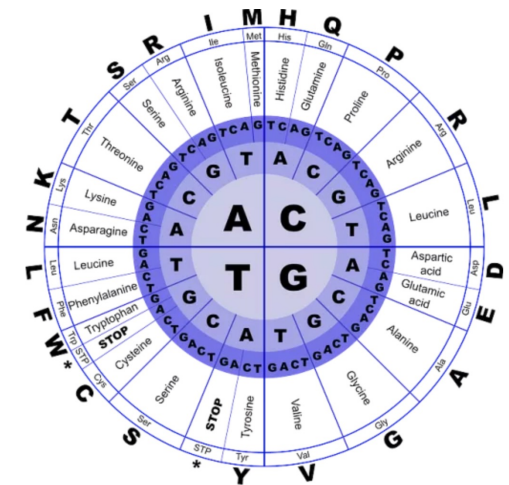


1960 – Alfred G. Gilman
Martin Rodbell



1994 – Nobelova cena

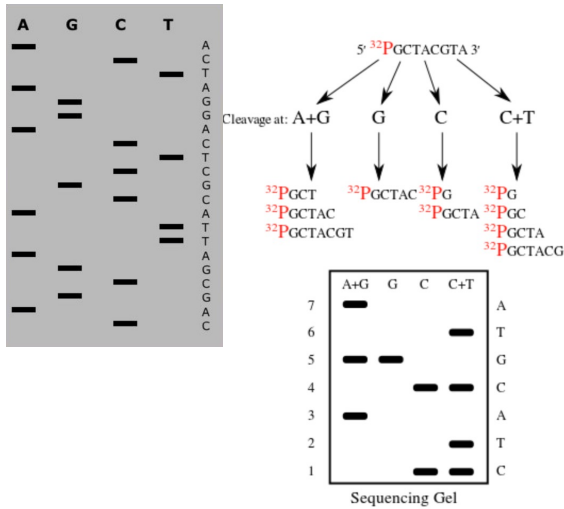
1966 – Marshal W. Nirenberg
Heinrich Mathaei
Severo Ochoa



1968 – Nobelova cena

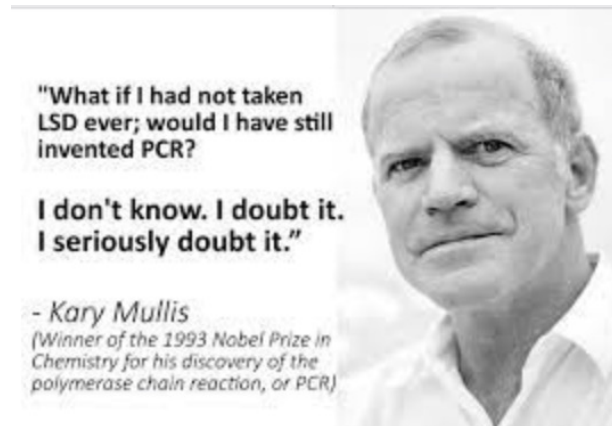
Historie molekulární medicíny

1975 – 1977
 Frederik Sanger
 Walter Gilbert
 Paul Berg



1980 – Nobelova cena

1983 – Kary Mullis

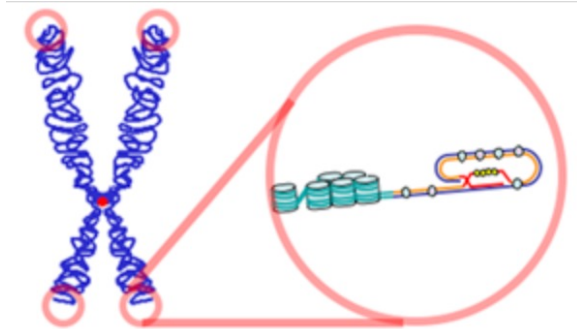


1993 – Nobelova cena

1983 – Robert Weinberg

Objev prvního lidského onkogenu RAS

1984 – Elizabeth Blackburnová,
 Carol W. Greiderová
 Jack W. Szostak



2009 – Nobelova cena

Historie molekulární medicíny – Genová terapie

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 - Ashanthi DeSilva

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



Historie molekulární medicíny – projekt HUGO (1988 – 2001)

1985-1990: diskuse o sekvenování lidského genomu
– “nebezpečné” - “nesmyslné” - “nemožné”

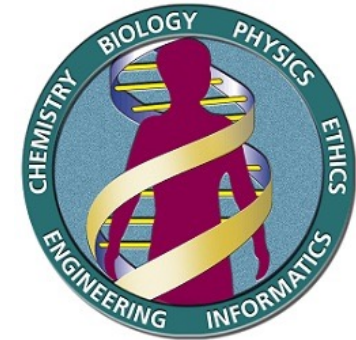
1988-1990: Založen HUMAN GENOME PROJECT (HGP)

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



Historie molekulární medicíny – projekt HUGO (1988 – 2001)

Květen 1998

- 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.

