

CG020 Genomika

Přednáška 11

Praktické aplikace funkční genomiky

Markéta Pernisová

Funkční genomika a proteomika, NCBR
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno
pernisov@sci.muni.cz



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Osnova

1. Genomika v medicíně
2. Biotechnologie
3. Geneticky modifikované organizmy
4. GMO – pro a proti
5. Diskuze

GENOMIKA V MEDICÍNĚ



GENOMIKA V MEDICÍNĚ

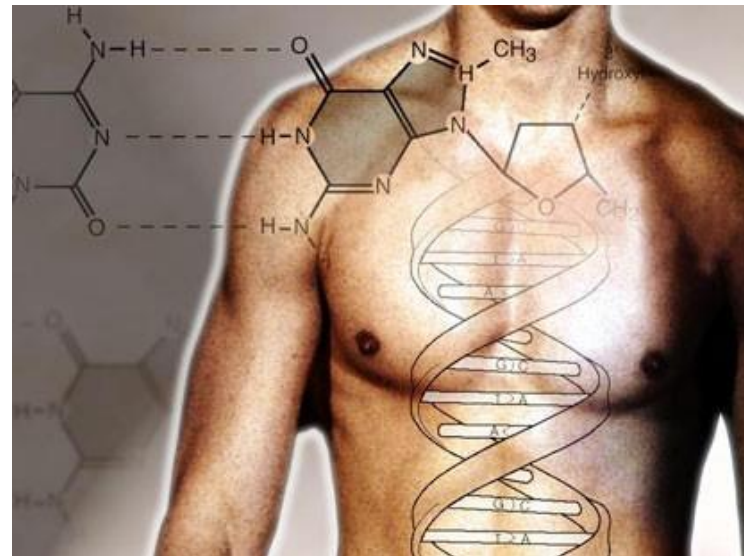
- **Biotechnologie** spolu s **genovou technologií** je klíčovým faktorem v pokroku lékařství
- Zlepšení v praxi:
 - zrychlená identifikace a analýza nových patogenů
 - zrychlení vývoje a výroby vakcín a spolehlivých diagnostických nástrojů
 - genetické testy pro screening dědičných chorob nebo pro určení závažné genetické vady embrya či plodu
- Mnohé léky vyráběné laboratorně:
 - bakterie, kvasinky a živočišné buňky produkují lidské proteiny, které jsou dostupné jako léky
 - ve vývoji jsou např. požitelné vakcíny produkované transgenními rostlinami
 - 1. biotech lék: inzulin, 1982

GENOMIKA V MEDICÍNĚ

- Vliv genomiky na lékařství:
 - znalost genomu nás může dovést až k původu nemoci – mutantnímu genu - nesprávná funkce proteinu
 - rozpoznání takového genu umožní screening nemoci
 - pochopení vlivu genů na účinky léku a vznik vedlejších účinků
 - odhadnout individuální genetické predispozice
 - zlepšuje se efektivnost nových přístupů k léčbě nemocí
 - znalost bakteriálních a virových genomů pomáhá snadněji identifikovat mechanismy infekcí, a tak zlepšovat jejich prevenci a léčbu, a také vývoj vakcín
 - výzkum genomu může také pomoci pochopit proces stárnutí, a tak zlepšit kvalitu života starších lidí

GENOMIKA V MEDICÍNĚ

- Využití genomiky v medicíně:
 - genetická diagnóza
 - individualizovaná medicína
 - genová terapie
 - regenerativní medicína
 - xenotransplantace
 - molekulární *in vitro* systémy ke studiu lidských nemocí



GENETICKÁ DIAGNÓZA

- test provedený pro **identifikaci specifických genetických rysů** jedince
- není potřeba znát sekvenci celého genomu
- využití pro:
 - objasnění, zda se nemoc objevila jako výsledek změn specifických genetických rysů
 - potvrzení a zpřesnění standardních lékařských diagnóz již zjevného onemocnění
 - identifikaci dědičných nemocí před jejich projevem
 - před implantací embrya oplodněného *in vitro*
 - hodnocení individuálních dispozic jedince pro vývoj určitých nemocí během života
 - DNA otisk při vyšetřování zločinu nebo určování otcovství

INDIVIDUALIZOVANÁ MEDICÍNA

= „personalized medicine“

Lékařský přístup, který klade důraz na systematické využití informací o jednotlivém pacientovi za účelem vytvoření individuálně optimalizovaného preventivního a terapeutického plánu.

- Předpoklady:
 - detailní znalost genomu pacienta, ideálně kompletní genomová sekvence
 - znalosti funkce jednotlivých genů včetně funkčních odlišností jednotlivých alel zastoupených v populaci
 - korelace genomových sekvencí s prognózami onemocnění, s úspěšností terapeutických postupů ...

INDIVIDUALIZOVANÁ MEDICÍNA

- Využívá znalosti genomu k:
 - predikce zdravotních rizik
 - upřesnění diagnózy
 - výběr nejvhodnějšího typu léčby
 - minimalizace vedlejších účinků léčby
 - prevence



**Personalized Medicine:
The Changing Landscape of Healthcare**

American Association of Clinical Chemistry Annual Meeting
San Diego, California

July 14th, 2007

Edward Abrahams, Ph.D.
Executive Director
Personalized Medicine Coalition

INDIVIDUALIZOVANÁ MEDICÍNA

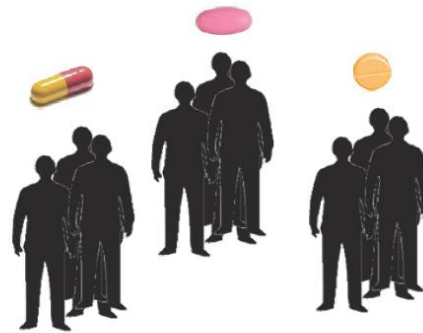
What is Personalized Medicine?

