

# DNA DIAGNOSTIKA

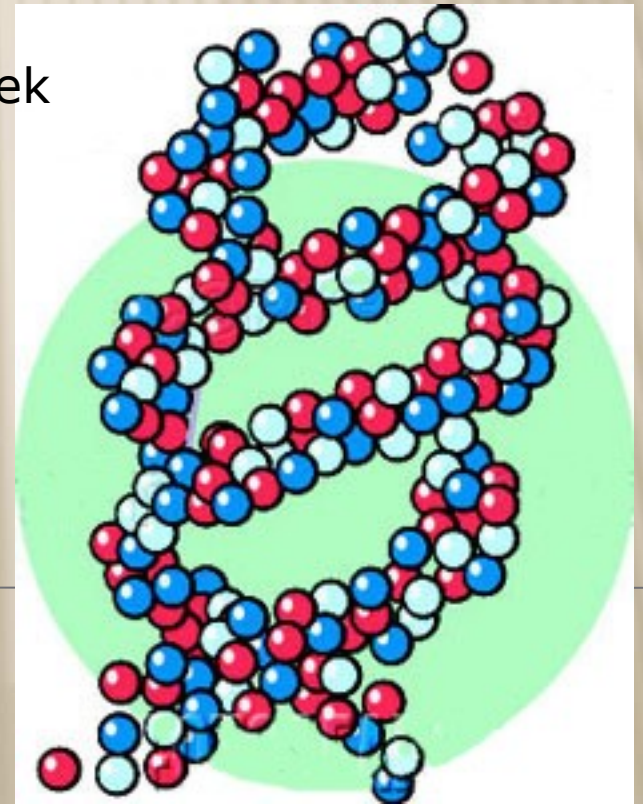
## FARMAKOGENETIKA A PERSONALIZOVANÁ MEDICÍNA



Karl Joseph Brodtmann:  
Děti s vypravěčkou pohádek

VKP 1. 6. 2018

---



# GENOM VE ZDRAVÍ A NEMOCI

---

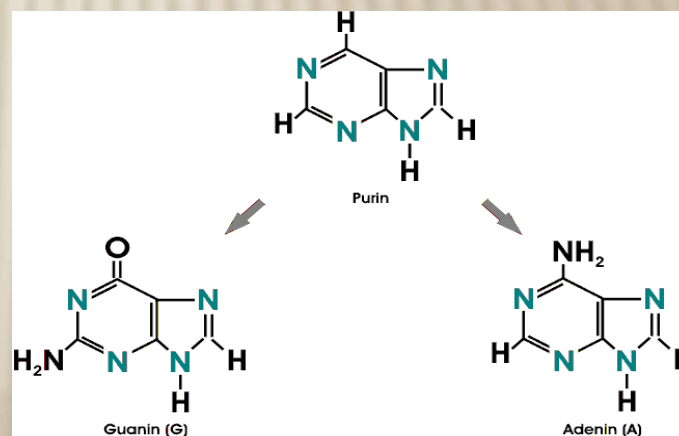
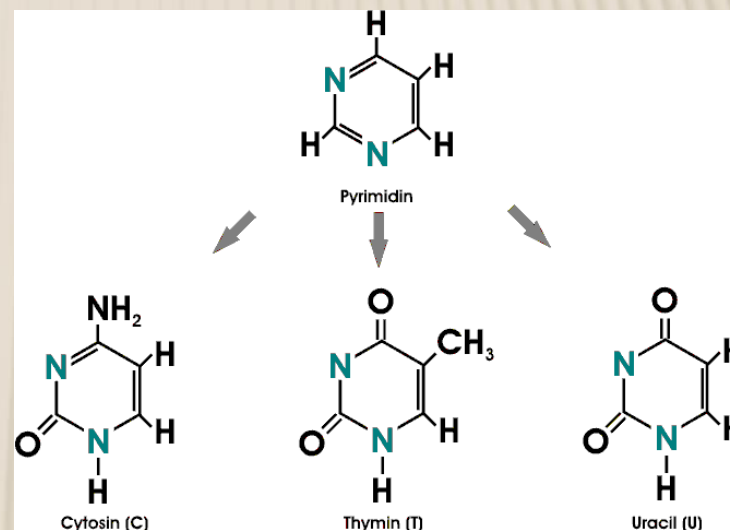
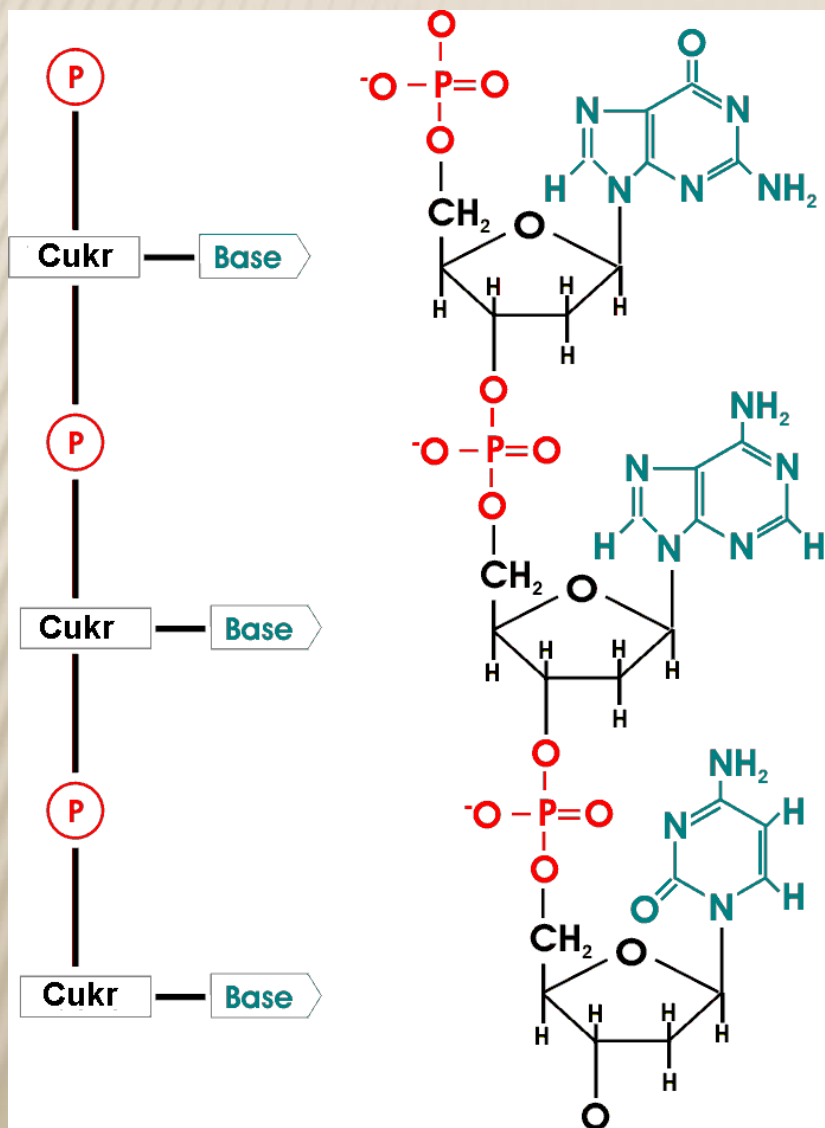
- × **Genetická výbava jedince (souhrn všech genů=genom)** je sice osudově zadána v okamžiku zplodění, ale není pro další život konečná, protože v průběhu života se může měnit jak
  - × pod vlivem četných faktorů prostředí, tak
  - × faktorů *epigenetických* (metylace, acetylace histonů, glykace),
  - × tak pod vlivem *dalších faktorů genetických* (např. mutacemi somatických buněk v průběhu maligní transformace).

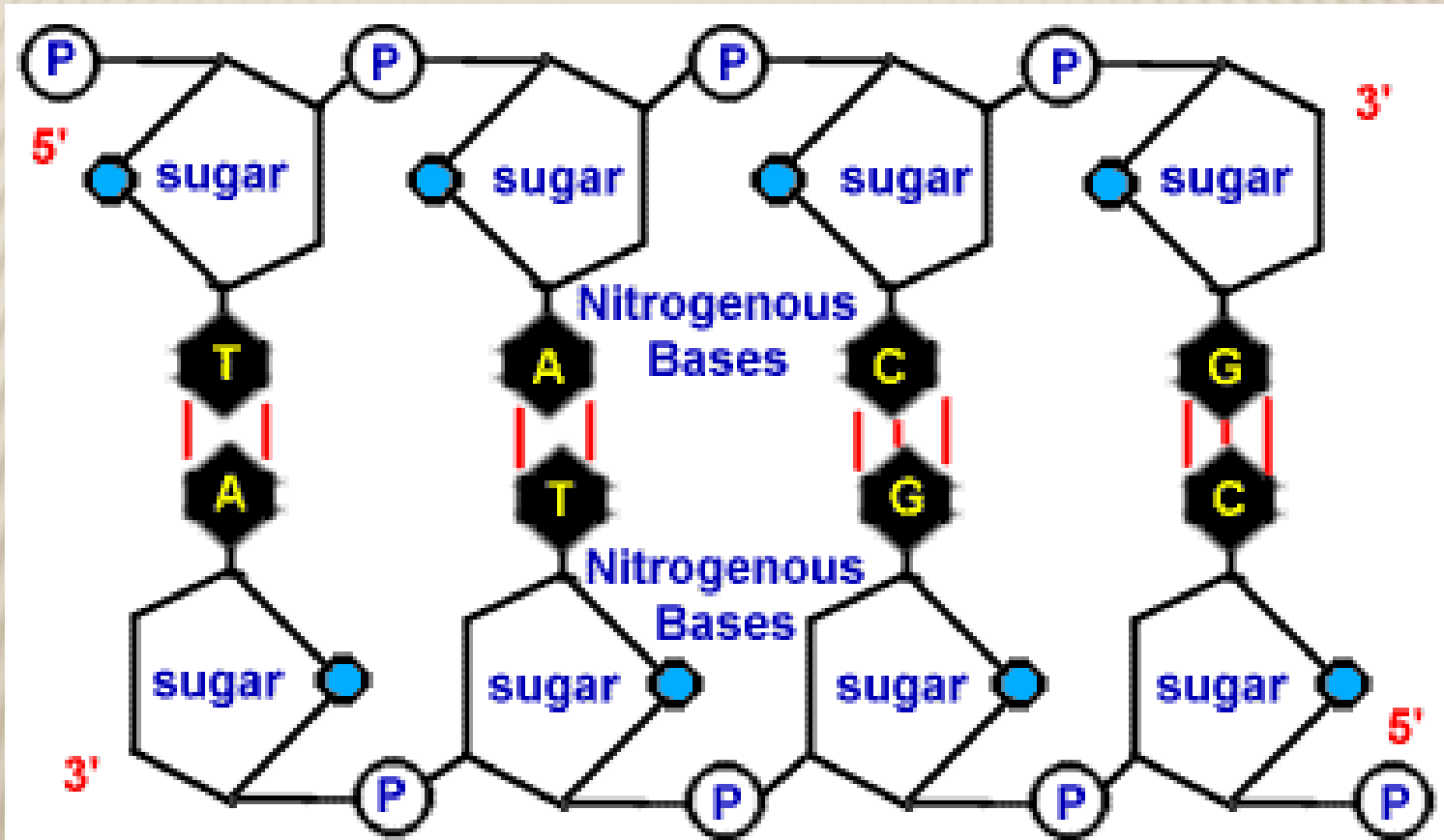
# GENOMIKA

---

- × je obor genetiky, který se snaží stanovit úplnou genetickou informaci organismu a interpretovat ji v termínech životních pochodů. Někdy se genomika rozděluje na tzv. **strukturní genomiku**, spočívající ve stanovení sledu nukleotidů genomu organismu, na **bioinformatiku**, jež počítačovými metodami a prací v databázích interpretuje přečtenou dědičnou informaci a na **funkční genomiku**, kde se experimentem, například vyřazením nějakého genu z činnosti (zvířecí modely typu knock out), snažíme přiřadit funkci neznámým genům, případně funkci genů studovat.

# STRUKTURÁLNÍ SOUČÁSTI DNA





# STRUKTURA DNA

---

- × **Cukry**-N-glykosidické vazby bazí mezi C1 deoxyribózy (DNA) a ribózy (RNA) a N1 pyrimidinových bazí a N9 purinových bazí.
- × **Báze** A, T (- vazby), G, C (= vazby)
- × **Fosfáty** jsou esterifikovány na C5' deoxyribózy a vytvářejí dNMP
- ×  $dNMP + P = dNDP + P = dNTP$

# POVAHA INFORMACE SKLADOVANÉ V DNA

---

- × Některé geny **kódují protein**. Jejich transkribovaná RNA se nazývá heterogenní nukleární RNA (**hnRNA**). Ta se upravuje (processing) na mRNA.
- × Messenger RNA (**mRNA**) je lineární kód, který je možno převést (translace) do sekvence **AK** polypeptidu pomocí kodonů a antikodonů (o 3 znacích) pro každou AK.

# POVAHA INFORMACE V DNA

---

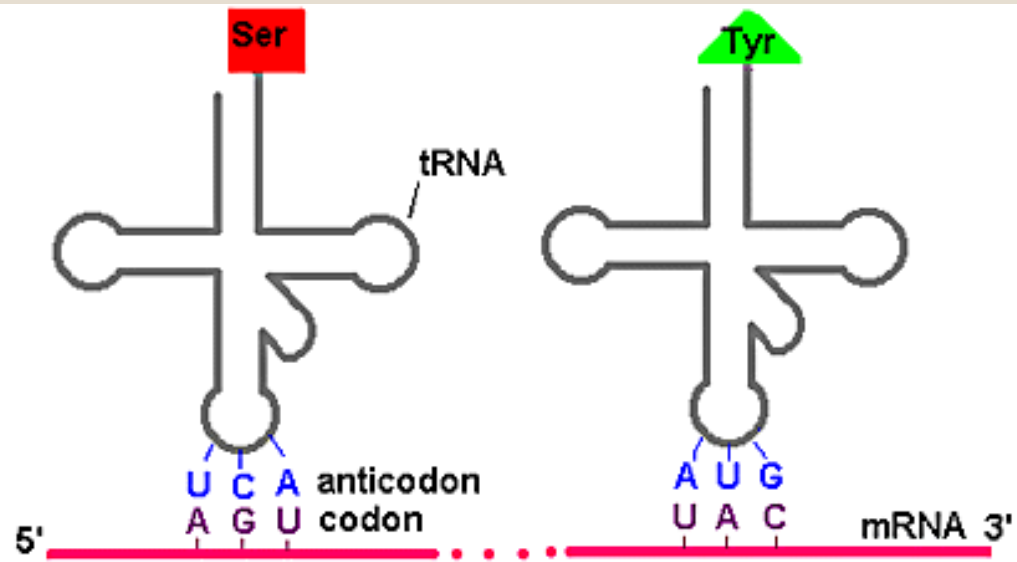
- × Některé geny **nekódují protein**. Funkce transkribované RNA v tomto případě je:
- × **processing** mRNA (malé nukleární RNA čili snRNA)
- × **translace** mRNA do proteinu (transfer RNA-tRNA, ribosomální RNA-rRNA. tRNA a rRNA kóduje 3D strukturu ve výsledných produktech RNA, které umožňují jejich funkci.



