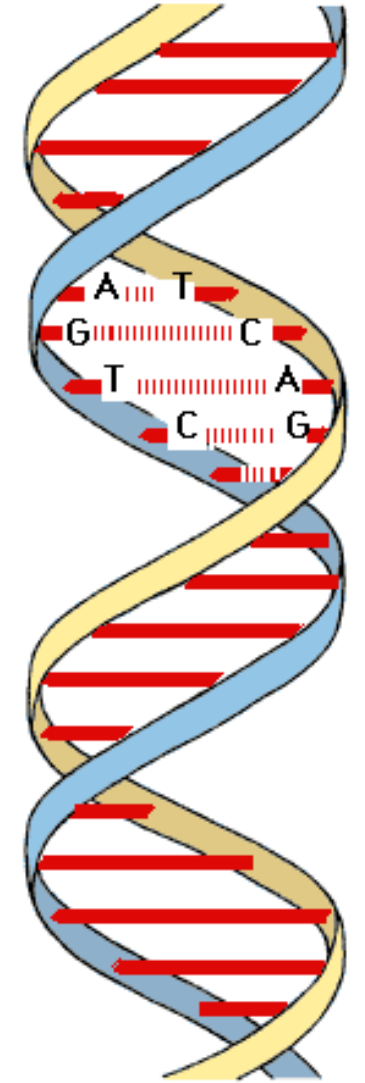


Genetika a genomika v patofyziologii nemocí

Embryolog
Jaro 2024



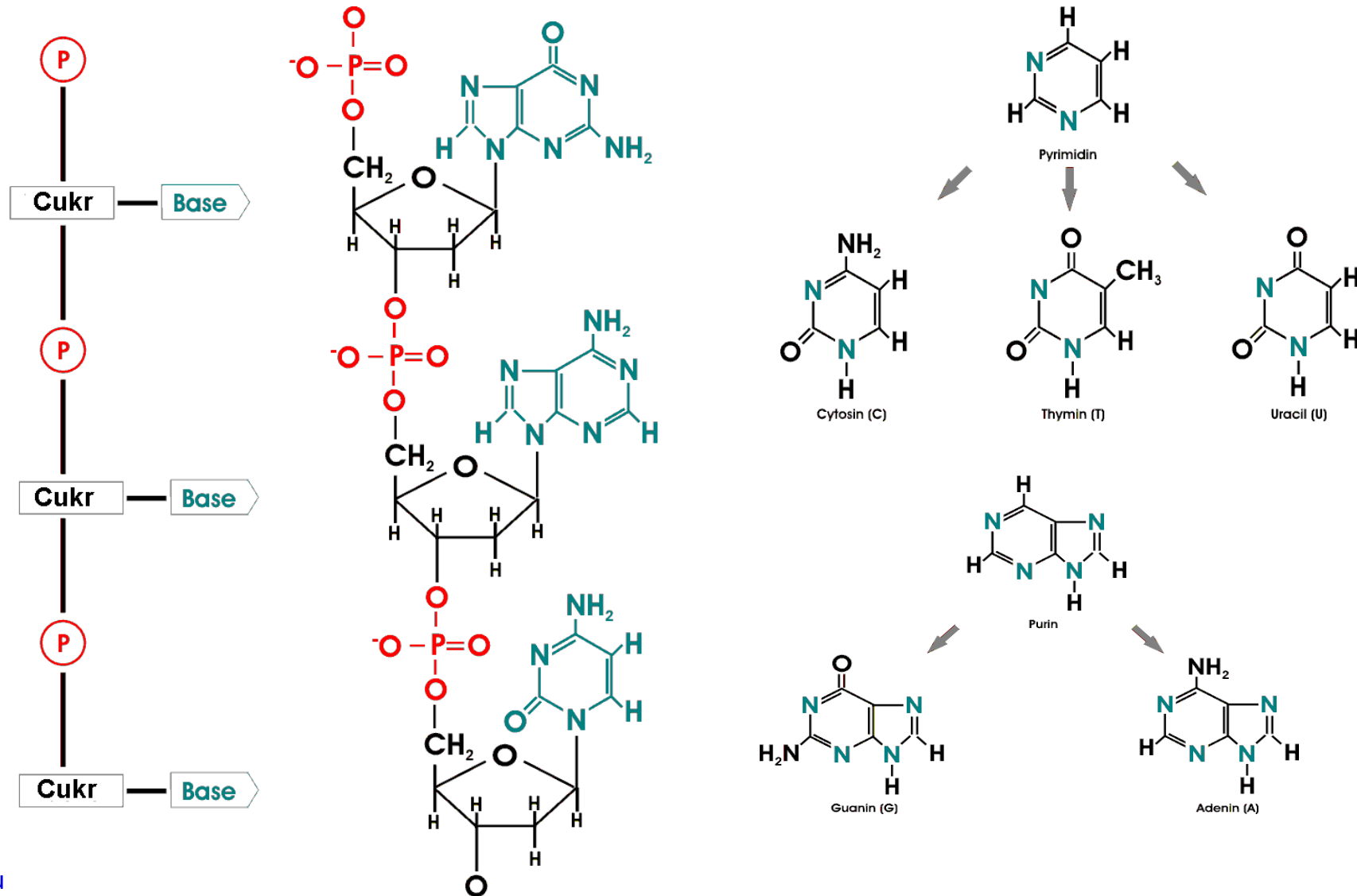
Genom ve zdraví a nemoci

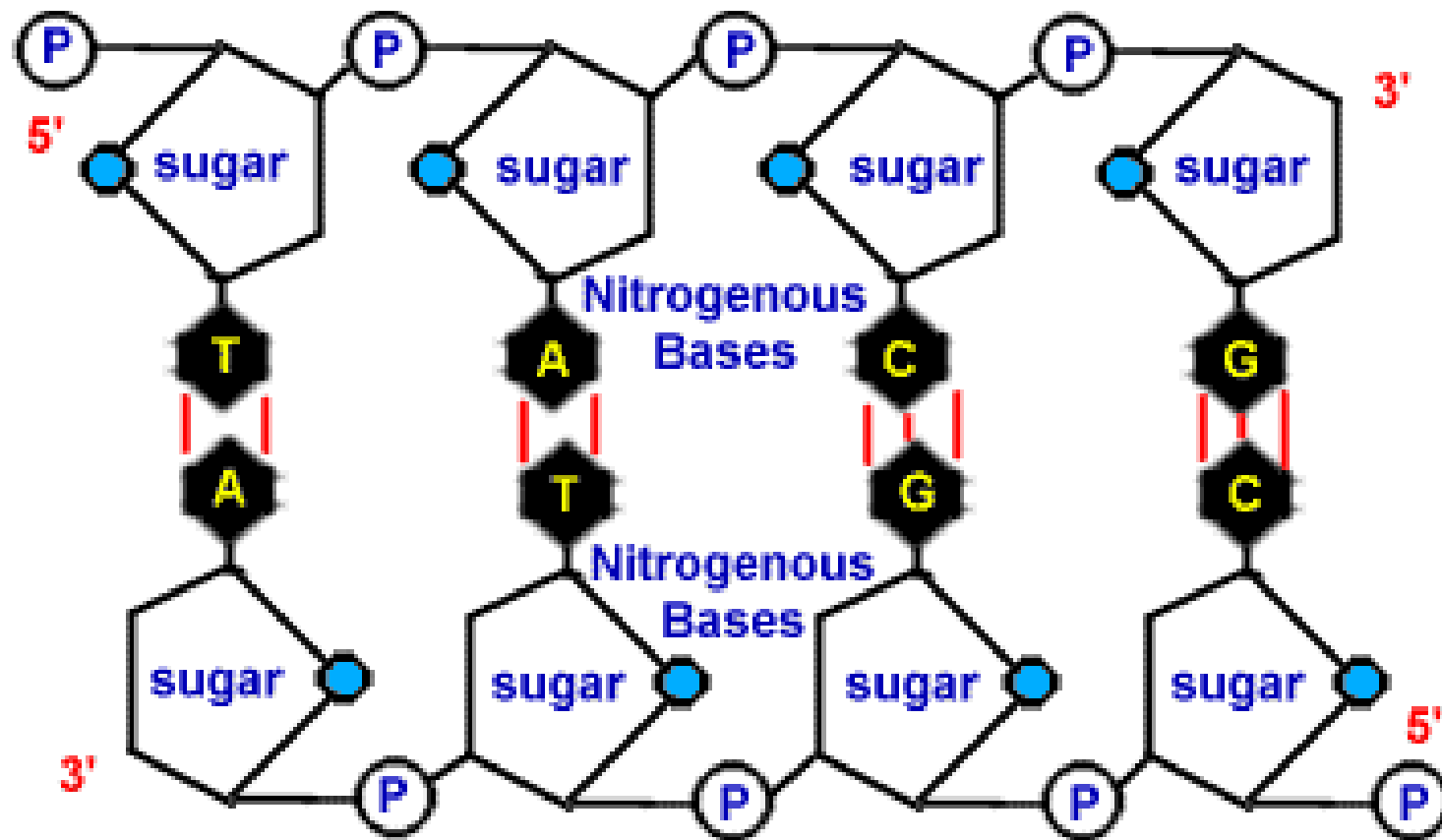
- Genetická výbava jedince (souhrn všech genů=genom) je sice osudově zadána v okamžiku zplazení, ale není pro další život konečná, protože v průběhu života se může měnit jak
 - pod vlivem četných faktorů prostředí, tak
 - faktorů epigenetických (metylace, acetylace histonů, glykace),
 - tak pod vlivem 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 bází mezi C1 deoxyribózy (DNA) a ribózy (RNA) a N1 pyrimidinových bází a N9 purinových bází.
- **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