Current Practice



Trial and error

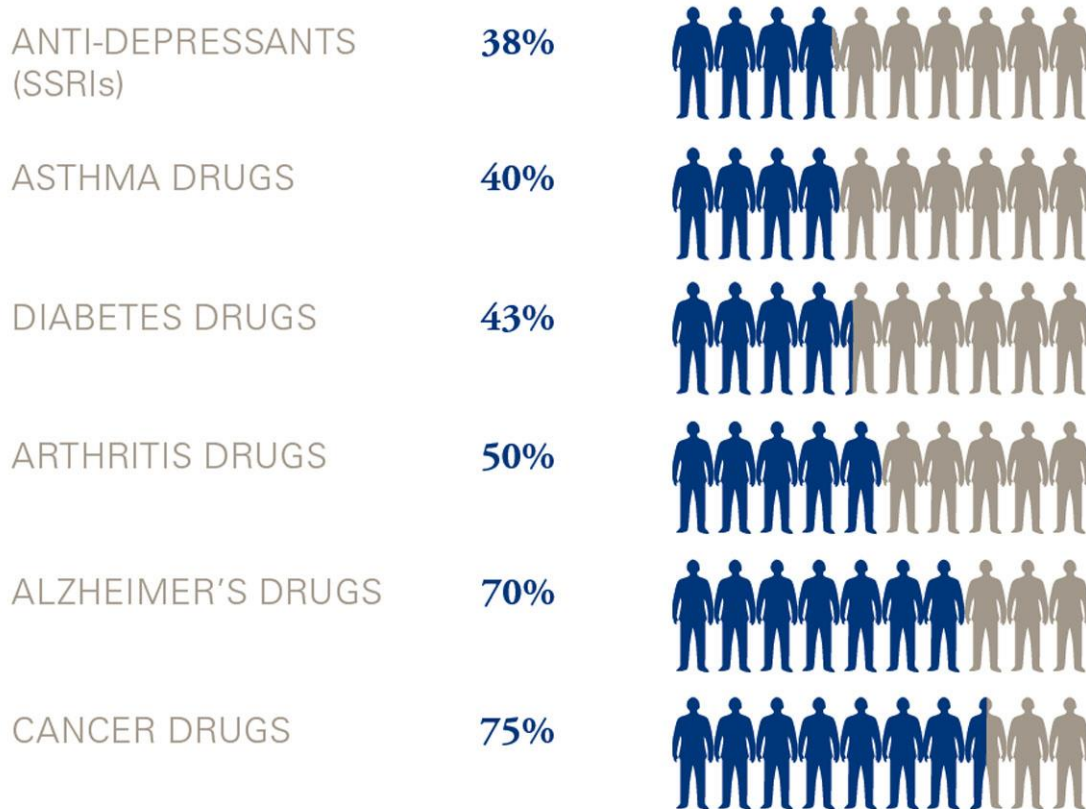
Personalized Medicine



The **right treatment** for
the **right person** at the
right time

INDIVIDUALIZOVANÁ MEDICÍNA

PERCENTAGE OF THE PATIENT POPULATION FOR WHICH A PARTICULAR DRUG IS INEFFECTIVE, ON AVERAGE



- Just in hospitals: about 6.7% of patients (2.2 million) experience serious adverse drug reactions



Serious adverse drug reactions in even smaller percentages of treated populations have led to the withdrawal of several drugs from the market

Zelnorm

Vioxx

Cylert

“Are good drugs going to the wrong people?”

Rezulin

Baycol

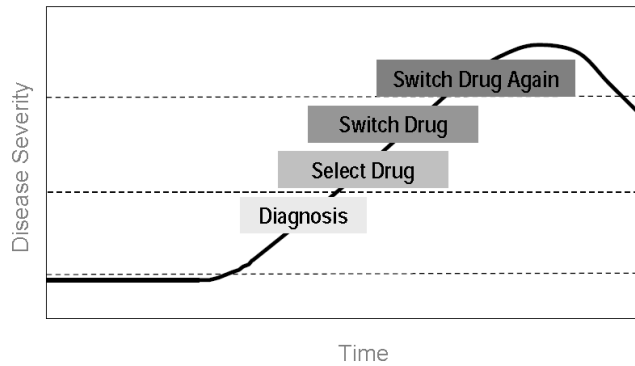
Lotronex*

Source of data: Brian B. Spear, Margo Heath-Chiozzi, Jeffery Huff, “Clinical Trends in Molecular Medicine,” Volume 7, Issue 5, 1 May 2001, Pages 201-204.