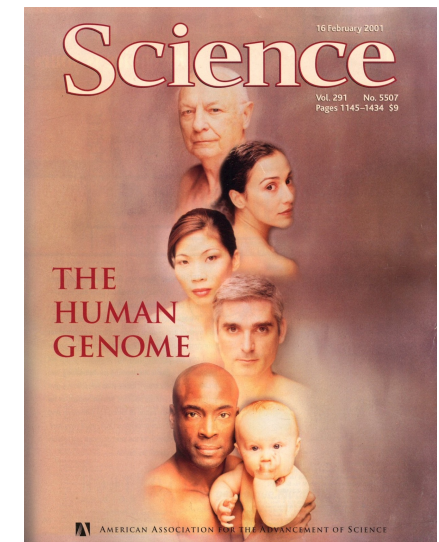
Celera Genomics & akad. spolupracovníci publikují draft genomu *Drosophila melanogaster* (cca 2/3 z 180 Mbp)

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

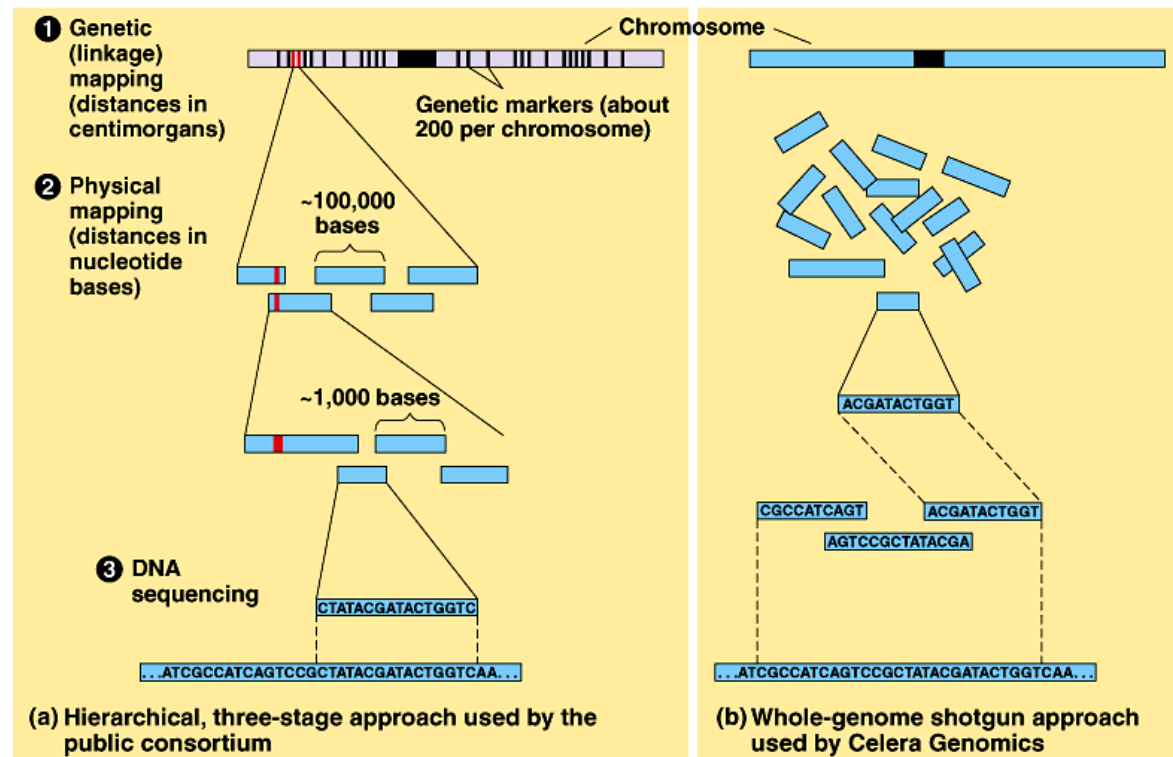
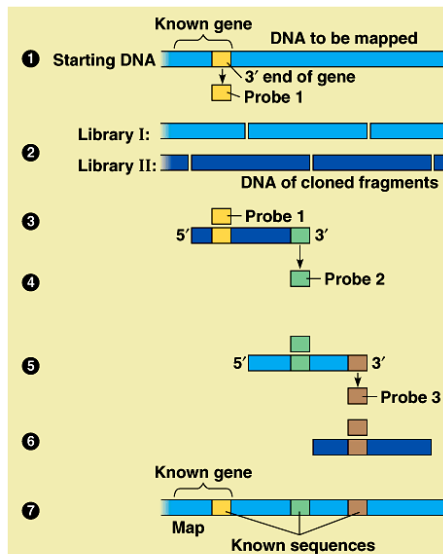
Únor 2001 - Remíza

HGP publikuje draft lidského genomu v časopisu Nature 15.2.2001.