# SYNTÉZA DNA VE ZVÍŘECÍCH BUŇKÁCH

---

- × DNA je ve zvířecích buňkách ve formě chromosomů (1-10cm celkové délky). Každý chromosom má 2000 začátků (origins) replikace. Od každého tohoto místa probíhá obousměrně syntéza DNA. Až se jednotlivé kousky syntetizované z míst začátku replikace setkají, vzniká dceřinné vlákno DNA. Začátky jsou od sebe vzdáleny cca 30-100  $\mu\text{m}$ .
- × časová synchronizace syntézy 50000-60000 replikonů v každém genomu.

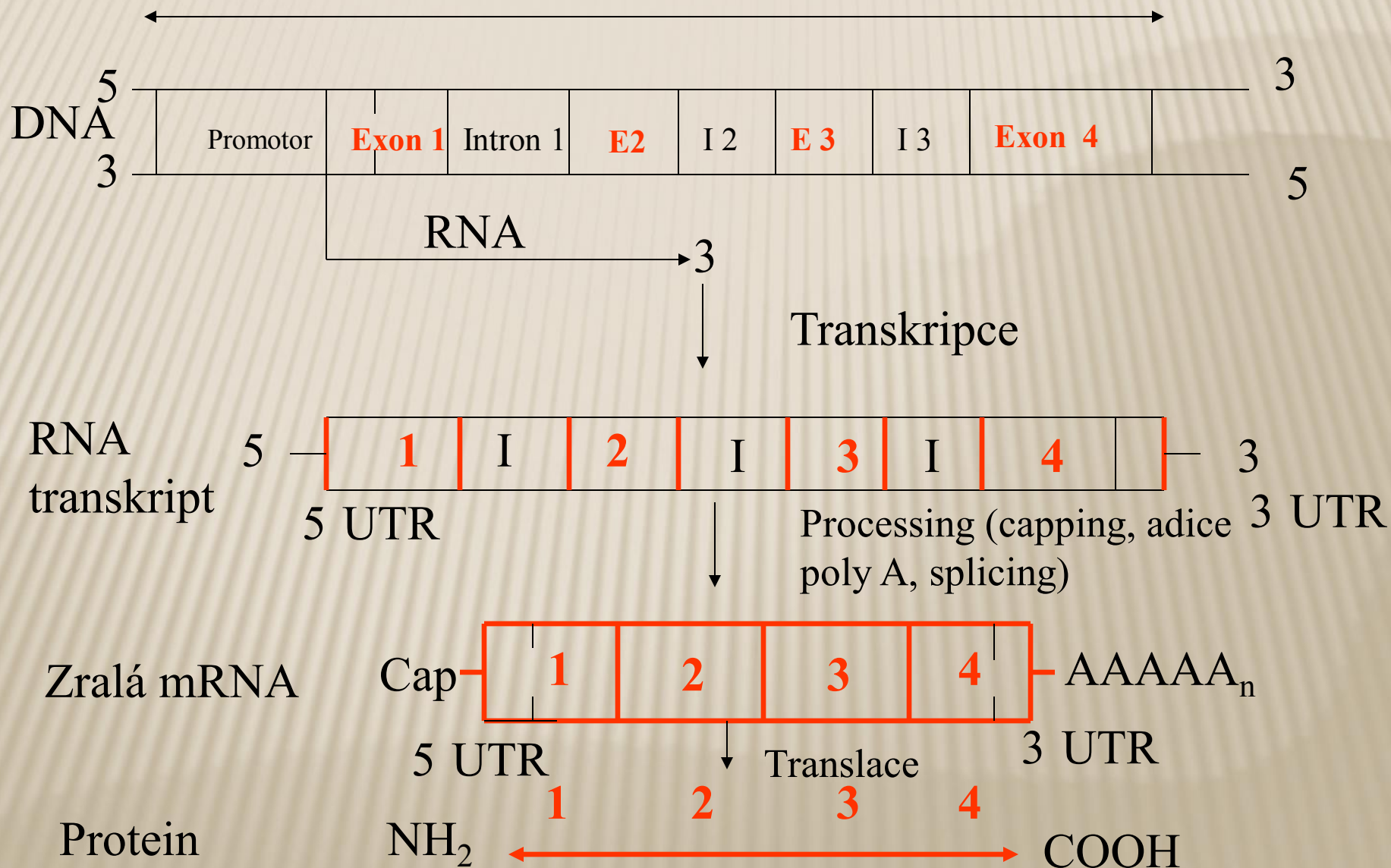


2nd base in codon

		U	C	A	G		
1st base in codon	U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G	3rd base in codon
	C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G	
	A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G	
	G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G	

## The Genetic Code

# Lidský gen



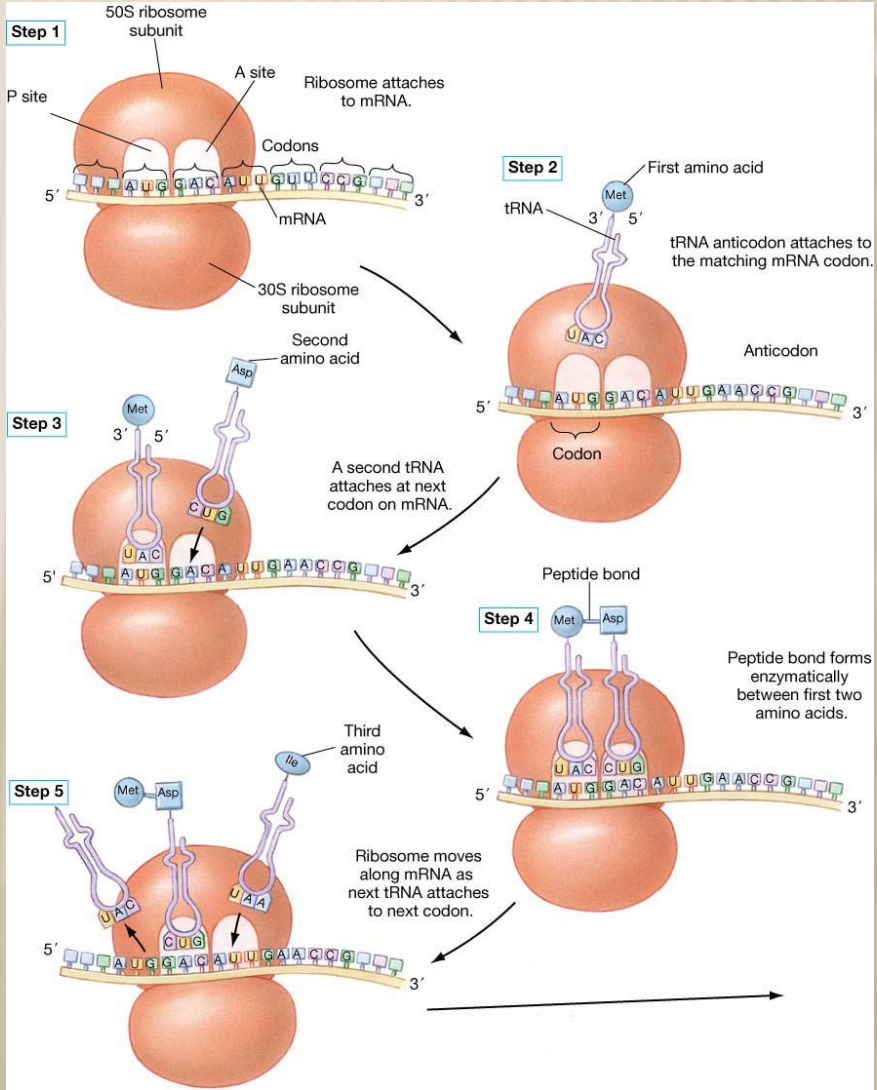
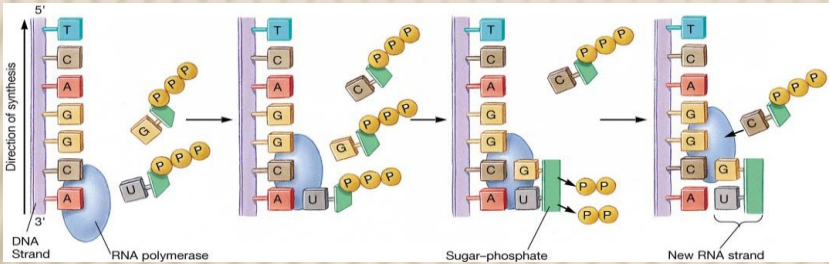
# ZÁKLADNÍ TERMINOLOGIE

---

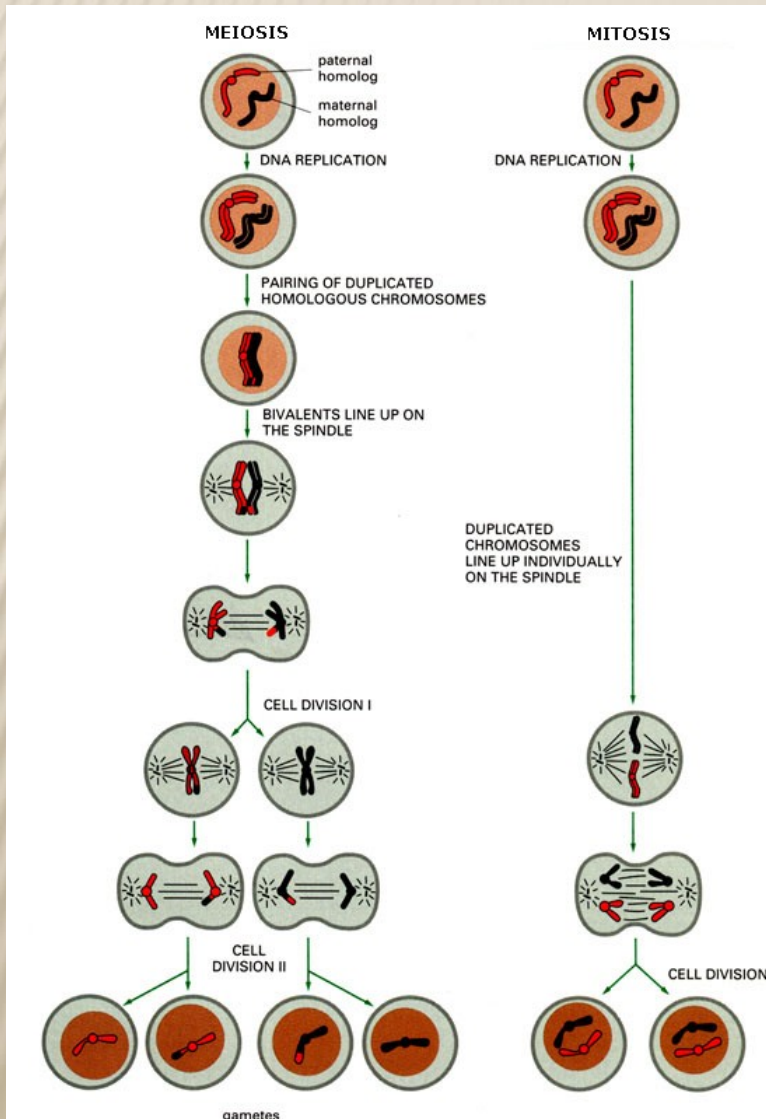
- × Gen
- × Lokus
- × Alela
- × Genotyp
- × Homozygot, heterozygot, hemizygot (X-linked)
- × Genom

# GENOVÁ EXPRESE - TRANSKRIPCE A TRANSLACE

## DNA



# DĚLENÍ BUNĚK



## × mitóza

- + 2 dceřinné buňky s diploidním počtem chromozomů
- + 1 cyklus DNA replikace následuje rozdělení chromozomů a jádra (profáze → prometafáze → metafáze → anafáze → telofáze) a násl. celé buňky (cytokineze)

## × meióza

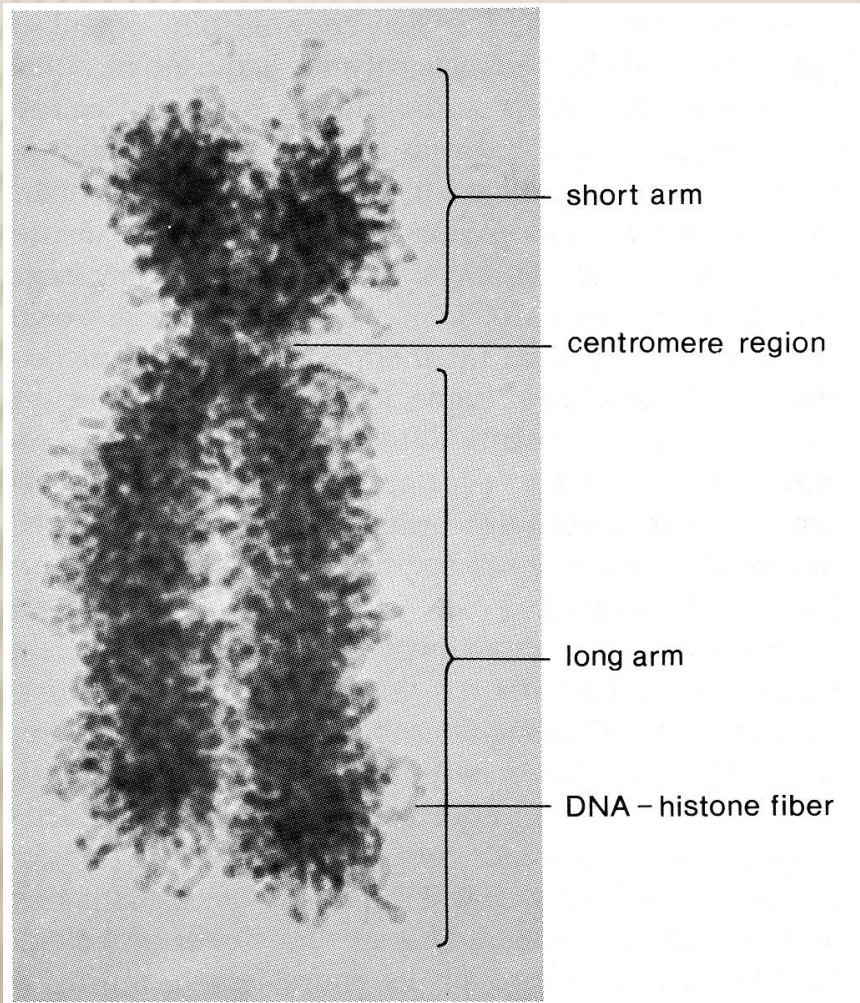
- + 1 cyklus replikace následován 2 cykly segregace chromozomů a buněčného dělení
  - × 1. meiotické (redukční) dělení – rozdělení homologních chromozomů
    - \* významné – odehrává se zde meiotický crossing-over (rekombinace) – žádná z gamet není identická!
    - \* poruchy rozestupu – např. trisomie
  - × 2. meiotické dělení – rozestup sesterských chromatid
- + 2 dceřinné buňky s haploidním počtem chromozomů
  - × vznik pohlavních buněk (spermie, vajíčko)
  - × dodatečné promíchání genetického materiálu crossing-overem