INDIVIDUALIZOVANÁ MEDICÍNA

The Old Paradigm: Treatment of Disease

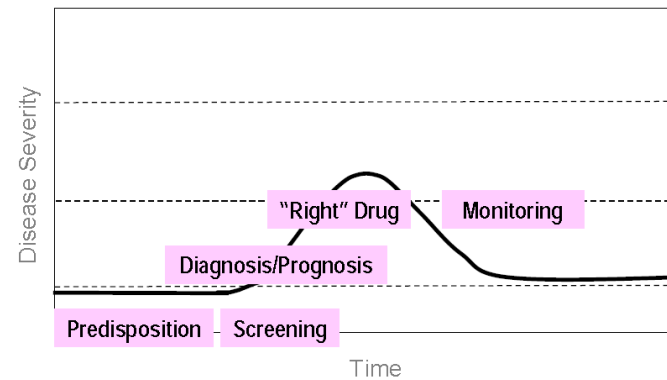
Reactive Medical Care



Diagnose Disease; Treat Symptoms; Costly, Trial and Error Treatment

Personalized Medicine Paradigm: Health Management

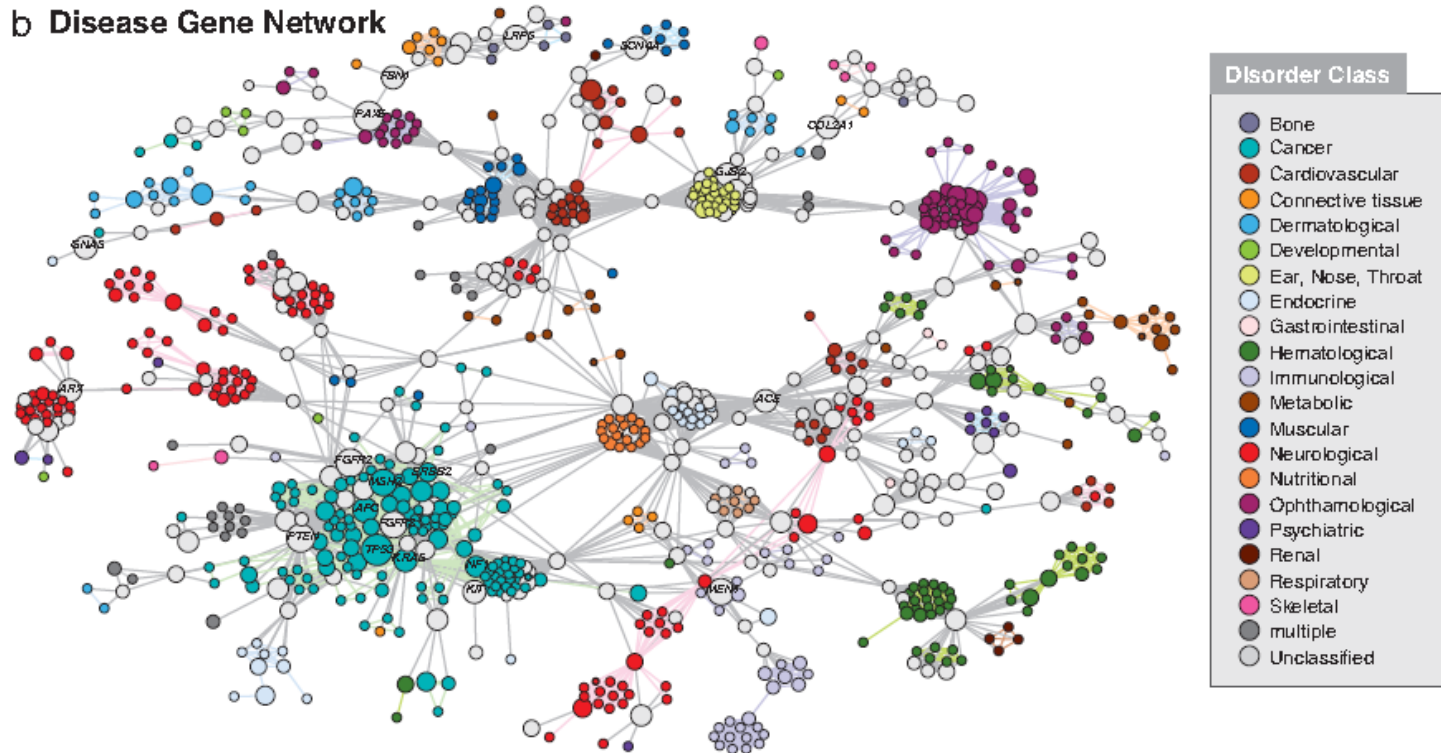
Efficient Medical Care



**Health Management; Molecular Screening; Early Detection;
Rapid Effective Treatment; Improved Quality of Care**

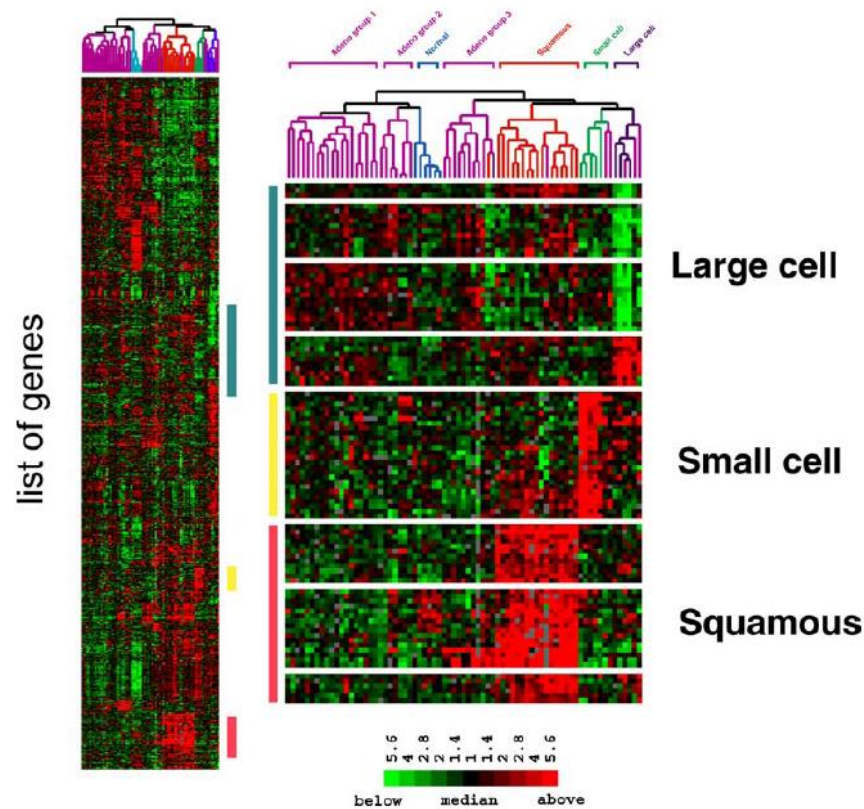
INDIVIDUALIZOVANÁ MEDICÍNA

- Problém:
 - multigenová podmíněnost většiny lidských onemocnění



INDIVIDUALIZOVANÁ MEDICÍNA

- Řešení:
 - systémová biologie - využívá např. genové klastrování pro identifikaci genů podílejících se na pozorovaných jevech



Topotecan-
resistant

Topotecan-
sensitive

Dietel and Sers, 2006

INDIVIDUALIZOVANÁ MEDICÍNA

- Řešení:
 - biomarkry
 - testy

Table: Selected Personalized Medicine Drugs, Treatments and Diagnostics as of September 2011*

Indications in quotes and otherwise unattributed, are cited from the therapeutic or diagnostic product label.

Therapeutic product labels contain pharmacogenomic information as:

Information only

Recommended

Required

Unhighlighted products have no pharmacogenomic information, recommendations or requirements in the label.

THERAPY	BIOMARKER/TEST	INDICATION
Mivacron® (mivacurium)	Cholinesterase gene	Anesthesia adjunct: "Mivacron is metabolized by plasma cholinesterase and should be used with great caution, if at all, in patients known to be or suspected of being homozygous for the atypical plasma cholinesterase gene."
Ansaid® (flurbiprofen)	CYP2C9	Arthritis: " <i>In vitro</i> studies have demonstrated that cytochrome P450 2C9 plays an important role in the metabolism of flurbiprofen to its major metabolite, 4'-hydroxy-flurbiprofen."
Depakote® (divalproex)	UCD (NAGS; CPS; ASS; OTC; ASL; ARG)	Bipolar disorder: "Hyperammonemic encephalopathy, sometimes fatal, has been reported following initiation of valproate therapy in patients with urea cycle disorders [UCDs]...particularly ornithine transcarbamylase deficiency [OTC]."
Aromasin® (exemestane) Arimidex® (anastrozole) Nolvadex® (tamoxifen)	Estrogen Receptor (ER)	Breast cancer: Exemestane is indicated for adjuvant treatment of postmenopausal women with ER-positive early breast cancer. Anastrozole is for treatment of breast cancer after surgery and for metastases in postmenopausal women. Tamoxifen is the standard therapy for estrogen receptor-positive early breast cancer in premenopausal women.
Chemotherapy	Mammostrat®	Breast cancer: Prognostic immunohistochemistry (IHC) test used for postmenopausal, node negative, estrogen receptor expressing breast cancer patients who will receive hormonal therapy and are considering adjuvant chemotherapy.
Chemotherapy	MammaPrint®	Breast cancer: Assesses risk of distant metastasis in a 70-gene expression profile.
Chemotherapy	OncoType DX® 16-gene signature	Breast cancer: A 16-gene signature (plus five reference genes) indicates whether a patient has a low, intermediate, or high risk of having a tumor return within 10 years. Low-risk patients may be treated successfully with hormone therapy alone. High-risk patients may require more aggressive treatment with chemotherapy.
Chemotherapy	CompanDx® 31-gene signature	Breast cancer: The test predicts "time to event" for metastasis of breast cancer, following surgery or biopsy.
Faslodex® (fulvestrant)	Hormone Receptor (HR)	Breast cancer: Fulvestrant is indicated for the treatment of hormone receptor positive metastatic breast cancer in postmenopausal women with disease progression following anti-estrogen therapy.
Herceptin® (trastuzumab) Tykerb® (lapatinib)	HER-2/neu receptor	Breast cancer: "...for the treatment of patients with metastatic breast cancer whose tumors overexpress the HER-2 [Human Epidermal growth factor Receptor 2] protein and who have received one or more chemotherapy regimens for their metastatic disease." High levels of HER-2 expression have been associated with increased disease recurrence in breast cancer, but show a better response to trastuzumab.
Pharmaceutical and surgical prevention options and surveillance	BRCA 1/2	Breast cancer: Guides surveillance and preventive treatment based on susceptibility risk for breast and ovarian cancer.
Nolvadex® (tamoxifen)	Breast Cancer Index™ (HOXB13, IL17BR)	Breast cancer: Calculates a combined risk analysis for recurrence after tamoxifen treatment for ER-positive, node-negative breast cancer.