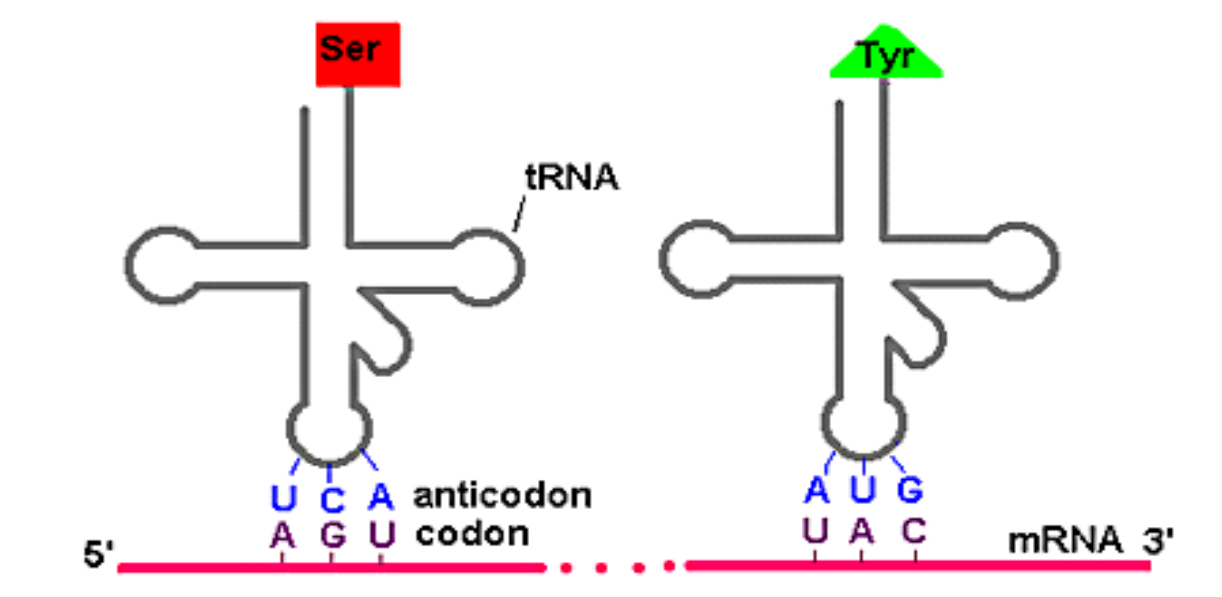
- Některé geny **kódují protein**. Jejich transkribovaná RNA se nazývá heterogenní nukleární RNA (**hnRNA**). Ta se upravuje (processing) na mRNA.
- Messenger RNA (**mRNA**) je lineární kód, který je možno převést (translace) do sekvence **AK** polypeptidu pomocí kodonů a antikodonů (o 3 znacích) pro 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 μm .
- 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	3rd base in codon	U C A G
	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