# TYPY TKÁNÍ PODLE REGENERAČNÍ SCHOPNOSTI

---

- × **Labilní** (intermitotické a postmitotické buňky: kůže, sliznice, hemopoetická tkáň, semenný epitel)
- × **Stabilní** (reverzibilně postmitotické buňky: Játra-  
ledviny-pankreas, endotelie, mezoteliální buňky, synoviální krycí buňky, vazivová tkáň, lymfocyty s dlouhým poločasem)
- × **Permantní** (irreverzibilně postmitotické buňky-  
gangliové, svalové, vaječné, plasmatické, makrofágy)

# LIDSKÉ CHROMOSOMY

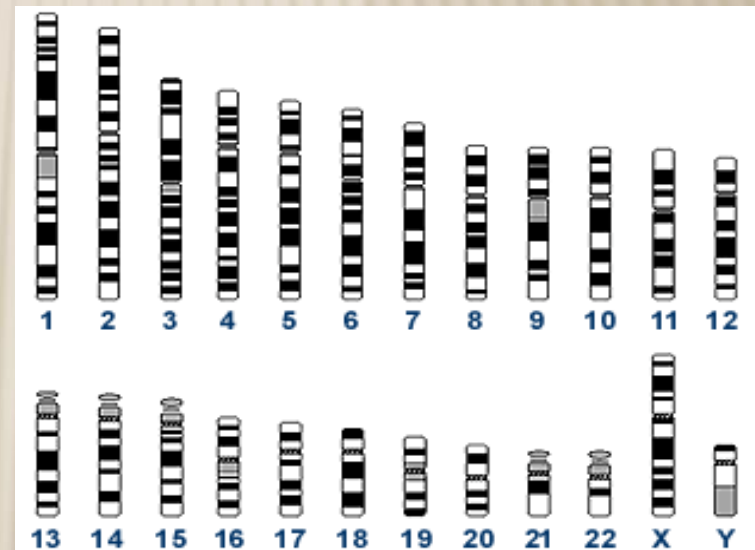


- morfologicky barvitelné pouze v průběhu mitózy nebo meiózy, kdy dochází ke kondenzaci
- v diploidní buňce 23 párů homologních chromosomů (22 párů autosomů a 2 pohlavní chromosomy)

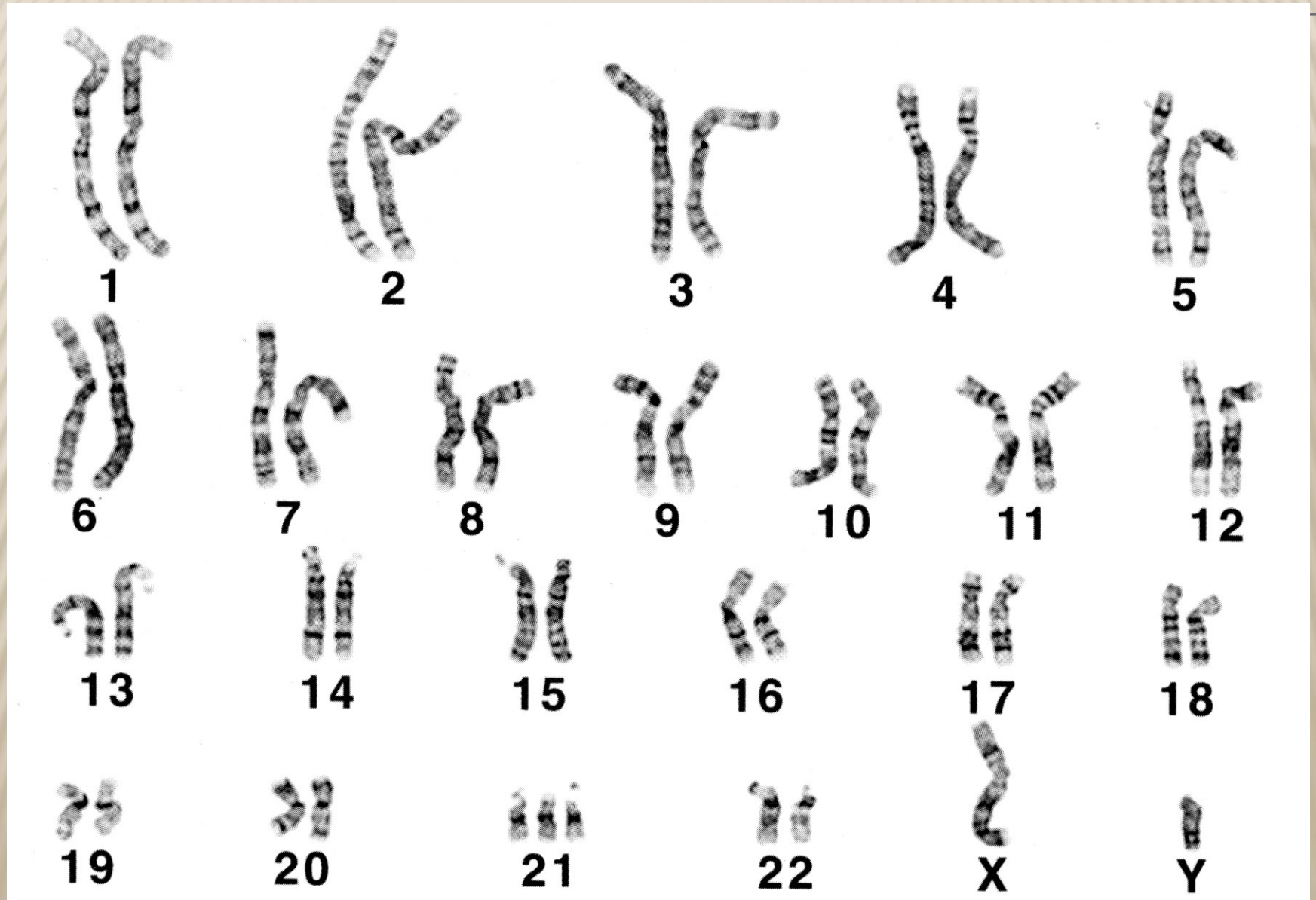


# KARYOTYP ČLOVĚKA

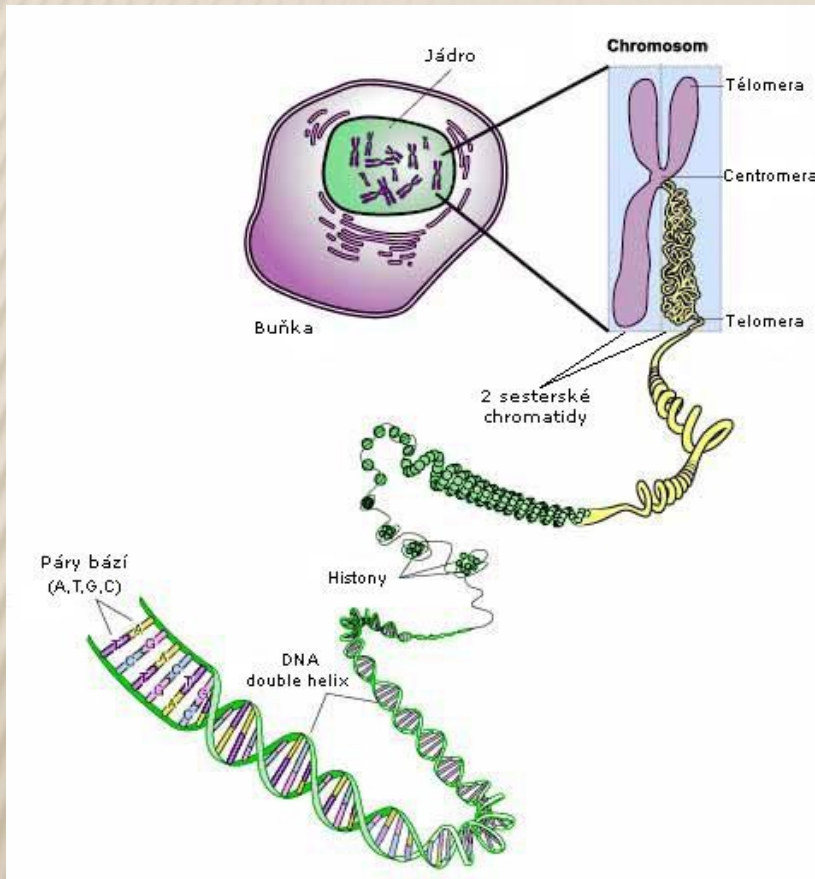
- × každý biologický druh má svou charakteristickou chrom. výbavu (počet a morfologii) = **karyotyp**
  - + u člověka mají **diploidní** bb. 46 chromozomů
    - × 22 párů homologních autozomů, 1 pár gomezomů (44XX nebo 44XY)
  - + zárodečné (vajíčko, spermie) 23 – **haploidní**
- × struktura chromozomu
  - + centromera
  - + telomery (raménka)
    - × dlouhé - q
    - × krátké - p
  - + barvením chromozomů se dosáhne charakteristického pruhování a tím rozlišení jednotlivých chromozomů



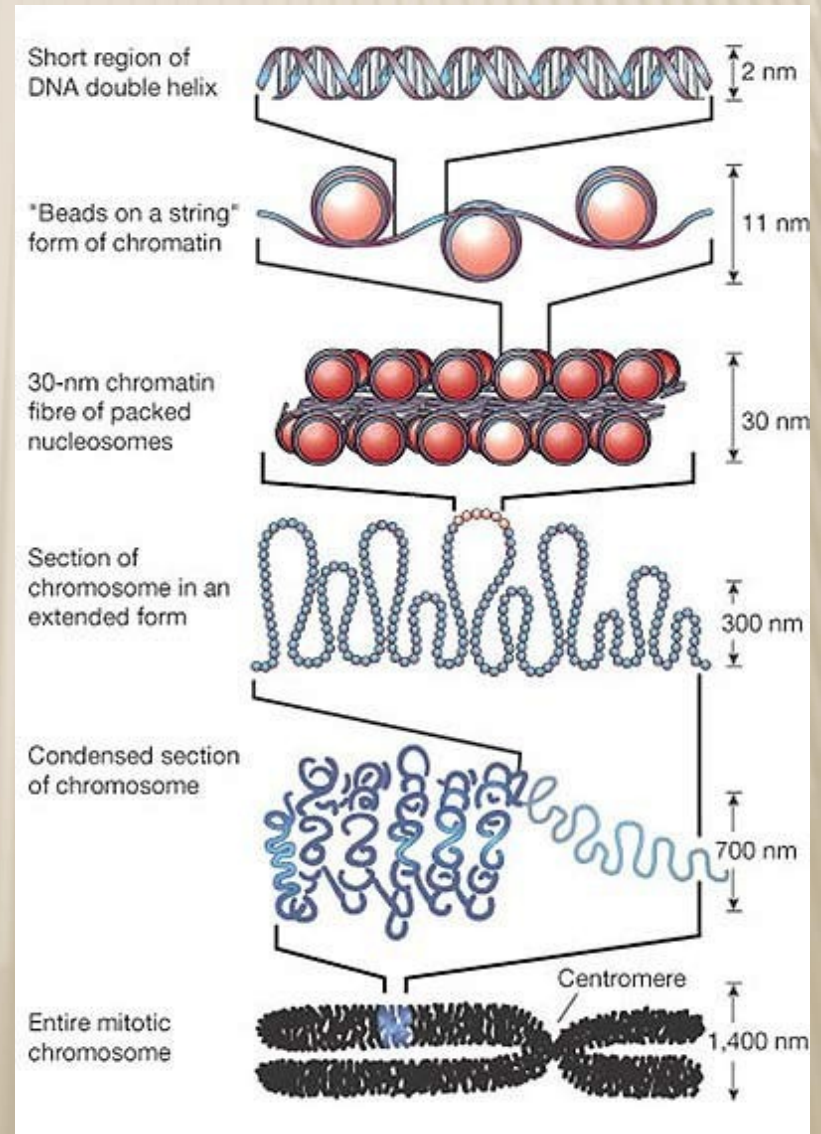
# KARYOTYP PODLE DENVERSKÉ KLASIFIKACE



# CHROMATIN × CHROMOZOM



- × v nedělicí se buňce je chromatin rozprostřen volně v jádře
- × u dělicí se organizuje do viditelných chromozomů



# CHROMOSOMOVÉ A GENOVÉ ABERACE

- × Chromosomové aberace

  - Strukturní

  - Numerické

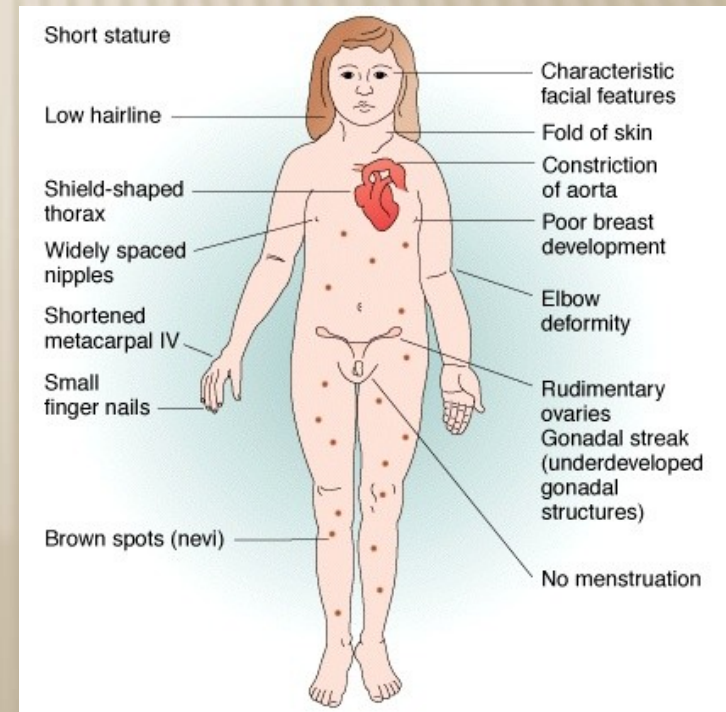
- × Genové mutace

  - Vzácné alely

  - Polymorfismy

# CHROMOZOMÁLNÍ PORUCHY

- × aneuploidie (změna počtu chromosomů v sadě)
  - × porucha rozdělení sesterských chromosomů [meiotická non-disjunkce]
  - × později během rýhování → somatická mozaika
- + monosomie
  - × gonozomální
    - \* Turnerův sy. (45, X0)
- + trisomie
  - × autozomální
    - \* Downův sy. (47, XX/XY + 21)
    - \* Edwardsův sy. (47, XX/XY + 18)
    - \* Patauův sy. (47, XX/XY + 13)
  - × gonozomální
    - \* Klinefelterův sy. (47, XXY)
- × polyploidie (porucha rozdělení celých sad nebo oplození 2 spermii [dispermie])
  - + u člověka neslučitelné se životem
    - × těhotenství je potraceno
    - × molla hydatidosa (a pak těhotenství nutno ukončit potratem)
    - × porod novorozence s triploidí – velmi časná letalita



# GENOVÉ MUTACE

---

- × Z hlediska patogeneze nemocí je důležité, zda se jedná o **mutace v somatických buňkách**, které vznikají v průběhu života, většinou jsou buněčně nebo tkáňově specifické a nepřenášejí se na potomstvo, nebo zda jde o tzv. **zárodečné mutace**, které vznikají v zárodečných buňkách (vajíčko nebo spermie), stávají se součástí vrozené genetické predispozice, jsou obsaženy ve všech buňkách a přenášejí se na potomstvo.
- × Mutací vzniklé alely jsou v populaci z různých důvodů **vzácné** (např. jsou výrazně patologické a tudíž jsou z populace odstraňovány selekcí, nebo vznikly nedávno a nestačily se v populaci rozšířit) a **časté (polymorfismy)**.