INDIVIDUALIZOVANÁ MEDICÍNA

- Určité problémy
 - Etická otázka:
 - podmínkou je genetické testování nebo znalost genomu – lehce zneužitelné
 - riziko: nedostatečné zabezpečení údajů
 - v některých zemích zaměstnavatelé ani pojišťovny nemají přístup k těmto údajům
 - Vysoké náklady – rizika:
 - medicína by se mohla rozdělit na prvotřídní a podřadné služby
 - globalizační propast by se mohla ještě prohloubit – chudé země by si toto nemohly dovolit
 - Ochrana údajů:
 - zásadní a komplexní otázka

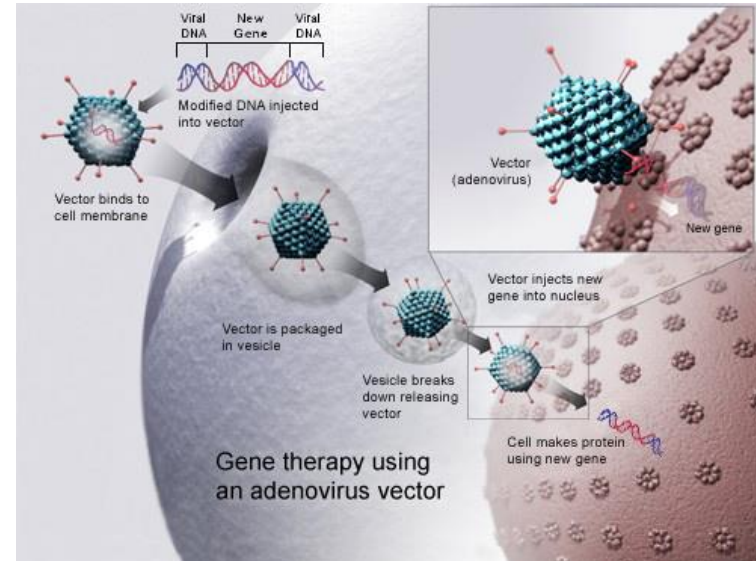
GENOVÁ TERAPIE

Postup, při němž je do genomu pacienta vložena sekvence DNA, která má **nahradit** nebo doplnit funkci určitého **genu**

- Možnosti:
 - nahradit mutovaný gen
 - opravit mutaci
 - dodat DNA kódující terapeutický protein
 - antisense terapie
- V budoucnu použitelné k léčbě např. dědičných onemocnění
- Typy:
 - somatická genová terapie
 - genová terapie zárodečných buněk

GENOVÁ TERAPIE

- Metody:
 - virové vektory
 - retroviry
 - adenoviry
 - herpes simplex virus
 - vektory schopné replikace
 - neviróvé metody
 - injekce DNA plazmidu do svalů
 - zvýšení efektivity dodávané DNA:
 - elektroporace
 - sonoporace
 - „gene gun“
 - magnetofekce
 - hybridní metody



REGENERATIVNÍ MEDICÍNA

Cílem je **obnova** nemocných či poraněných **orgánů** či tkání.

- překonání současných problémů transplantace:
 - nedostatek dárců
 - riziko odmítnutí
 - těžké imunosupresivní kúry
- terapeutické klonování - buněčné terapie, která používá kmenové buňky k vytváření zdravých kopií buněk či tkání nemocného člověka
- potenciální lékařské aplikace: léčba degenerativních onemocnění jako je Parkinsonismus, mrtvice, poškození jater, diabetes, popáleniny ...

REGENERATIVNÍ MEDICÍNA

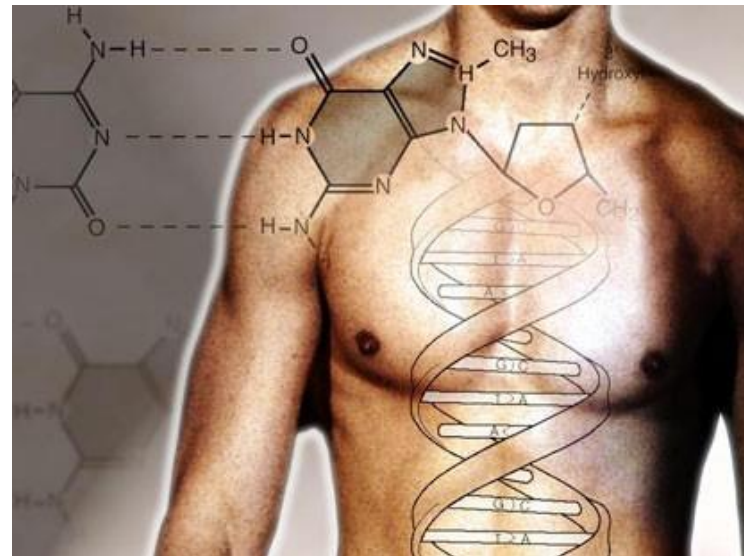
- embryonální kmenové buňky živočichů již byly úspěšně programovány, aby se vyvinuly v neurální, svalové nebo jiné typy buněk - slibné výsledky

Etické otázky: buňka vajíčka je použita pro vznik embrya, které se nemá dále vyvinout v organismus. Namísto toho, po 5-6 dnech vývoje se z něj extrahují embryonální kmenové buňky; což zničí embryo. V závislosti na definici momentu, od kterého musí být chráněn lidský život, lze tento postup považovat za vytvoření lidského života za účelem jeho zničení, a tudíž je zakázán.

- Důsledek etické diskuze: podpora výzkumu dospělých embryonálních kmenových buněk

GENOMIKA V MEDICÍNĚ

- Využití genomiky v medicíně:
 - genetická diagnóza
 - individualizovaná medicína
 - genová terapie
 - regenerativní medicína
 - xenotransplantace
 - molekulární *in vitro* systémy ke studiu lidských nemocí