Celera Genomics publikuje svou sekvenci lidského genomu v Science 16.2.2001.



Historie molekulární medicíny – projekt HUGO (1988 – 2001)



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.

Historie molekulární medicíny – sekvenace individuálních genomů



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^{1*}, Granger Sutton¹, Pauline C. Ng¹, Lars Feuk², Aaron L. Halpern¹, Brian P. Walenz¹, Nelson Axelrod¹, Jiaqi Huang¹, Ewen F. Kirkness¹, Gennady Denisov¹, Yuan Lin¹, Jeffrey R. MacDonald², Andy Wing Chun Pang², Mary Shago², Timothy B. Stockwell¹, Alexia Tsiamouri¹, Vineet Bafna³, Vikas Bansal³, Saul A. Kravitz¹, Dana A. Busam¹, Karen Y. Beeson¹, Tina C. McIntosh¹, Karin A. Remington¹, Josep F. Abril⁴, John Gill¹, Jon Borman¹, Yu-Hui Rogers¹, Marvin E. Frazier¹, Stephen W. Scherer², Robert L. Strausberg¹, J. Craig Venter¹

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.

Historie molekulární medicíny – sekvenování nové generace

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^{1,2}, Norma F Neff^{1,2} & Stephen R Quake¹

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 \times 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**

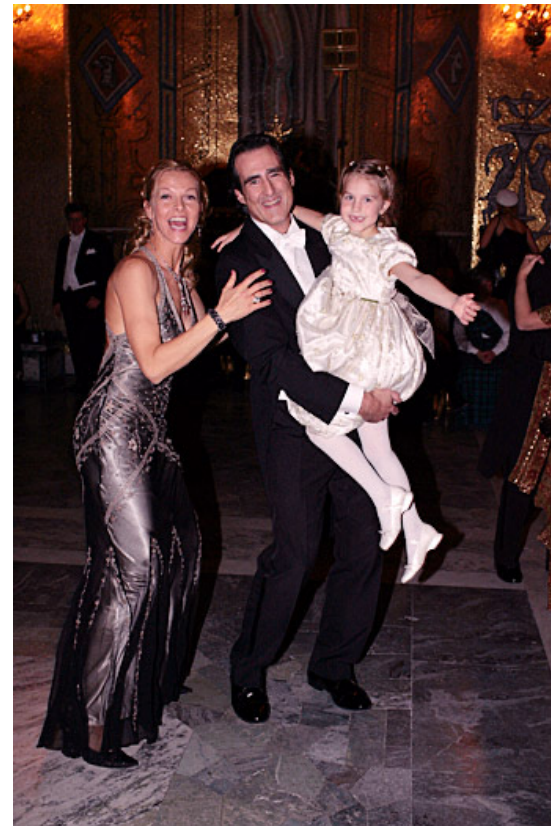
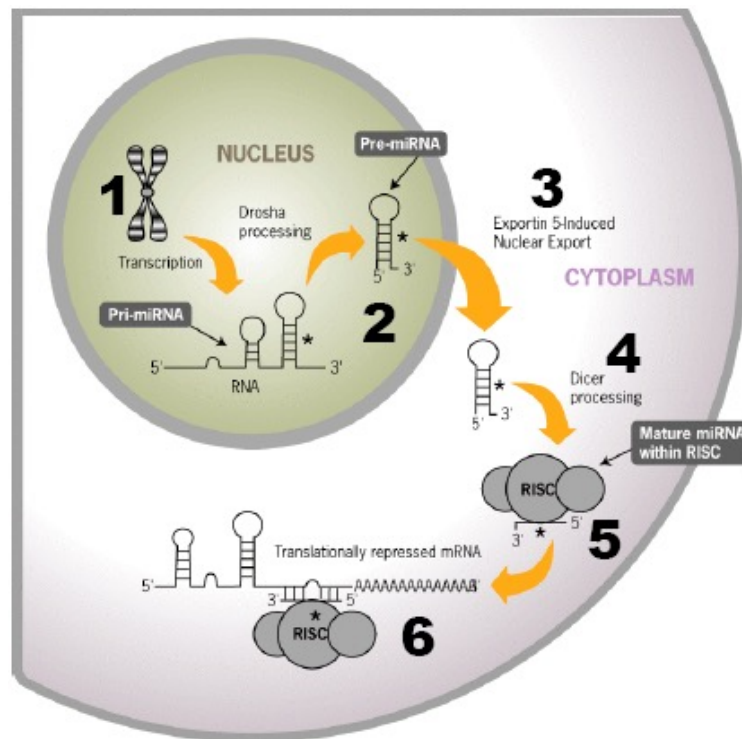
Délka projektu: 8 týdnů

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

Historie molekulární medicíny

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



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