# GENOVÉ MUTACE-TYPY

---

- × Normální stav
  - × DNA
  - × ATGCAGGTGACCTCAGTG
  - × TACGTCCACTGGAGTCAC
  
  - × RNA
  - × AUGCAGGUGACCUCAGUG
  
  - × PROTEIN
  - × Met-Gln-Val-Thr-Ser-Val
- × **Mutace typu „missense“**
  - × **DNA**
  - × ATGCAG**C**TGACCTCAGTG
  - × TACGTC**G**ACTGGAGTCAC
  
  - × RNA
  - × AUGCAG**C**UGACCUCAGUG
  
  - × PROTEIN
  - × Met-Gln-**Leu**-Thr-Ser-Val
  - × **Příklady-hemoglobin S u srpkovité anemie**

# GENOVÉ MUTACE-TYPY

---

× Normální stav

× DNA

× ATGCAGGTGACCTCAGTG

× TACGTCCACTGGAGTCAC

× RNA

× AUGCAGGUGACCU CAGUG

× PROTEIN

× Met-Gln-Val-Thr-Ser-Val

× **Mutace typu „nonsense“**

× DNA

× ATGCAGGTGACCT**G**AGTG

× TACGTCCACTGG**A**CTCAC

× RNA

× AUGCAGGUGACCU**G**AGUG

× PROTEIN

× Met-Gln-Val-Thr-**Stop**

× **Příklady:**  $\beta^0$  thalasemie



# GENOVÉ MUTACE-TYPY

---

- × Normální stav
  - × DNA
  - × ATGCAGGTGACCTCAGTG
  - × TACGTCCACTGGAGTCAC
  - × RNA
  - × AUGCAGGUGACCUCAGUG
  - × PROTEIN
  - × Met-Gln-Val-Thr-Ser-Val
- × **Mutace typu trinukleotidové expanze**
  - × DNA
  - × ATG(CAGCAGCAG)<sub>20</sub>CAGGTGACCTCAGTG
  - × TAC(GTCGTCGTC)<sub>20</sub>GTCCACTGGAGTCAC
  - × RNA
  - × AUG (CAGCAGCAG)<sub>20</sub>CAGGUGACCUCAGUG
  - × PROTEIN
  - × Met-(Gln-Gln-Gln)<sub>20</sub>Gln-Val-Thr-Ser-Val
  - × **Příklady: Huntingtonova nemoc**

# GENOVÉ MUTACE-TYPY

---

- × Normální stav
- × DNA
- × ATGCAGGTGACCTCAGTG
- × TACGTCCACTGGAGTCAC
- × RNA
- × AUGCAGGUGACCUCAGUG
- × PROTEIN
- × Met-Gln-Val-Thr-Ser-Val

- × **Mutace typu „frameshift“  
(=posun čtecího rámce)**

- × DNA
- × ATGCAGGTG**A**ACCTCAGTG
- × TACGTCCACT**T**GGAGTCAC
- × RNA
- × AUGCAGGUG**A**ACCUCAGUG
- × PROTEIN
- × Met-Gln-Val-**Asn-Leu-Ser**

- × **Příklady:**

- × **Duchennova** muskulární dystrofie,  
 **$\beta^0$**  thalasemie, Tay-Sachsova  
choroba

# GENOVÉ MUTACE-TYPY

---

- × Normální stav
- × DNA
- × ATGCAGGTGACCTCAGTG
- × TACGTCCACTGGAGTCAC
- × RNA
- × AUGCAGGUGACCUCAGUG
  
- × PROTEIN
- × Met-Gln-Val-Thr-Ser-Val

- × **Mutace typu „inserce“**
- × DNA
- × ATGCAGGTG-**3000 bp**-ACCTCAGTG
- × TACGTCCAC-**3000 bp**-TGGAGTCAC
- × RNA
- × AUGCAGGUG-**3000 bp**- ACCUCAGUG
  
- × PROTEIN
- × Met-Gln-Val-----?
- × **Příklady:**
- × **velké: Hemofilie A**

# GENOVÉ MUTACE-TYPY

---

- × Normální stav
- × DNA
- × ATGCAGGTGACCTCAGTG
- × TACGTCCACTGGAGTCAC
- × RNA
- × AUGCAGGUGACCUCAGUG
  
- × PROTEIN
- × Met-Gln-Val-Thr-Ser-Val

- × **Mutace typu „delece“**
- × DNA
- × ATGCAGGTG
- × TACGTCCAC
- × RNA
- × AUGCAGGUG
  
- × PROTEIN
- × Met-Gln-Val
- × **Příklady:**
- × **malé-cystická fibróza**
- × **velké: Duchennova muskulární dystrofie**

# MONOGENNÍ NEMOCI

---

- × Rozvoj molekulárně biologických metod umožnil detailní analýzu genetického podkladu mnoha mendelisticky děděných, tzv. **monogenních nemocí**.
- × U těchto chorob se dědičný podklad uplatňuje jako **velký faktor**, tj. je přítomen prakticky u všech nemocných a jedná se prokazatelně o faktor příčinný (např. defekty v dystrofinovém genu u muskulárních dystrofií), k němuž se přidávají jen jako přídavné další faktory genetické i faktory zevního prostředí. Příčinou těchto nemocí bývají především tzv. vzácné alely.

# ČTYŘI ZÁKLADNÍ TYPY MONOGENNÍ DĚDIČNOSTI

---

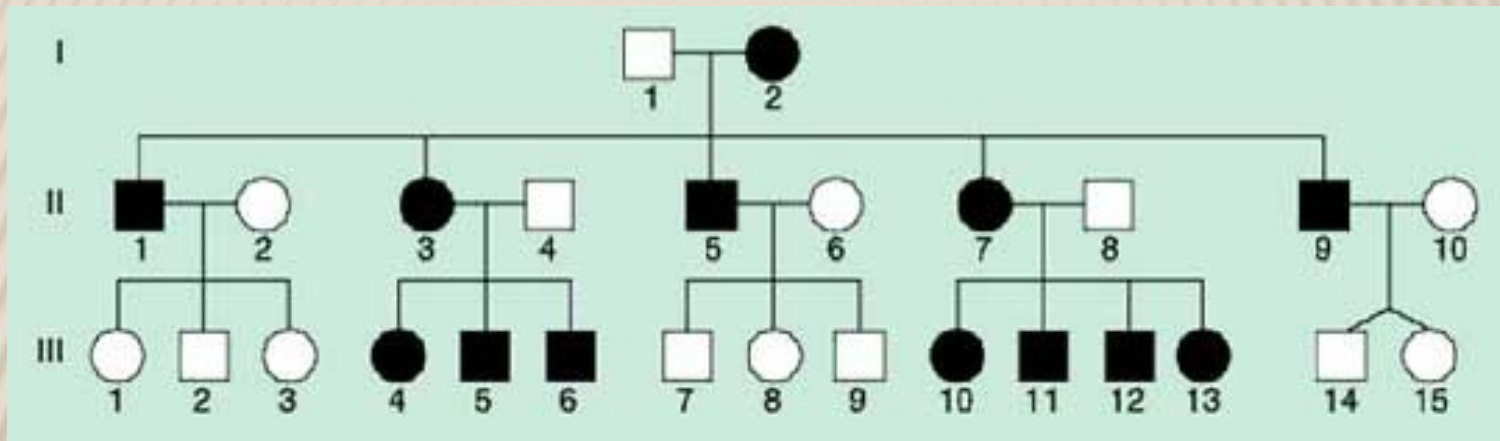
	dominantní	recesivní
autosomální	autosomálně dominantní (AD)	autosomálně recesivní (AR)
X-vázaný	X-dominantní (XD)	X-recesivní (XR)

# MITOCHONDRIÁLNÍ DĚDIČNOST

---

- × Z hlediska genetiky je zásadní fakt, že **mtDNA je předávána další generaci výhradně matkou (matroklinní dědičnost), když po oplodnění jsou zachovány pouze mitochondrie lidského vajíčka**. To patrně není pouhým důsledkem nepoměru počtu mitochondrií lidského oocyty (cca 100 000) a spermie (50-70), ale předpokládá se aktivní proces, který po oplození zlikviduje mitochondrie paternálního původu. Tomu odpovídá i typický maternální přenos chorob způsobených mutacemi mtDNA v rodokmenu (viz obrázek). Pokud je heteroplazmická mutace zděděna nebo k ní dojde v časných fázích embryogeneze, normální i mutovaná varianta jsou náhodně předávány při buněčném dělení dceřiným buňkám (mitotická i meiotická segregace). Distribuce a zastoupení mutované mtDNA v jednotlivých orgánech jsou proto patrně závislé na čase a vzniku mutace a rovněž na typu postižené buňky.

# RODOKMEN PRO MITOCHONDRIÁLNÍ DĚDIČNOST





# MONOGENNÍ CHOROBA

---

- × Monogenní choroba je determinována alelami v jednom lokusu.
- × Variantní alela, která vznikla mutací někdy v nedávné nebo vzdálené minulosti a je většinou relativně málo častá, nahrazuje původní „divokou“ („wild“) alelu na jednom nebo obou chromosomech.
- × Má-li jedinec pár identických alel, říkáme, že je **homozygot**, pokud jsou alely rozdílné, jedinec je **heterozygot**.
- × Pokud se jedná o dědičnost vázanou na X, rozlišujeme u ženy tři genotypy (XX, Xx, xx), u mužů jen dva hemizygoty (X<sup>0</sup>, x<sup>0</sup>)
- × Monogenní choroby mají charakteristický způsob přenosu v rodinách.

# MONOGENNÍ NEMOCI

---

- × Monogenní choroby jsou primárně, i když ne výlučně, **chorobami dětského věku**.
- × Méně než 10% z nich se manifestuje po pubertě a pouhé 1% se objeví po skončení reprodukčního věku. I
- × V populační studii na 1 milionu živě narozených dětí byla incidence vážných monogenních chorob odhadnuta na 0,36%, u 6-8% hospitalizovaných dětí se uvažuje o monogenních chorobách.

# POLYMORFISMY V DNA

---

- × Jako **polymorfismy** v DNA se označují přirozeně se objevující změny v sekvenci DNA s více než jednou variantou-alelou, s populační frekvencí více než 1 %. Objevují se v průměru jednou na každých 1000 párů bází genomové DNA.
- × Asi 90 % z nich jsou polymorfismy se záměnou jednoho nukleotidu (**single nucleotide polymorphisms - SNP**), jejichž podstatou je substituce jedné báze.
- × Většina těchto polymorfismů leží v nekódujících (intronových) sekvencích, na jejichž funkční význam existují odlišné názory.

# POLYMORFISMY V DNA

---

- × Kromě SNP se vyskytují také **minisatelitní a mikrosatelitní** polymorfismy, které vznikají v důsledku variace v tzv. tandemových repetitivních sekvencích. Minisatelitní polymorfismy jsou obvykle dlouhé 0,1-20 kilobází, zatímco mikrosatelitní často méně než 100 párů bází.
- × Většina mikrosatelitních polymorfismů jsou **dinukleotidové opakovací (repeat) sekvence**, jako je např. opakování motivu CA. SNP jsou obvykle bialelické (existují jen dvě alely), minisatelitní polymorfismy multialelické (existuje více než dvě alely).
- × Ačkoliv většina polymorfismů je zřejmě funkčně neutrální, část z nich zřejmě má alelicky specifické účinky na regulaci genové exprese nebo funkce kódovaného proteinu, což determinuje interindividuální variabilitu v biologických znacích i vnímavost vůči nemoci.

# VZÁCNÉ ALELY A POLYMORFISMY

---

- × *Vzácné alely jsou „špatné“* („loss of function, gain of function“)
- × Jsou často pod tlakem selekce
- × *Polymorfismy* (> 1% frekvence v populaci)
- × Význam:
- × Zdroj vrozené variability genomu
- × Faktor přežití vzhledem k patogenům?
- × Jak vzácné mutace, tak polymorfismy jsou způsobeny *genovými mutacemi*

# GERMINATIVNÍ VS. SOMATICKÉ MUTACE

---

- × Germinativní mutace přítomny ve všech buňkách. V průběhu života se nemění (*genetická predispozice?*)
- × Somatické mutace vznikají v somatických buňkách v průběhu života (*maligní transformace*).

# KOMPLEXNÍ (MULTIFAKTORIÁLNÍ, MULTIGENNÍ) NEMOCI

---

- × Za genetickou predispozici mnoha biologických procesů, evolučních adaptací a tedy také tzv. komplexních nemocí zřejmě odpovídají *kombinace určitých genů a určitých faktorů zevního prostředí.*
- × Interakční efekty a vliv vnějších faktorů však nutně musíme očekávat i v případě mendelisticky děděných nemocí, což se koneckonců projevuje ve všeobecně známé lékařské zkušenosti se širším klinickým spektrem příznaků stejného onemocnění.

# KOMPLEXNÍ (MULTIFAKTORIÁLNÍ, MULTIGENNÍ) NEMOCI

- × Na odhalení nejobecnějších principů genetiky multifaktoriálních nemocí se na rozdíl od genetiky nemocí mendelistických v současné době stále ještě čeká. Také z tohoto důvodu zatím v klinické praxi často kolísá názor na výsledky genetických studií, které se snaží odhalit genetický podklad komplexních nemocí, od neodůvodněného očekávání nad nalezenými geny velkého účinku až po velkou skepsi vzhledem k existenci genetického podkladu v populaci četných nemocí (nad 1%), jako je v kardiologii např. esenciální hypertenze.
- × Nemoci **sporadické, familiární** (tumory)- velký význam znalosti rodokmenu



# KOMPLEXNÍ (MULTIFAKTORIÁLNÍ, MULTIGENNÍ) NEMOCI

---

- × Jinak řečeno, v 21. století již *musíme počítat s tím, že fakticky každá choroba má nějaké genetické pozadí, jehož podíl na manifestaci dané choroby je různý.*



# GENETICKÉ STUDIE

---

- × Základní debata nad genetickým podkladem nemocí logicky začíná od strategie výběru tzv. kandidátních genů. Tato otázka je podstatně jednodušší u mendelisticky děděných nemocí, kde se změněná funkce jednoho genu snadněji identifikuje.
- × Dalším významným momentem je výběr statistické metodologie, která zhodnotí sílu asociace genů s chorobami. Možnosti jsou v zásadě dvě: linkage (vazebná) analýza a asociční studie. K detekci specifických genetických oblastí a genů, které se účastní v transmissi nemoci, je v principu možné použít obě metody.