BIOTECHNOLOGIE

BIOTECHNOLOGIE

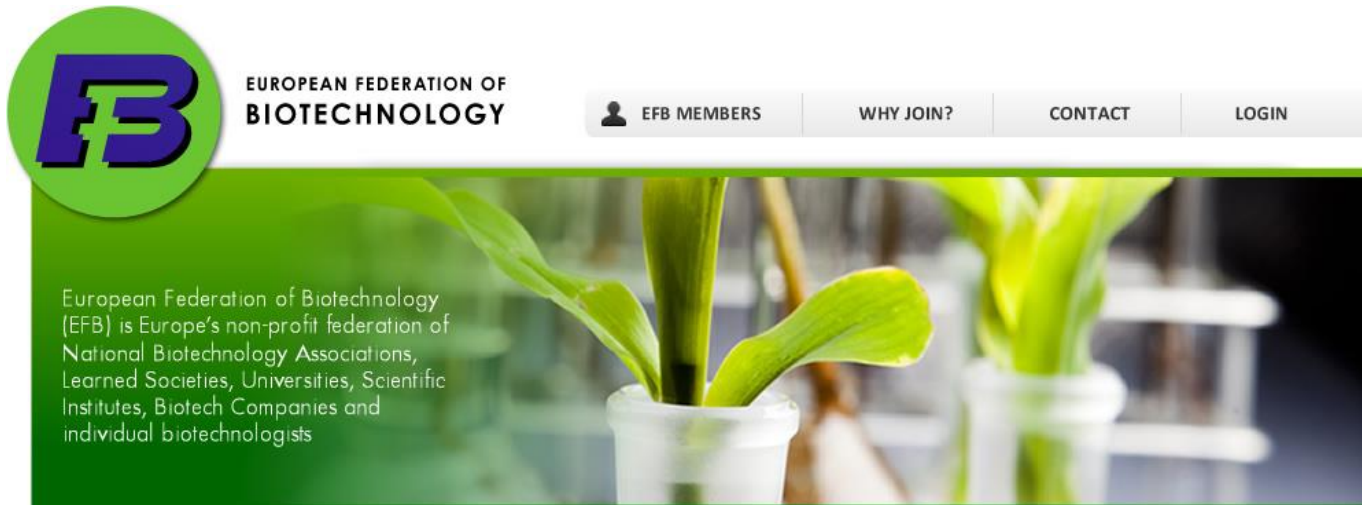
- Využívá živé organismy, buňky nebo jejich části (enzymy) k výzkumu, jehož poznatky pak dávají vzniknout novým produktům a aplikacím v medicíně, zemědělství, potravinářství, ochraně životního prostředí a alternativních metodách výroby v chemickém průmyslu či jiných průmyslových procesech.
- **Interdisciplinární přístup**, která je ovlivňován chemií, biologií, fyzikou, materiálovými naukami, inženýrstvím a informatikou.
- Původ biotechnologie se dá vystopovat 4 tisíce let zpátky, když Sumeři (aniž by o tom věděli) používali mikroby pro výrobu alkoholických nápojů.

BIOTECHNOLOGIE

- **moderní biotechnologie** často pozměňuje genetické uspořádání buněk a organismů s cílem optimalizovat procesy, např. chemickou či fyzikální úpravou, buněčnou fúzí nebo genovým inženýrstvím.
- **genové inženýrství** modifikuje izolované nukleové kyseliny
- pojmy moderní biotechnologie a genové inženýrství jsou často používány jako synonyma - genové inženýrství je ve skutečnosti pouhým odvětvím biotechnologie
- genové inženýrství – GMO organizmy

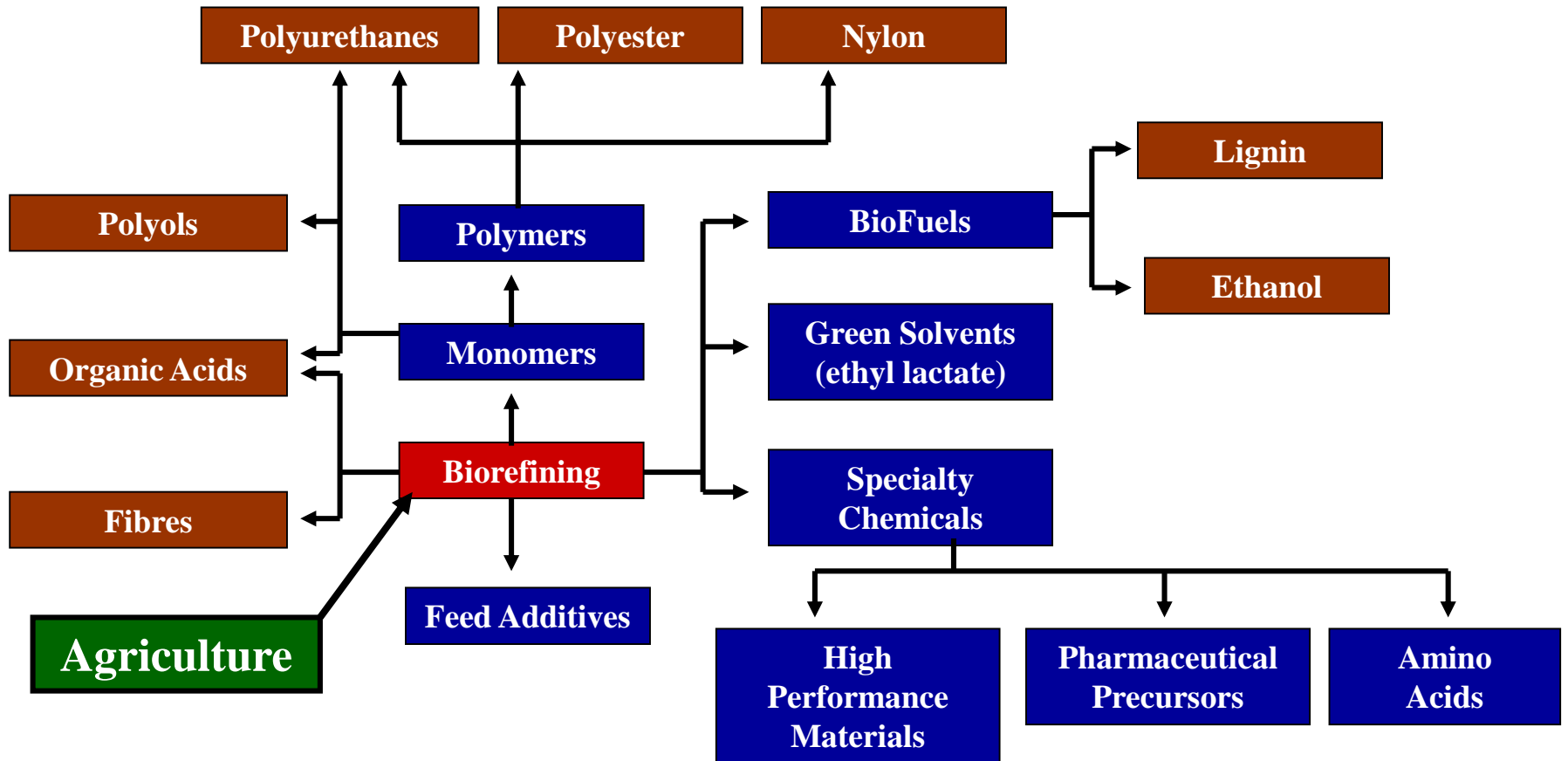
BIOTECHNOLOGIE

- Příklady:
 - efektivní využití rostlinné biomasy pro výrobu paliv
 - získávání základních jednotek pro výrobu polymerních látek z živých organismů místo z fosilních zdrojů
 - fytofarmaceutika – nové metody vakcinace jako je například exprese protilátek nebo antigenů vhodných k imunizaci v rostlinách
- European Federation of Biotechnology



ROSTLINNÉ BIOTECHNOLOGIE

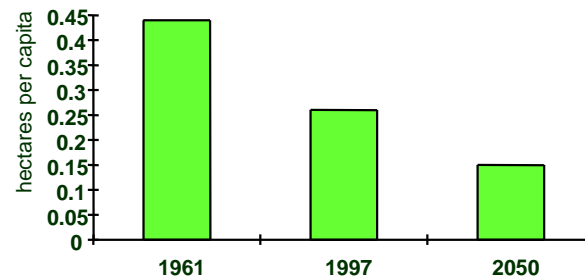
The Biorefinery platform using Agricultural Feed Stocks