Koncepce „Read and Write genome“

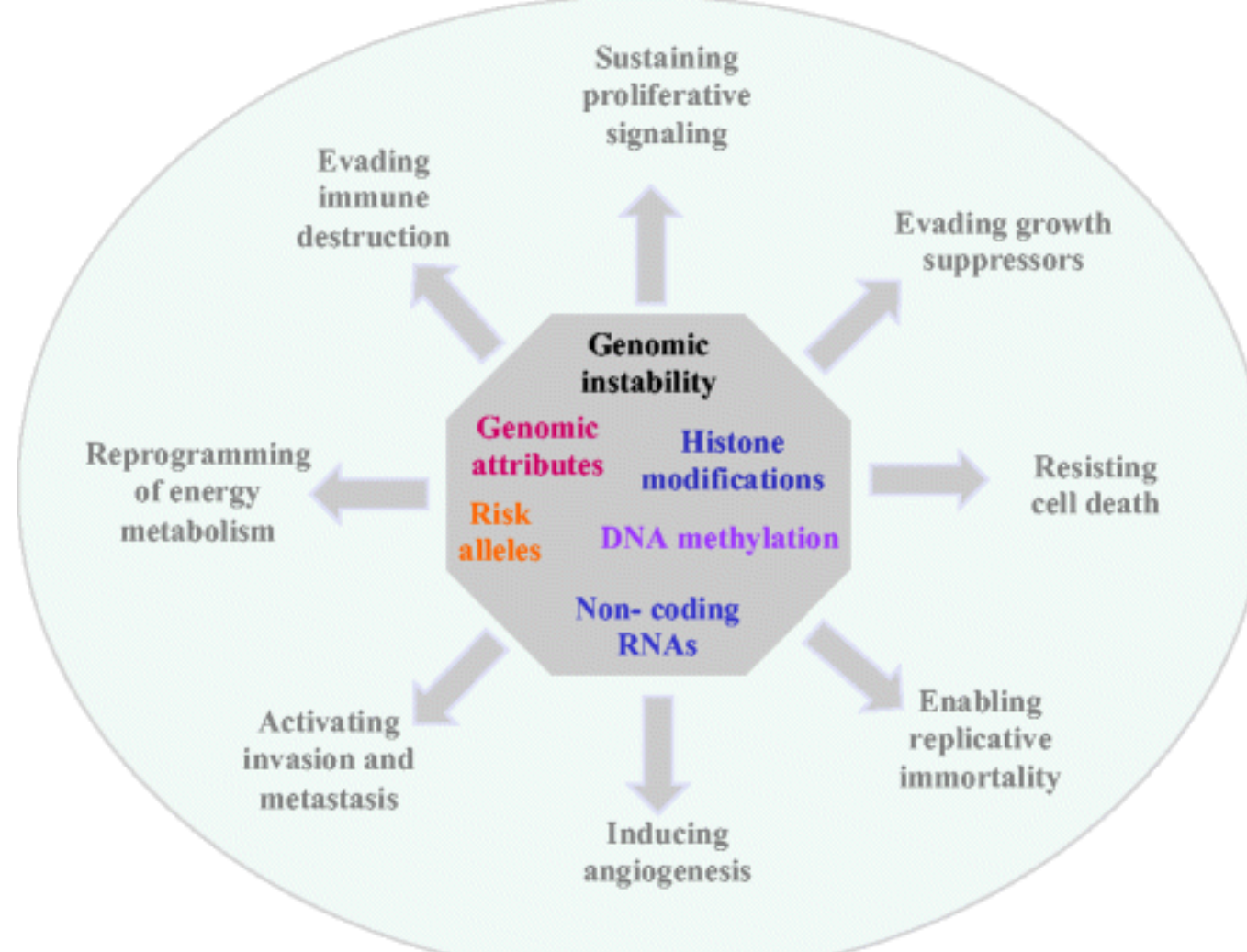
- Genomy jsou databáze DNA, které obsahují kódující a formátující sekvence, které umožňují dědičné předání schopnosti syntetizovat biologicky adaptivní molekuly RNA a proteinů. V průběhu evoluce se kódující sekvence i formátující signály mění, což umožňuje stále nové adaptace pomocí restrukturalizace genomu ([Shapiro, 2011](#) a [Shapiro, 2013](#)).
- Dynamický read–write (RW) genome střídá tradiční představu „read only memory“ (ROM) genomu.