# GENETICKÉ STUDIE

---

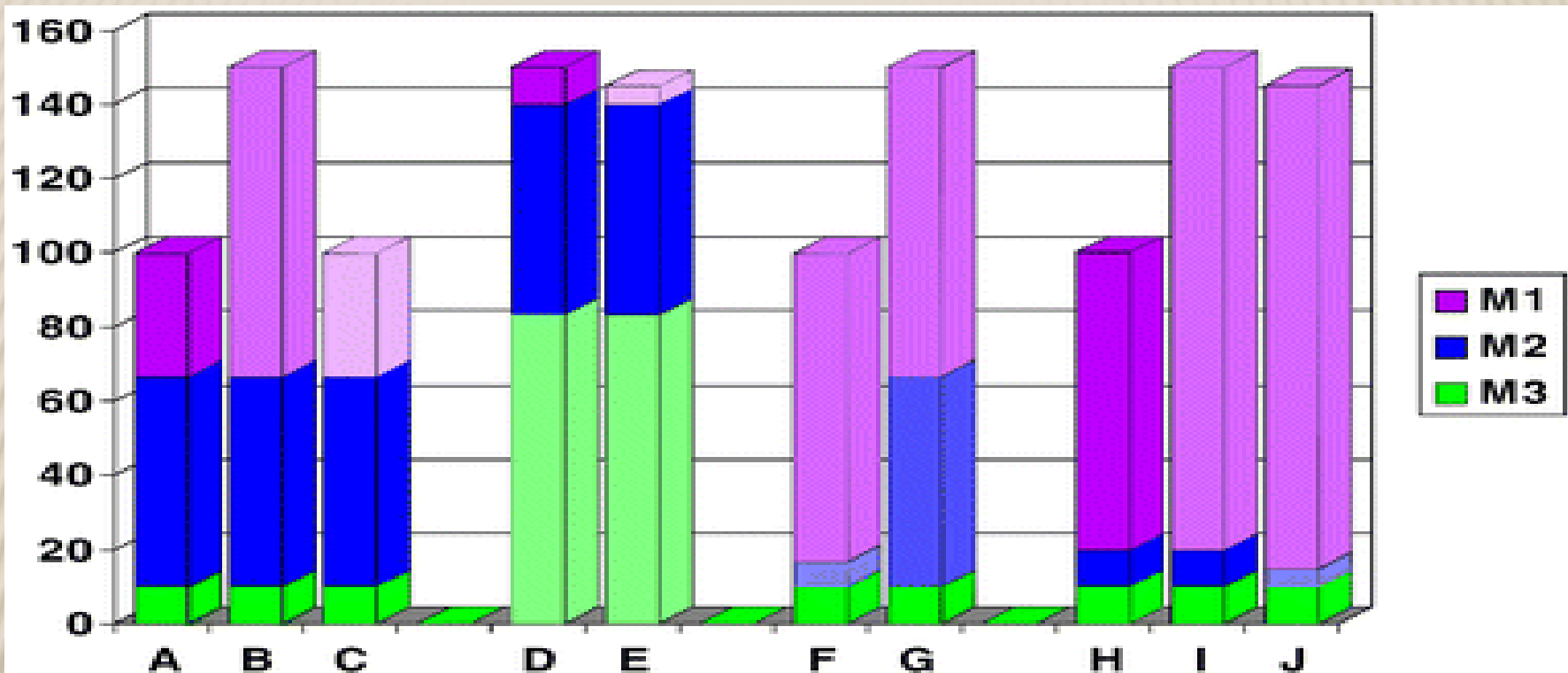
- × Linkage (vazebná) analýza testuje kosegregaci genového markeru a fenotypu nemoci v rodině. Čili marker a nemoc se v dané rodině mají vždy vyskytovat spolu.

# GENETICKÉ STUDIE

---

Asociační studie vyšetřují souvýskyt markeru a nemoci na populační úrovni, tj. u nepříbuzných jedinců, obvykle srovnáním frekvencí markerů u nepříbuzných nemocných a kontrolních subjektů (studie *case-control*). Statistickou sílu asociace je možno dále zvýšit obohacením o další kritéria, jako jsou klinické subtypy nemoci (studie *case-case*), závažnost nemoci, časný začátek nemoci, rizikové faktory pro nemoc včetně pohlaví a vhodné biologické znaky (např. plasmatické hladiny cytokinů při asociaci genetických polymorfismů v cytokinových genech; studie *genotyp-fenotyp*).

# MODEL TERAPIE HYPERTENZE (PODLE LINDPAINTNERA, BŘEZEN 2003)

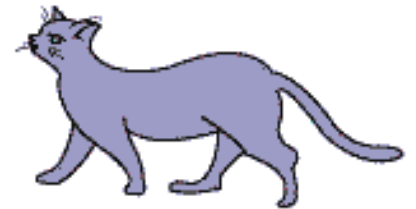


**A**=fyziologický stav: tři molekulární mechanismy (M1, M2, M3) se podílejí na determinaci znaku (TK), **B**=hypertenze D1: selhání M1 (příčina/účast)  
**C**=hypertenze D1: kauzální terapie T1 (cílená na M1), **D**= hypertenze D3: selhání M3 (příčina účast), **E**=hypertenze D3, léčení T1: terapie není kauzální, **F**=hypertenze D1, paliativní terapie T2, cílená na M2, **G**=hypertenze D1, terapie T2, refrakterní varianta na T2 v M2, **H**= fyziologický stav: odlišný podíl M1 a M2 na normálním znaku, **I** = varianta hypertenze D1: selhání M1; **J** =varianta hypertenze D1: terapie T2



# DĚKUJI ZA POZORNOST!

---



# DNA MARKERY

---

- × U komplexních nemocí se ukazuje, že je možno asociovat alely mnohých polymorfismů s výskytem komplexní nemoci nebo některými intermedialními znaky onemocnění (hladiny proteinů, rodinná anamnéza aj.) *statisticky* asociovat, čili přinejmenším najít genetický marker, s touto nemocí asociovaný.
- × Určitý genotyp nebo alela daného polymorfismu tak představuje vyšší (nižší) riziko pro nemoc.



Odds ratio (OR):

$$\frac{\text{Počet nemocných s riz. genotypem} \times \text{počet zdravých bez riz. genotypu}}{\text{Počet nemocných bez riz. genotypu} \times \text{počet zdravých s riz. genotypem}}$$

Senzitivita, specifita (nad 80%) a síla testu (nad 80%).



# PŘÍKLAD:

---

Group	TNF $\beta$ -B1B1	TNF $\beta$ -B2B2	TNF $\beta$ -B1B2	B1-allele frequency	$P_g$	$P_\alpha$
00	12	73	76	0.311		
01	1	28	11	0.163	0.02	0.008
All	13	101	87	201		

1.Group 00: patients without a family history of psoriasis.

2.Group 01: patients with a family history of psoriasis in second- and third-degree relatives.

3.OR for B2 allele in patients with psoriasis who had second- and third-degree relatives with psoriasis = 4.5 (0.56–36.12),  $P_{\text{corr}} = 0.02$ , sensitivity 0.834, specificity 0.311, power test 0.732.

# SROVNÁNÍ STRATEGIÍ GENETICKÉHO VÝZKUMU: KANDIDÁTNÍ GENY VS. „GENOME-WIDE „ STUDIE

---

## × Studie kandidátních genů

- Racionální (patofyziologická) selekce genů bez možnosti objevit nové (je možno ovšem objevit nové klinicky validní markery uvnitř genu)
- Limitovaný počet genů snižuje riziko falešné positivity výsledků
- Redukované náklady, pokud je tento přístup úspěšný (vede k signifikantním výsledkům=klinicky validním markerům).
- Je možno se dopracovat statisticky adekvátně velkým souborům vyšetřených osob

# SROVNÁNÍ STRATEGIÍ GENETICKÉHO VÝZKUMU: KANDIDÁTNÍ GENY VS. „GENOME-WIDE „ STUDIE

---

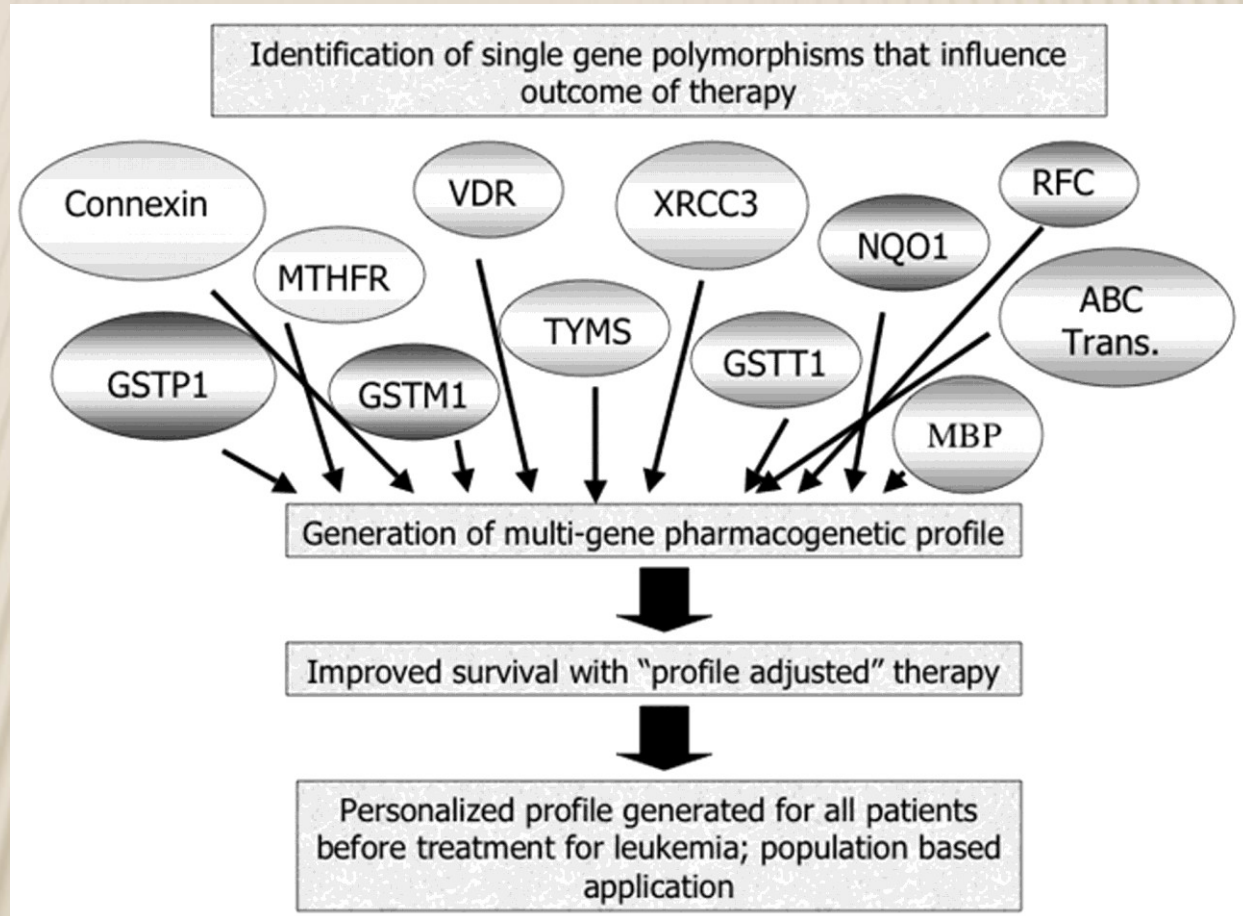
- × Studie „genome-wide“
  - Analýza celých genomů může vést k identifikaci dosud neznámých genetických souvislostí
  - Zvyšuje se riziko nepravdivého výsledku
  - Zvýšené náklady, také na základě zvýšeného počtu signifikantních výsledků
  - Statisticky adekvátně četných souborů je možno dosáhnout jen obtížně

# PERSONALIZOVANÁ MEDICÍNA

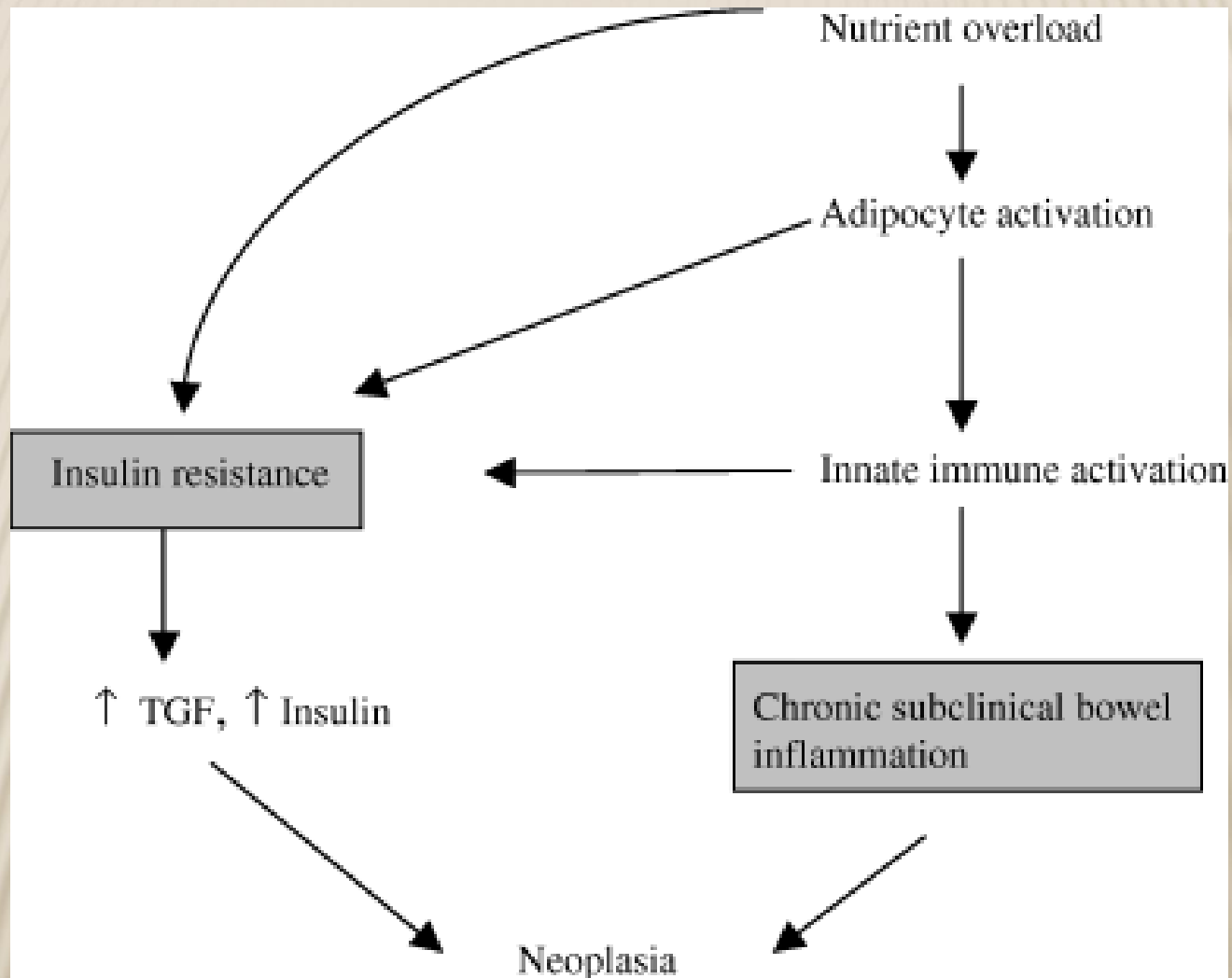
---

- × Umožňuje zlepšovat účinnost terapie na základě vysokého respektu k interindividuální variabilitě pacienta
- × Zdroje:
  - × Klinicky relevantní znalost genetického podkladu nemocí
  - × Buněčná terapie
  - × Genová terapie
  - × Farmakogenetika
  - × Farmakoeconomické aspekty