ROSTLINNÉ BIOTECHNOLOGIE

- Příklady:
 - produkce pavoučích vláken
 - produkce degradovatelných biopolymerů
 - produkce polypeptidů podobných elastinu (složka živočišných tkání)
 - produkce vakcín a protilátek
 - lidské (HIV, TNF)
 - živočišné (veterinární)
 - imunomodulace rostlinných hormonů

FAKTA K ZAMYŠLENÍ



Source: UN Millennium Ecosystem Assessment

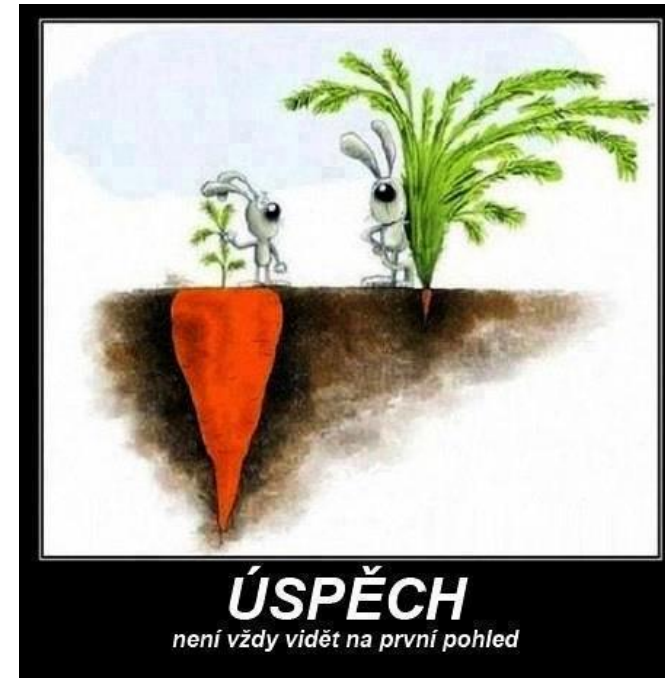
- naše civilizace je postavena na zemědělství, za 10000 let jeho existence klesla plocha potřebná k obživě jedince o 90%
- k zabránění kolapsu je třeba tuto plochu dále snížit (ze současných 0,45 ha/osobu na 0,2 ha/osobu a to do roku 2050)
- návrat k původním metodám zemědělství by byl návratem k původním nárokům na plochu k obživě a je tedy dlouhodobě neudržitelný
- intenzivní zemědělství = konverze vody a ropy na potraviny
- cílem rostlinných biotechnologií je využít všech dostupných poznatků vědy ke šlechtění odrůd s větším výnosem při menších nákladech na vodu, hnojiva, postřiky ...

GENETICKY MODIFIKOVANÉ ORGANIZMY



ŠLECHTĚNÍ

- genetický základ organismů se přirozeně mění mutacemi
- před érou genetického inženýrství **otázka náhody**
- nástroje šlechtitelů:
 - výběr a křížení
- výběr:
 - pozitivní nebo negativní
- výsledky byly náhodné
- moderní šlechtitel se naučil pozměňovat dědičnou informaci
 - chemicky, zářením ...

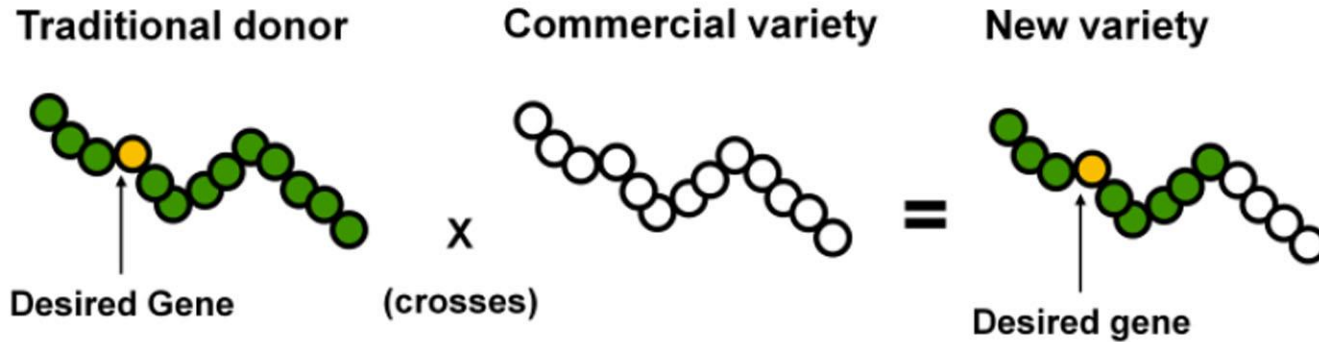


GENOVÉ INŽENÝRSTVÍ

- Objev
 - struktury DNA (1953)
 - restričních enzymů
 - plazmidů
- **cílená změna** („cílené šlechtění“)
- 1973 – bakterie produkuje žabí protein
- technika rekombinantní DNA = „stříhání genů“ = genové inženýrství
- možnost přenášet geny = transgenóza
- dle zákona: genetická modifikace
- výsledek: **GMO**
- první praktické využití: příprava lidského inzulínu v bakterii - 1978



ŠLECHTĚNÍ vs. GENOVÉ INŽENÝRSTVÍ



GENETICKY MODIFIKOVANÉ ORGANIZMY (GMO)

- Organismy, nesoucí upravenou vlastní nebo cizí (z jiného organismu) genetickou informaci, umožňující cílené změny daného organismu a jeho využití pro daný účel
- GMO:
 - rostliny
 - bakterie
 - živočichové

<http://www.gmo-compass.org/>

GMO ROSTLINY

- Využití:
 - odolnost ke škůdcům
 - odolnost k herbicidům
 - odolnost k suchu
 - odolnost k chladu
 - odolnost k zasolení
 - zvyšování využití dusíku
 - zvyšování nutričních hodnot plodin



<http://ipbo.vib-ugent.be/>

Bt PLODINY

- rezistence k hmyzím škůdcům
- gen z *Bacillus thuringiensis* (Bt)
- exprimují delta-endotoxiny (Cry proteiny)
- zvýšení výnosů, snížení množství postřiků
- kukuřice, bavlník, rýže



Corn borer damage



European corn borer damage and fungal infection in non-Bt (left) and Bt hybrids (right)

HT PLODINY

- rezistence k systémovým herbicidům
- **glyfosát**
 - zasahuje do procesu syntézy aromatických aminokyselin; živočichové nemají příslušný enzymatický aparát = neškodný
 - blokuje enzym 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázu (EPSPS) v chloroplastech – působí na zelené rostliny
 - neúčinný pro bakteriální EPSPS – evolučně rozdílný
 - sója, kukuřice, cukrová řepa, řepka, bavlník, alfalfa – přidáný enzym pro toleranci
 - firma Monsanto: Roundup
- **glufosinát (fosfinotricin)**
 - znemožňuje zpracování amoniaku – toxický
 - *Streptomyces hygroscopicus* jej syntetizují i přeměňují: acetylace enzymem fosfinotricinacetyl transferáza - v roce 1987 byl izolován kódující gen a dostal označení **bar**
 - obchodní názvy: BASTA, Liberty, Finale, Radicale ...