Koncepce „Read and Write (RW) genome“

- Základní ideou této koncepce je myšlenka, že buňky používají DNA jako modifikovatelný prostředek skladující data („data storage medium“), který kóduje RNA a proteinové molekuly: tyto molekuly si musejí poradit s měnícím se prostředím.
- Změna je pro žijící organismy kontinuálním dějem. Ke změnám dochází během průchodu buněk cyklem buněčného dělení, s měnícími se vlastnostmi vnějšího prostředí, se zkušeností buněk s poškozením, s vývojem multicekulární morfogenezy a s interakcí buněk s jinými buňkami a organismy.

Koncepce „Read and Write (RW) genome“

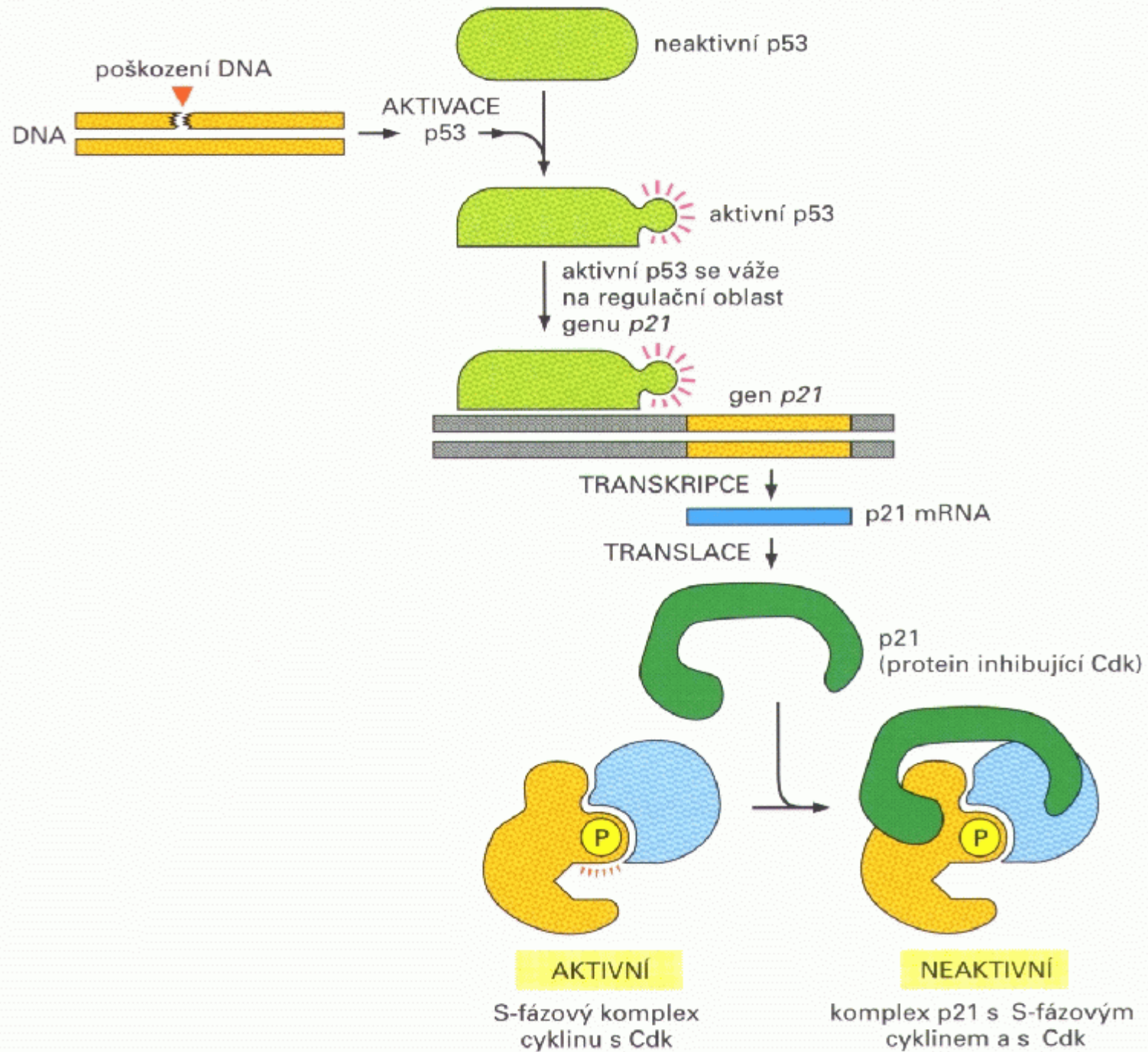
- Ke zvládnutí **krátkodobých změn** buňky primárně nasazují přechodně vznikající nukleoproteinové komplexy, které jsou schopny regulaci exprese genomických dat a umožňují tak **růst a replikaci buněk**.
- Pro **dlouhodobější změny**, jako je **buněčná diferenciace a multicelulární morfogeneze**, vstupují do hry dědičné epigenetické modifikace genomu.
- Pro **nejdlouhodobější změny**, které vytvářejí nové biologické funkce během evoluce, buňky nasazují schopnost „**natural genetic engineeringu**“, které umožňují přebírat a alterovat sekvence DNA a rekonfigurovat organizaci genomu. Někdy tyto funkce mění strukturu DNA také v zájmu krátkodobých cílů (např. rychlá nastolená diverzita mezi receptory adaptivního imunitního systému).