**Figure 1. The hoped-for pathway of development of personalized medicine for the treatment of leukemia**

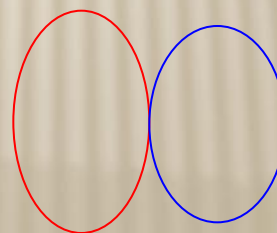
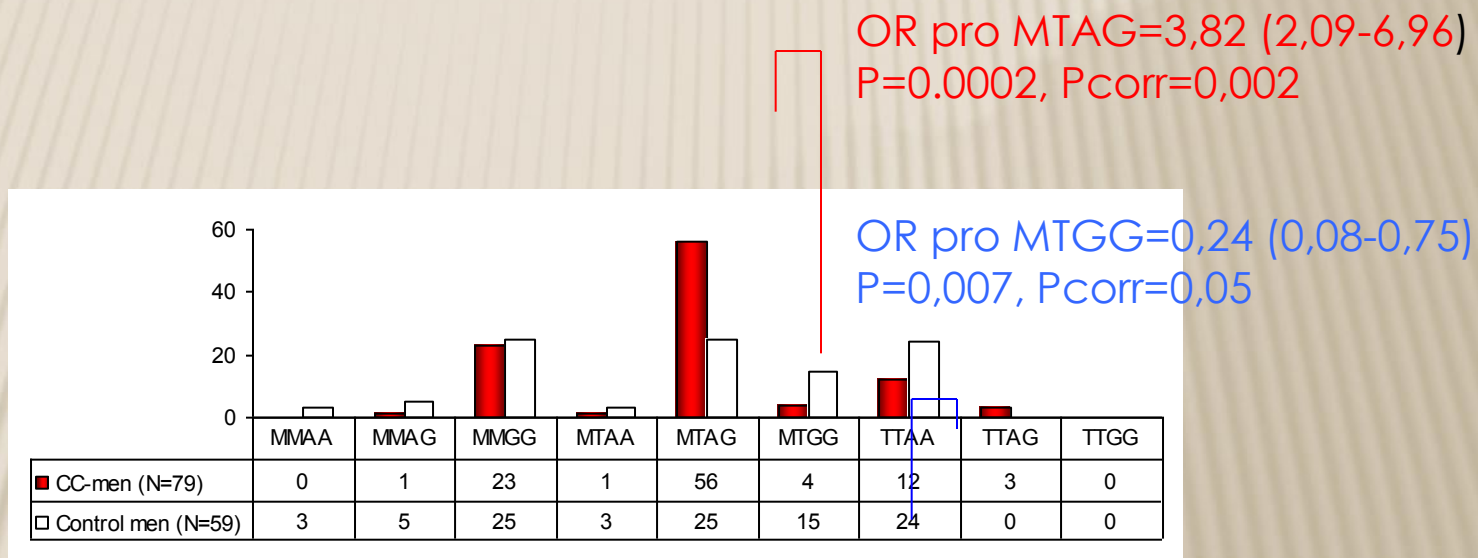


**Davies, S. M. Hematology 2006;2006:111-117**



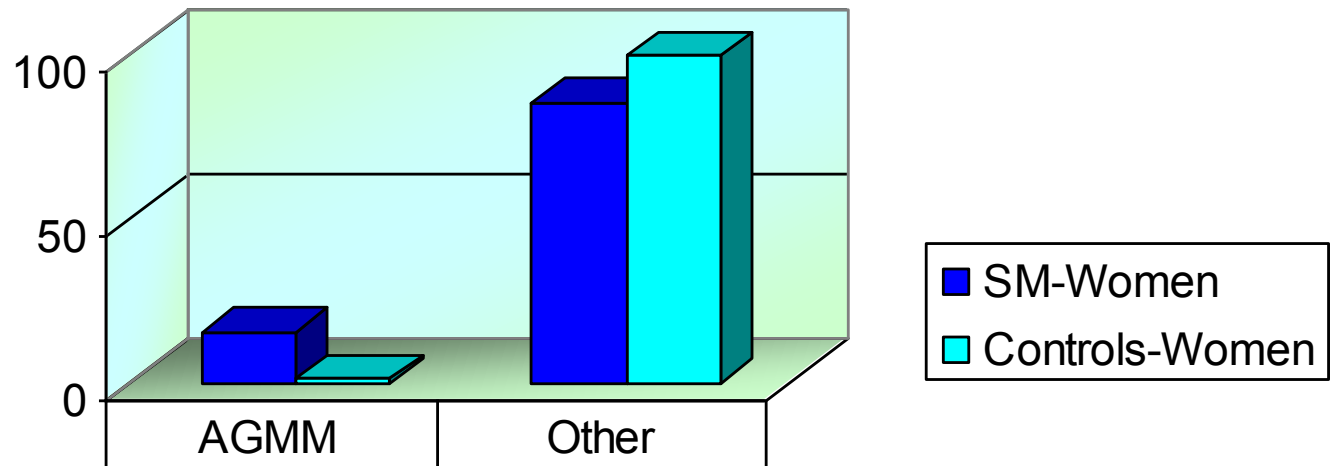
Patofyziologický mechanismu vztahu mezi obezitou a rakovinami v GIT.

# PACIENTI S RAKOVINOU KOLOREKTA VS. KONTROLY DVOJNÁSOBNÝ GENOTYP V GENU PRO ATG (-6A/G A M235T ATG)



Pacientky s roztroušenou sklerózou vs. kontroly  
Dvojnásobný genotyp v genu pro ATG (-6A/G a M235T ATG)

## Rozdíly v četnosti genotypu AGMM v genu pro angiotensinogen mezi ženami s RS a kontrolami



■ SM-Women	15	85
■ Controls-Women	1	99

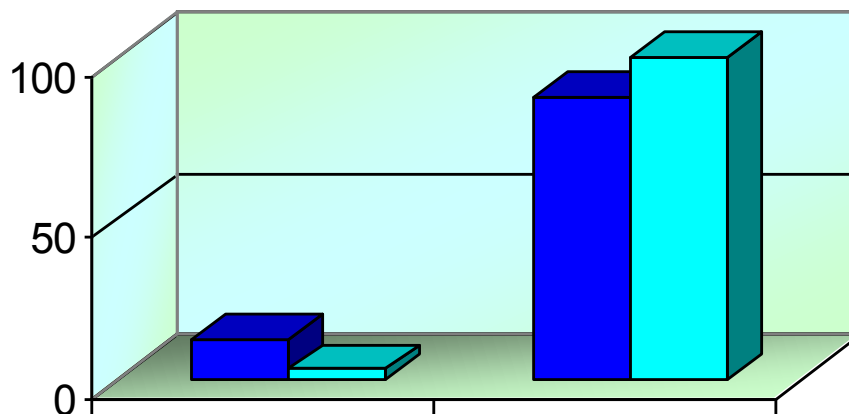
OR=17,65 (95% konfidenční interval 2,31-134,71; P=0,00009, Pcorr=0,0006



Pacientky s roztroušenou sklerózou vs. kontroly

Dvojnásobný genotyp v genu pro ATG (-6A/G a M235T ATG)

### Rozdíly v četnosti genotypu AGTT v genu pro angiotensinogen mezi ženami s RS a kontrolami



■ SM-Women  
■ Controls-Women

■ SM-Women	12	88
■ Controls-Women	3	100

OR=4,67 (95% konfidenční interval 1,31-16,63); P=0,008, Pcorr=0,04

# FARMAKOGENETIKA - CÍLE

---

- × Popsat vliv dědičnosti na odpověď organismu na různé látky s využitím interdisciplinárního přístupu

## Farmakogenomika se znalostí celého genomu

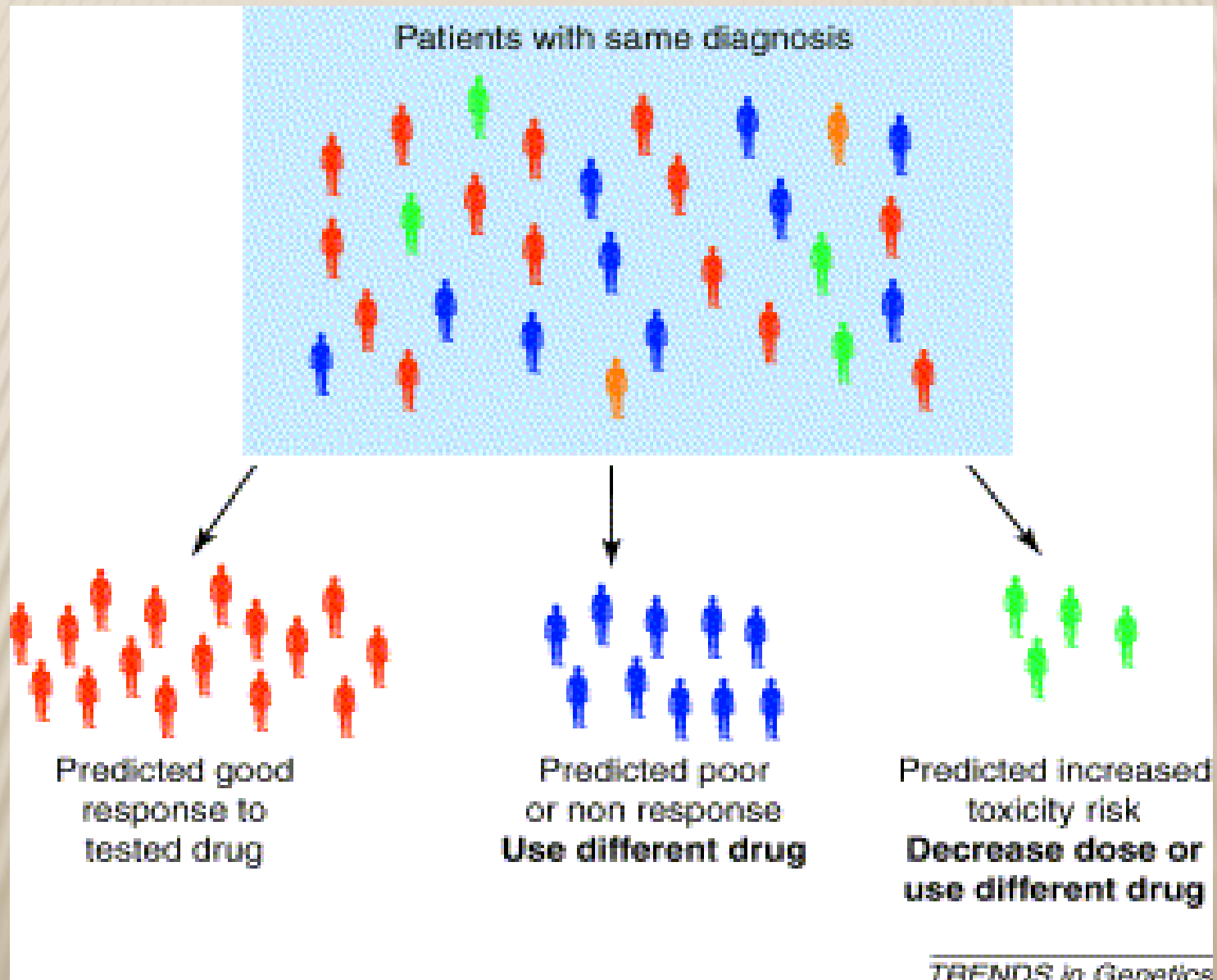
- × **Farmakodynamika:** popisuje žádoucí či nežádoucí účinky léků na organismus

(lék → organismus)

- × **Farmakokinetika:** se zabývá hladinami léků a jeho metabolitů v různých tkáních a vstřebáváním léků, jejich distribucí, metabolismem a eliminací

(organismus → lék)

# Klinický potenciál farmakogenetiky



# FARMAKOKINETIKA

---

- × **Absorpce** (GIT, motilita?, pH žaludeční sekrece?, intestinální flóra?, místo absorpce)
- × **Distribuce** (frakce léčiva vázaná na bílkoviny séra, afinita jednotlivých léčiv k BS – fenylbutazon-warfarin)
- × **Metabolismus** (indukce, inhibice metabolizujících enzymů... rifampicin-orální kontraceptiva)
- × **Eliminace** (pH moči, lithium-thiazidy)

# FARMAKOKINETIKA X FARMAKOGENOMIKA

- × Rozdílné hladiny léku v séru pacientů téže skupiny, váhy, atd. po podání stejné dávky
- × Rychlejší x pomalejší nástup účinku
- × Různá doba eliminace léčiva z organismu
- × Interakce (alkohol, tabák, barbituráty)