MULTIREZISTENTNÍ PLODINY

- Bt rezistence + herbicidy
- multirezistentní kukuřice – v USA tvoří většinu celkové produkce
- příklad multirezistentní kukuřice:
 - tři Bt geny pro rezistenci vůči vzdušným škůdcům
 - tři Bt geny pro rezistenci vůči půdním škůdcům
 - dva geny pro rezistenci vůči herbicidům

PLODINY TOLERANTNÍ K NEMOCEM

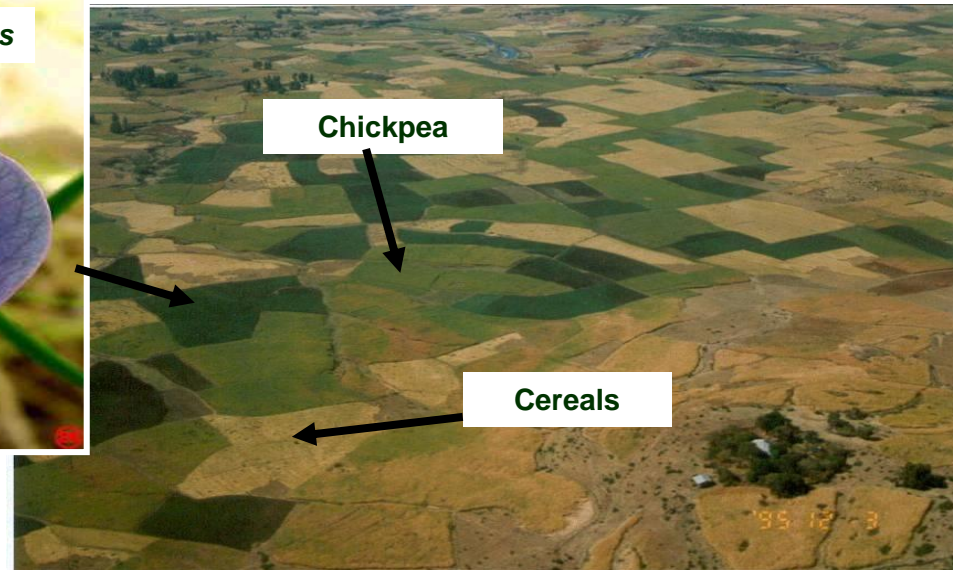
- viry – neexistují postřiky
- gen pro virový neinfekční obalový protein – zvýší odolnost vůči virové infekci
- banán; papája – Hawaii, jihovýchodní Asie
- maniok - základní potravinová složka pro více než 500 milionů lidí + krmivo



Left: Papaya with Papaya ringspot disease

Right: Biotech Papaya resistant

PLODINY TOLERANTNÍ K SUCHU



Drought in Ethiopia

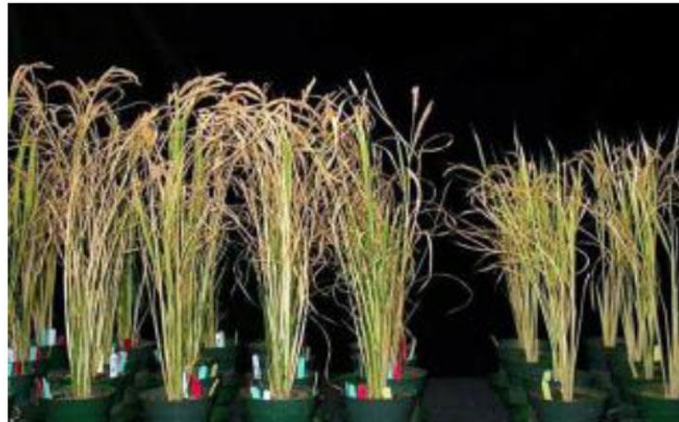
- cizrna – odolnější vůči suchu, ale toxická
- kukuřice odolnější k suchu: komerčně využitelná v roce 2016



New drought-tolerant maize (right) needs less water.

ZLEPŠENÍ VYUŽITÍ DUSÍKU

- využití dusíku z hnojiv
- gen z ječmene – 3x zvýší využití dusíku při nedostatku kyslíku



The effect of Nitrogen Use Efficiency (NUE) in rice growth with reduced N applications. Left: rice engineered

ZVYŠOVÁNÍ NUTRIČNÍCH HODNOT

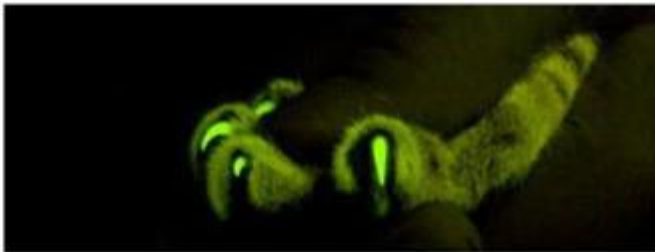
- zlatá rýže
 - vložených několik genů z kukuřice kódujících enzymy pro biosyntézu β -karotenu (prekurzor vitamínu A)
 - zabránění problémům se zrakovou u velké části populace v Indii a Číně
- řepka a sója
 - zlepšené vlastnosti oleje: stabilnější, odolnější k vysokým teplotám, delší skladování



Golden Rice

GMO ŽIVOČICHOVÉ

- Transgenní kočky
 - lentiviry jsou citlivé k restričním faktorům
 - specifický restriční faktor: rhesus macaque TRIMCyp + eGFP
 - uniformní exprese, žádná mozaikovitost a žádné umlčování v F1 generaci
 - lymfocyty transgenních zvířat rezistentní k replikaci FIV



GMO – PRO A PROTI

GMO – PRO A PROTI

- **GMO rostliny**

- zvýšení výnosů bez nutnosti používat insekticidy, pesticidy, fungicidy



Economic impacts and impact dynamics of Bt (*Bacillus thuringiensis*) cotton in India

Jonas Kathage¹ and Matin Qaim¹

Department of Agricultural Economics and Rural Development, Georg-August-University of Goettingen, D-37073 Goettingen, Germany

Edited by Calestous Juma, Harvard University, Cambridge, MA, and approved May 15, 2012 (received for review March 2, 2012)

Despite widespread adoption of genetically modified crops in many countries, heated controversies about their advantages and disadvantages continue. Especially for developing countries, there successful farmers may have higher crop yields and profits anyway, this can result in inflated benefit estimates. Third, most available studies focus on agronomic impacts of Bt, such as yield

- 24% výnosu na akr
- 50% zlepšení výnosu pro malé zemědělce

Yield Gains from

Bt Maize	Bt Cotton
5% U.S. & Canada	9.6% United States
6.3% Uruguay	11.8% Mexico
7.4% Spain	24.3% South Africa
7.8% Argentina	28.6% Argentina
15.3% South Africa	54.8% India
24.1% Philippines	