# FARMAKODYNAMIKA X FARMAKOGENOMIKA

---

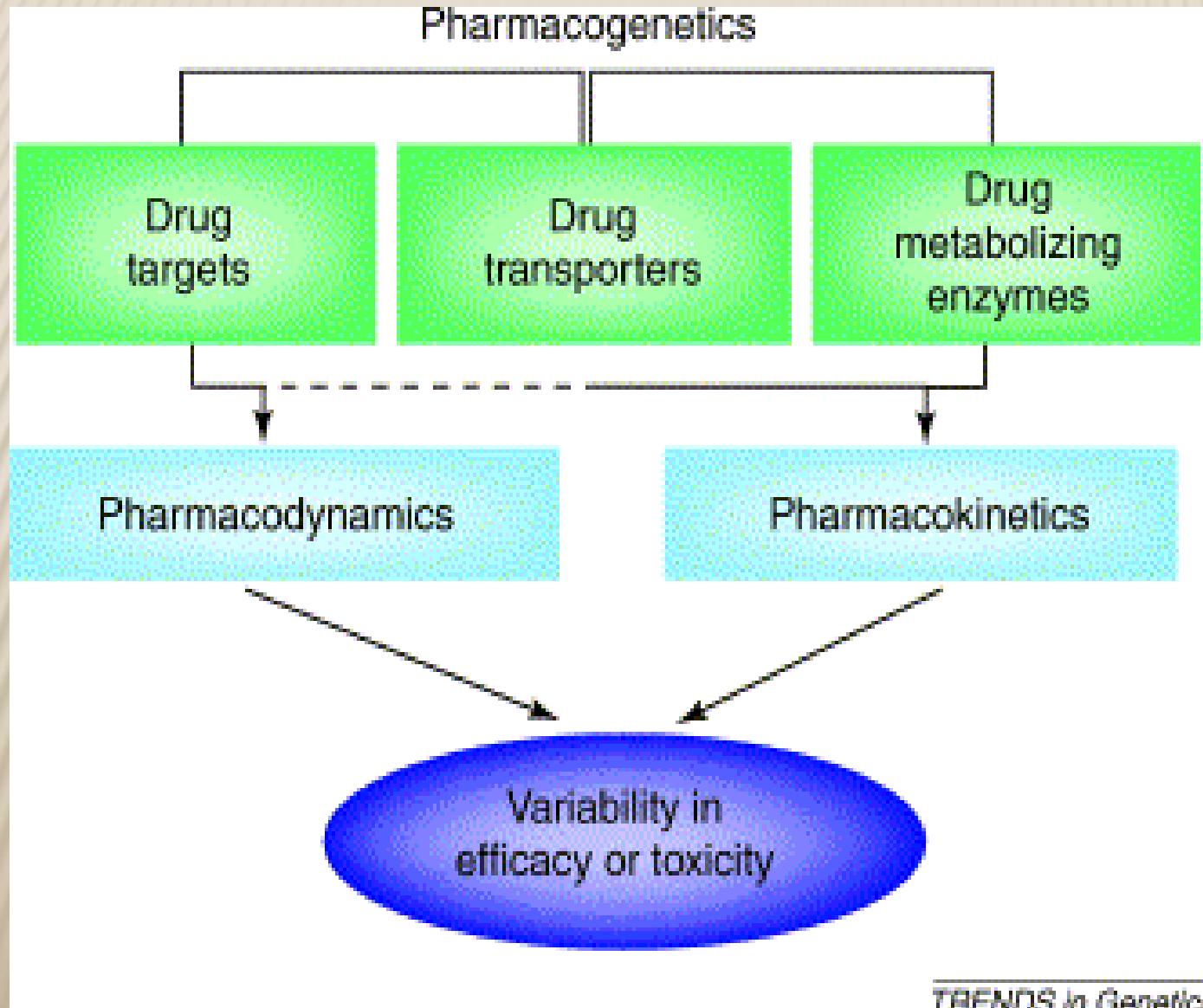
- × Různá odpověď pacientů téže populační skupiny na tentýž lék
- × Různá odpověď pacientů na kombinace těchto léků
- × Geneticky determinovaná přecitlivělost na danou látku

# FARMAKOGENETIKA A VÝVOJ LÉKŮ

---

- × Nutnost přesné diagnózy (k fenotypicky podobným stavům mohou vést různé patobiochemické mechanismy).
- × Individuální odpověď jedince na terapii může záležet na genech, vstupujících do interakce s metabolismem léku nebo jeho působením.
- × Polovina všech dosud používaných léků je metabolizována enzymy P450.

# Klíčové složky farmakogenetiky



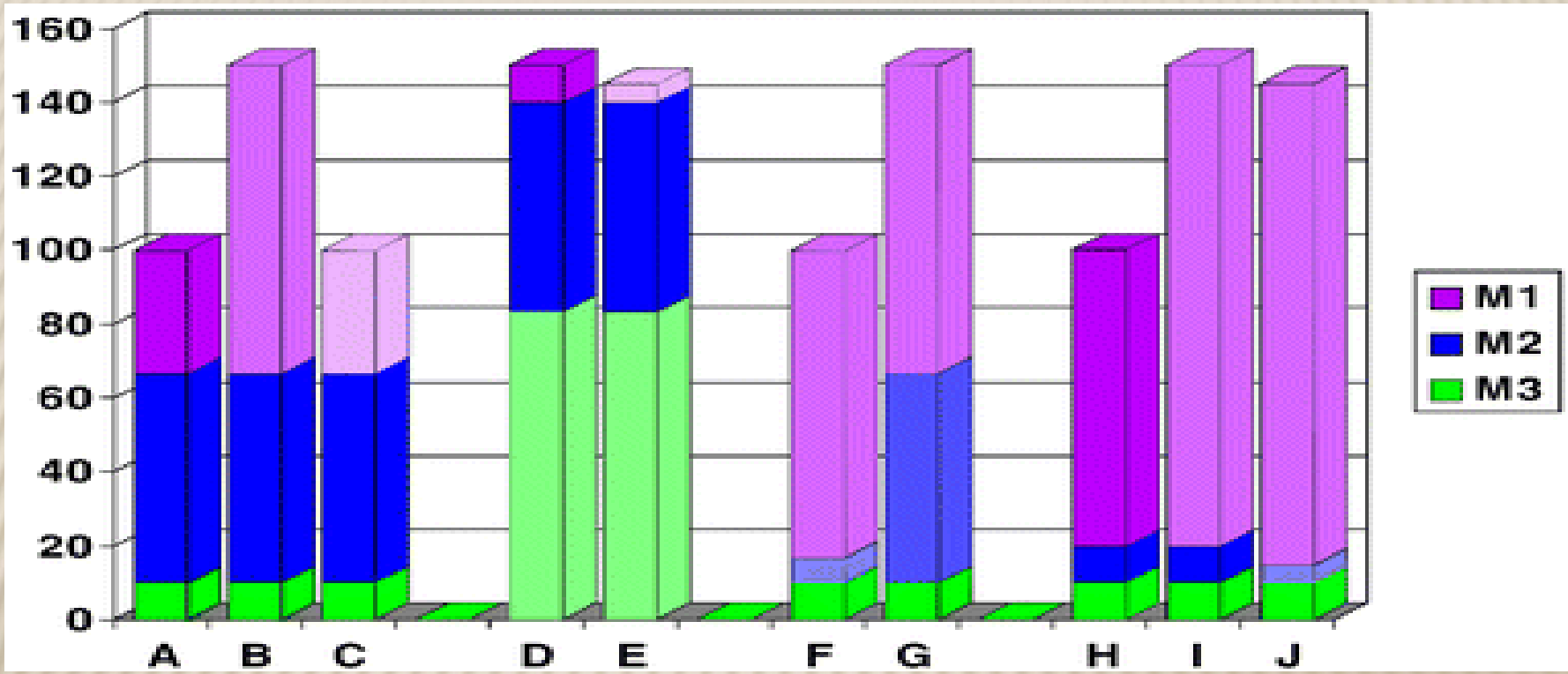


# P450

---

- × CYP3A4 – 50% metabolizovaných léků
- × CYP2D6 – 20%
- × CYP2D9 + CYP2D19- 15 %
- × CYP2D6, CYP2D9, CYP2D19 a CYP2A6 byly prokázány jako funkčně polymorfní

# MODEL TERAPIE HYPERTENZE (PODLE LINDPAINTNERA, BŘEZEN 2003)



**A**=fyziologický stav: tři molekulární mechanismy (M1, M2, M3) se podílejí na determinaci znaku (TK), **B**=hypertenze D1: selhání M1 (příčina/účast)  
**C**=hypertenze D1: kauzální terapie T1 (cílená na M1), **D**= hypertenze D3: selhání M3 (příčina účast), **E**=hypertenze D3, léčení T1: terapie není kauzální,  
**F**=hypertenze D1, paliativní terapie T2, cílená na M2, **G**=hypertenze D1, terapie T2; refrakterní varianta na T2 v M2, **H**= fyziologický stav: odlišný podíl M1 a M2 na normálním znaku, **I** = varianta hypertenze D1: selhání M1; **J** =varianta hypertenze D1: terapie T2

# FARMAKOGENETICKÁ STUDIE

---

Cílem studie bylo porovnat 3 skupiny pacientů s biologiky v klinických a genetických parametrech

- × **Skupina A:** 11 pacientů s psoriázou s adalimumabem, u nichž byla léčba tímto biologikem ukončena
- × **Skupina B:** 14 pacientů s psoriázou, u nichž léčba adalimumabem úspěšně probíhá
- × **Skupina C:** 12 pacientů s jinou diagnózou, u nichž v průběhu léčby biologiky došlo k výsevu psoriázy (1 případ hidradenitis suppurativa, 4 případy m. Crohn, 3 případy ulcerativní kolitidy, 3 případy ankylozující spondylitidy, 1 případ revmatoidní artritidy).

# MATERIÁL A METODY

---

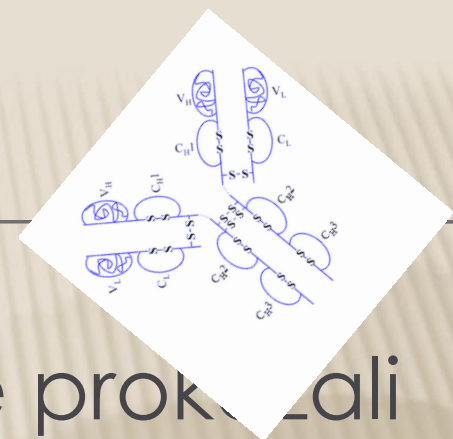
- × U všech pacientů jsme vyšetřili několik genetických polymorfismů v genech participujících na rozvoji zánětu (TNF alfa, TNF beta, TACE, IL-6, MMP-2, MMP-9, TIMP-2, ACE, CD147) a v genu potenciálně ovlivňujícím farmakokinetiku, příp. farmakodynamiku biologika (MDR1).

Dg. Psoriáza	Skupina A léčba A ukončena	Skupina B léčba A pokračuje	P
Rok narození (median, rozsah)	1953 (1928-1991)	1969 (1943-1992)	NS
Pohlaví M/Ž	4/7	12/2	0,02 (OR=10)
PASI před (median, rozsah)	14,5 (6,3-28,2)	12,9 (10,40-40,00)	NS
BSA před (median, rozsah)	25 (5-60)	25,5 (8-75)	NS
Efekt léčby za 3 měsíce	6/5 (55%)	14/0 (100%)	0,009 (OR=11)
Současný stav - zlepšení	10/1 (91%)	14/0 (100%)	NS
Onset psoriázy (median, rozsah, roky)	21,5 (0-60)	21,0 (7-53)	NS
Pozdní onset psoriázy (nad 40 let věku)	20%	8%	NS

	<b>Skupina A</b>	<b>Skupina B</b>	
<b>Pozitivní rodinná anamnéza psoriázy</b>	40%	38%	NS
<b>Pozitivní rodinná anamnéza R/S/D</b>	30%	8%	NS
<b>Pozitivní rodinná anamnéza jiní než R/S/D</b>	0%	31%	NS
<b>+ RA KV nemocí</b>	70%	85%	NS
<b>+ RA DM</b>	30%	62%	NS
<b>+ RA tumorů</b>	30%	8%	NS
<b>+ RA alergií</b>	40%	23%	NS

<b>Dg. Psoriáza- Komorbidity</b>	<b>Skupina A léčba A ukončena</b>	<b>Skupina B léčba A pokračuje</b>	<b>P</b>
<b>Komorbidity - počet</b>	90%	60%	NS
<b>Kardiovaskulární nemoci</b>	50%	38%	NS
<b>Diabetes mellitus</b>	20%	0%	NS
<b>Tumory</b>	30%	8%	NS
<b>Alergie</b>	40%	8%	NS
<b>Angíny v dětství/ tonsilektomie</b>	20%	31%	NS

# VÝSLEDKY

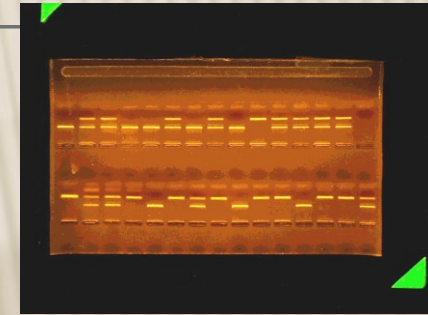
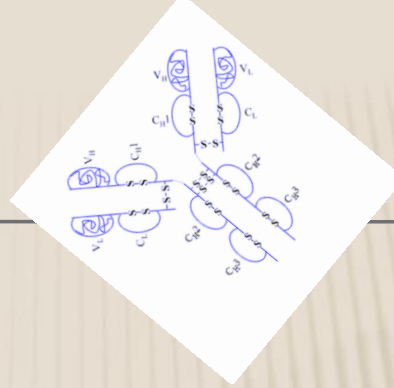


- × Mezi pacienty skupin A a B jsme prokázali signifikantně nižší efekt léčby adalimumabem za 3 měsíce od počátku ( $P=0,009$ ), častěji u žen.

<b>Efekt léčby za 3 měsíce A/N</b>	<b>6/5 (55%)</b>	<b>14/0 (100%)</b>	<b>0,009 (OR=11)</b>
------------------------------------	------------------	--------------------	--------------------------



# VÝSLEDKY



- × **Ve skupině A** je signifikantně asociován
  - genotyp v I/D ACE s hodnotou PASI a BSA před začátkem terapie biologiky a
  - rodinná anamnéza psoriázy v 1. linii (rodiče, děti, sourozenci) s genotypem v MMP-9.

# Skupina A – adalimumab – studie ukončena

I/D ACE 3	PASI před průměr	PASI před N	PASI před Minimum	PASI před Maximum	PASI před medián
ID+DD	12,5	8	6,3	24,5	9,1
II	25,3	3	22,5	28,2	25,3
Vš.skup.	16	11	6,3	28,	14,5

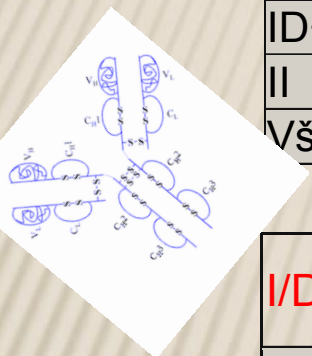
P=0,02

I/D ACE3	BSA před průměr	BSA před N	BSA před Minimum	BSA před Maximum	BSA před medián
ID+DD	19,9	8	5	40	15,5
II	49,3	3	38	60	50,0
Vš.skup.	27,9	11	5	60	25,0

P=0,03

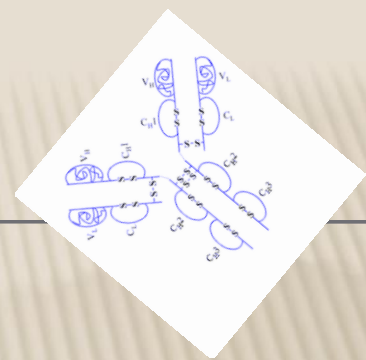
MMP9-1575	Rodiče/ sourozenci/ děti nemají psoriázu	Rodiče/ sourozenci/ děti mají psoriázu	Řádk. součty
CT	1 (14%)	3 (100%)	4
CC	6 (86%)	0 (0%)	6
Vš.skup.	7	3	10

P=0,03



# VÝSLEDKY

---



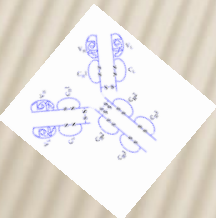
**Ve skupině B** jsme prokázali

- delší léčbu biologiky u genotypu GG v polymorfismu TNFalfa – 308 A/G (P=0,03),
- lepší efekt léčby biologikem u genotypu TT (P=0,04) polymorfismu v MMP-2 -790T/G a u genotypu CC polymorfismu MMP- 9 -1575 T/C.

# SKUPINA B – ADALIMUMAB – STUDIE PROBÍHÁ

TNF ALFA -308 A/G	Délka léčby (M) průměr	Délka léčby (M) N	Délka léčby (M) Minimum	Délka léčby (M) Maximum	Délka léčby (M) medián
GG	15,9	8	2	30	14,5
GA	47,2	6	17	87	35,0
Vš.skup.	29,3	14	2	87	26,5

P=0,03



MMP-2 -790T/G	Efekt léčby 3M Ano	Efekt léčby 3M Ne	Řádk. součty
TT	3 (30%)	4 (100%)	7
TG	7 (70%)	0 (0%)	7
Vš.skup.	10	4	14

P=0,04

MMP9-1575 C/T	Efekt léčby 3M Ano	Efekt léčby 3M Ne	Řádk. součty
CT	6 (60%)	0 (0%)	6
CC	4 (40%)	4 (100%)	8
Vš.skup.	10	4	14

P=0,07

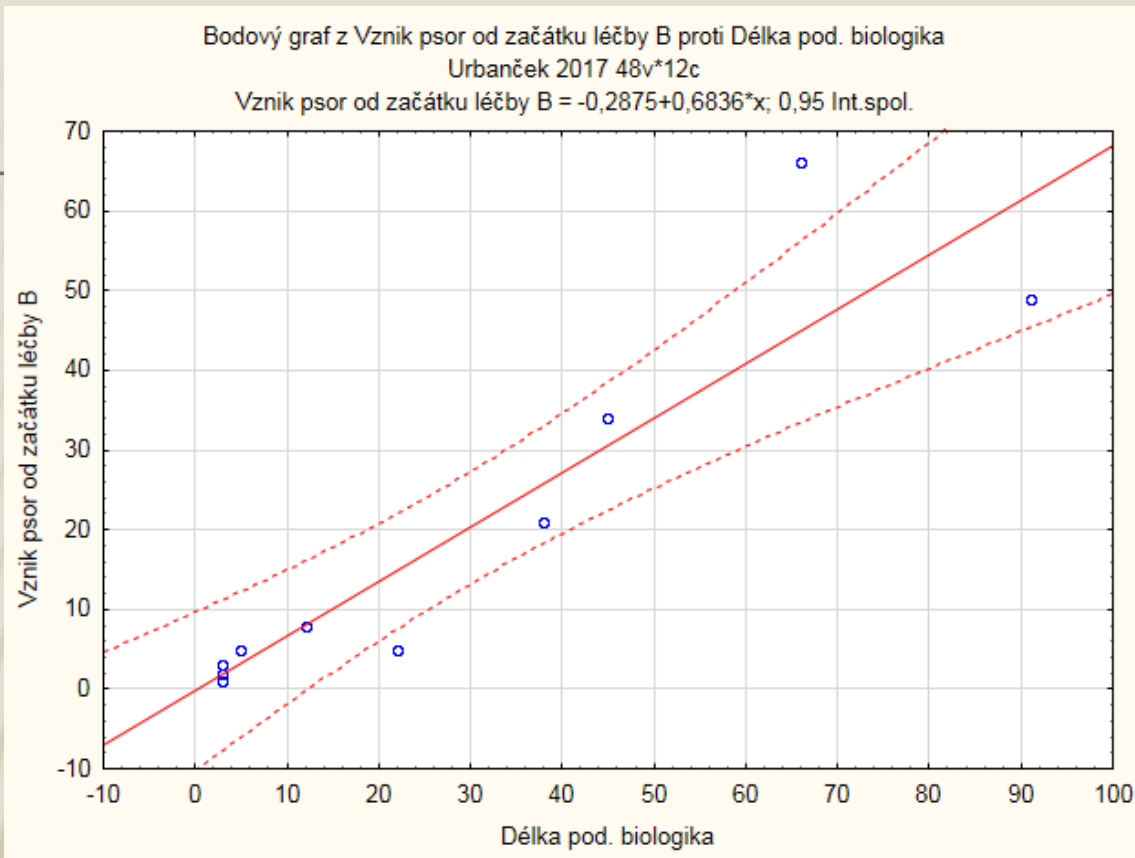
## Skupina C: pacienti léčení biologiky se vznikem psoriázy

Rok narození	Pohlaví	Dg	Biologikum	Délka pod. biologika	Rozvoj psoriázy od začátku léčby B (M)
1962	Muž	Hidradenitis suppurativa	adalimumab	3	1
1985	Muž	Ankyl spondilitis	adalimumab	22	5
1957	Muž	Ankyl. Spondilitis	golimumab	5	5
1970	Muž	Ankyl.spondilitis	adalimumab	3	3
1962	Žena	Iridocyklitis, m.Crohn	adalimumab	12	8
1976	Žena	m. Crohn	adalimumab	10	
1976	Žena	m.Crohn	infliximab	45	34
1985	Žena	m.Crohn	infliximab	42	
1970	Muž	Ulcerózní kolitis	infliximab	3	2
1952	Žena	Ulcerózní kolitis	infliximab	38	21
1976	Žena	Ulcerózní kolitis	infliximab	91	49
1964	Muž	RA	certolizumab	66	66

# VÝSLEDKY

---

- Délka podávání biologika vysoce signifikantně korelovala ve skupině C s dobou vzniku psoriázy od začátku léčby ( $P=0,00002$ ).
- Délka podávání biologika byla signifikantně asociována s genotypem v polymorfismu C3435T genu pro MDR1 ( $P=0,02$ ).
- Podávání další léčby v případě neúspěšnosti léčby biologické bylo asociováno s genotypem v polymorfismu MMP-2 -790 T/G ( $P=0,03$ ).



P=0,00002

MDR1-C3435T	Délka pod. biologika N	Délka pod. biologika Minimum	Délka pod. biologika Maximum	Délka pod. biologika medián
TT	4	3	38	3
CT	7	5	66	22
CC	1	91	91	91
Vš.skup.	12	3	91	17

P=0,02

MMP-2-790	Další léčba II Ano	Další léčba II Ne	Řádk. součty
GT	0 (0%)	4 (66%)	4
TT	6 (100%)	2 (33%)	8
Vš.skup.	6	6	12

P=0,03



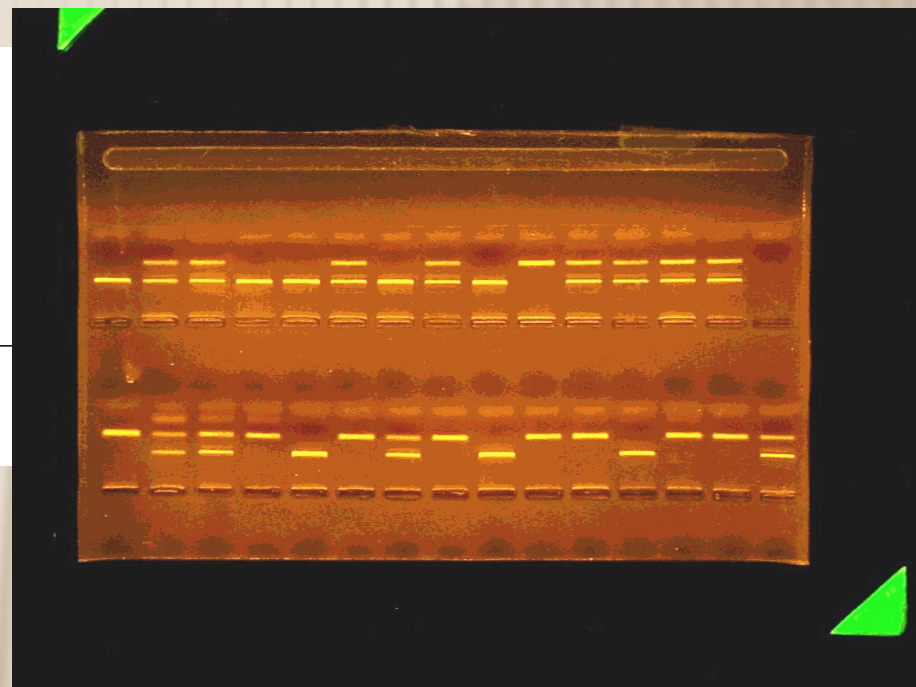
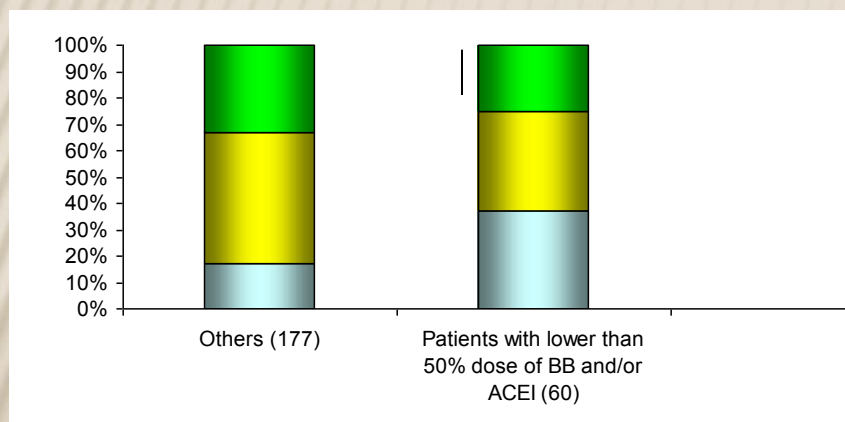
# ZÁVĚR

---

- × Závěrem je tedy možno konstatovat, že úspěch biologické léčby souvisí s některými vrozenými genotypy v prozánětlivých genech.
- × Rozvoj psoriázy u pacientů s biologickou léčbou zřejmě souvisí s genotypy v polymorfismech v MDR1. Produkt tohoto genu je schopen snižovat hladiny xenobiotik v buňkách.
- ×

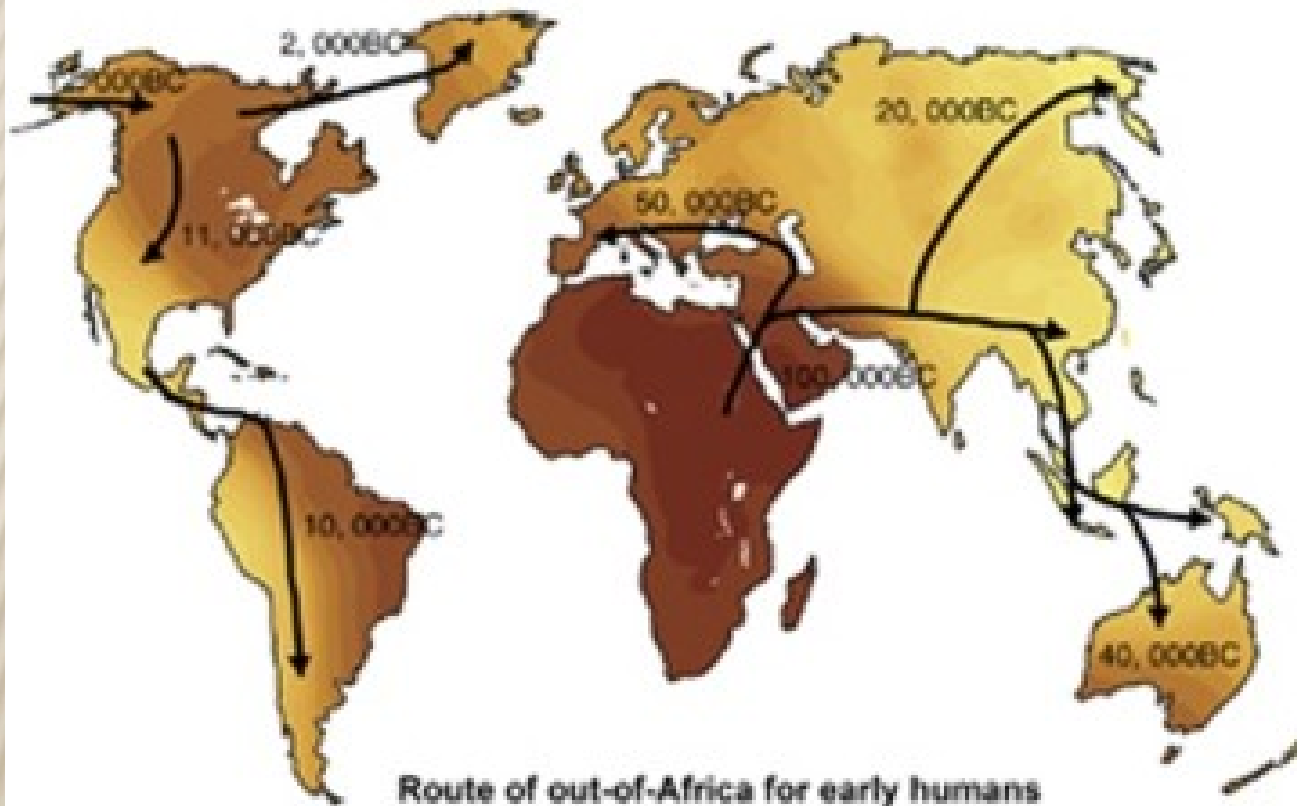
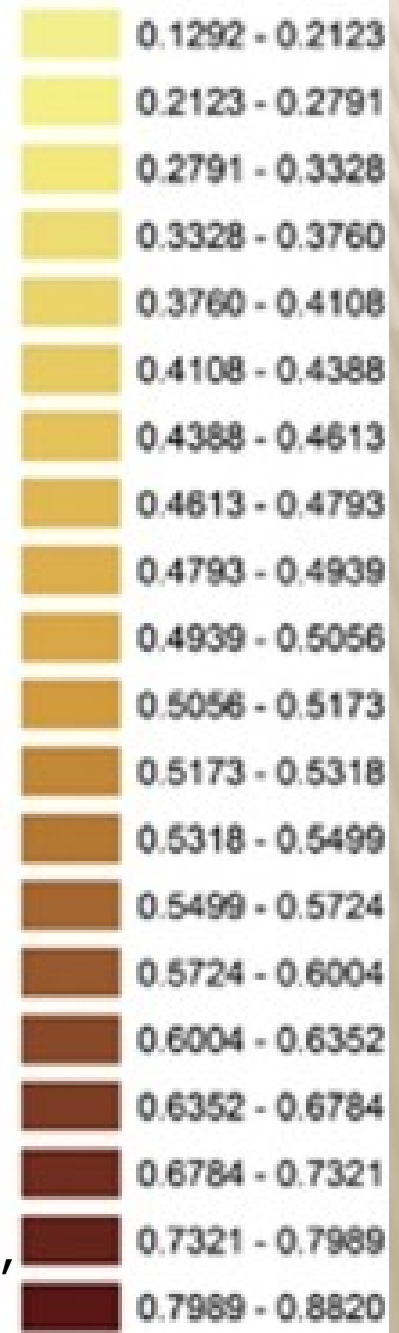
# CHRONICKÉ SRDEČNÍ SELHÁNÍ FARMAKOGENETICKÉ ROZDÍLY V DÁVKOVÁNÍ BETA BLOKÁTORŮ A ACEI- I/D ACE

Pacienti s nižší než 50% dávkou z doporučené dávky BB+ACEI mají  
**2,84 x častěji genotyp II,**  
**P=0,002**



**Pg=0,006, Pa=0,009**

**Frequency of D allele**



# DĚKUJI VÁM ZA POZORNOST

---