GMO – PRO A PROTI

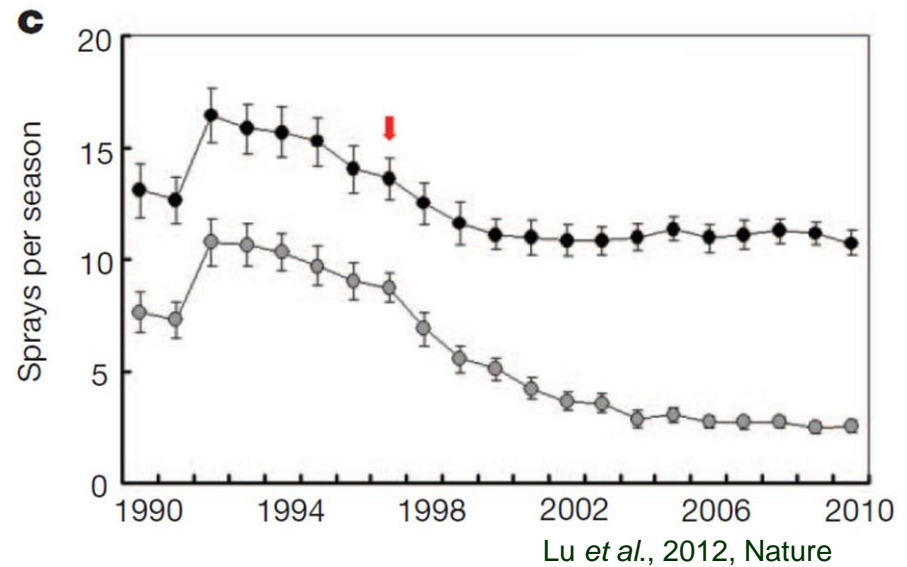
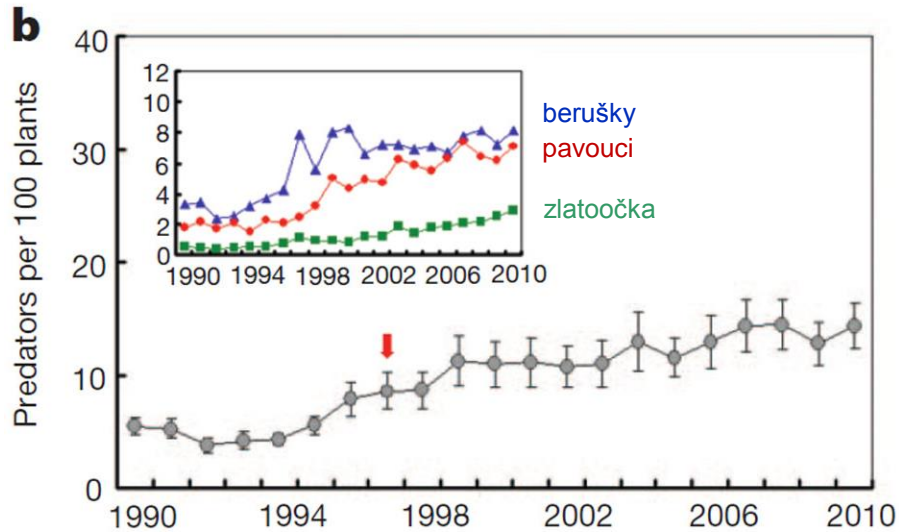
- **GMO rostliny**

- snížení používání pesticidů - negativní vliv silných pesticidů používaných v současném zemědělství
- zvýšení využití dusíku z hnojiv - negativní vliv přílišného hnojení na kvalitu vod
- zvýšení výživové kvality plodin
- zmenšení pěstební plochy
- frekvence přenosu pylu na jiné druhy (křížení) byla zjištěna v rozsahu 0,05-0,53%

GMO – PRO A PROTI

- **GMO rostliny**

- Bt plodiny: negativní vliv i na jiný než škodlivý hmyz ???
 - účinek i na některé motýly a brouky
 - na Bt bavlníku více hmyzu



GMO – PRO A PROTI

- **GMO rostliny**

- Nebezpečí vzniku alergií
 - GMO rostliny obsahují vždy jen jediný nebo několik málo vnesených genů a jsou velmi pečlivě testovány
 - naopak daleko méně jsou testovány nové odrůdy, při jejichž šlechtění se velmi často používají silné mutageny, např. rentgenové záření, kde dochází ke vzniku desítek a stovek nových mutací najednou
- O zákazu pěstování GMO ve Švýcarsku rozhodlo referendum
- 30% populace EU se domnívá, že pouze transgenní rostliny mají geny a odmítá je jíst...



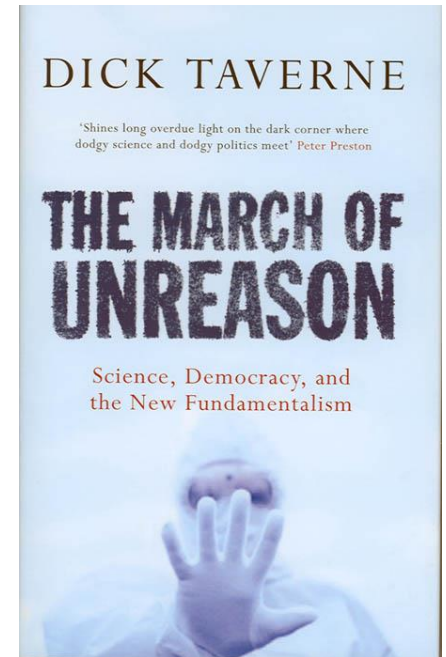
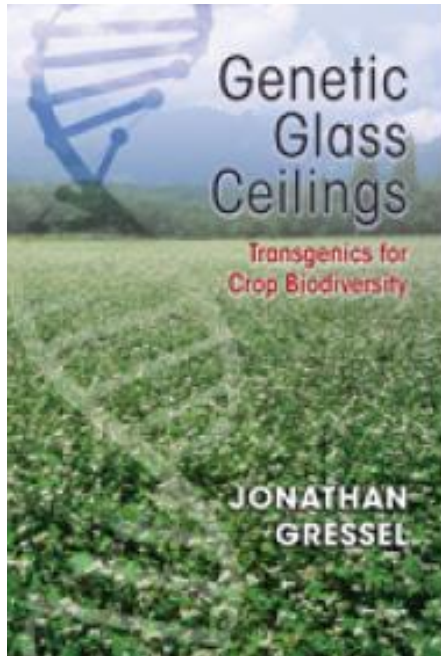
GMO – PRO A PROTI

Náš úkol:

- vysvětlovat, že rozumné využívání vědeckých poznatků, a to včetně genomiky, je nutné jak k pokrokům v medicíně, tak i pro zachování naší civilizace
- diskuse s veřejností o významu a přínosech GMO pro lidskou společnost
- potřeba obhajoby GMO rostlin - plodiny 21. století
- žádná technologie není bez rizika, ani GMO, ale není potřeba dělat z GMO strašáka a démonizovat je - finanční prospěch některých firem ...

LITERATURA

- viz přednáška



GMO – PRO A PROTI

Diskuze