Tumorigeneze je komplexní evoluční proces zahrnující mnoho genetických a epigenetických alterací. Epigenetické změny během iniciace a progresu tumoru poskytují abundantní zdroj variability, která podporuje rychlou adaptaci tumoru a poskytuje bohatý zdroj labilních biomarkerů pro genetickou analýzu.

Geny udržující stabilitu genomu

- Označují se někdy jako *mutatorní geny* a bývají i řazeny k *tumor-supresorovým genům*. Produkty těchto genů se uplatňují v opravných mechanismech poškozené DNA.
- Jejich mutace vede ke zvýšené frekvenci mutovaných onkogenů a tumor-supresorových genů, někdy až 1000krát.



Geny udržující stabilitu genomu

- Patří sem geny, jejichž produkty zajišťují vystřížení poškozeného úseku DNA a umožňují **excizní opravný proces**. Jejich recesivní mutace způsobuje onemocnění zvané *xeroderma pigmentosum* a *Cockayenův syndrom*, což jsou prekancerózy se zvýšenou náchylností ke karcinomům kůže navozeným expozicí na UV-zářením.

Geny udržující stabilitu genomu

- Další skupinou mutatorních genů jsou „**mismatch**“ **opravné geny**; kódované proteiny opravují chybné zařazení baze při replikaci DNA (nikoliv však komplementární). Projevem mutací těchto genů je instabilita na nukleotidové úrovni – *mikrosatelitová instabilita*. Zárodečné mutace zejména MSH2 a MLH1 genů jsou podkladem *hereditárního nepolypózního kolorektálního karcinomu (HNPCC)*.
- Mutace genů, jejichž produkty zajišťují „**opravné čtení**“, jehož úkolem je identifikace chybných úseků DNA při replikaci, byly prokázány u karcinomu žaludku a tlustého střeva. Jedná se především o mutaci genu pro *polymerasu d*.

Geny udržující stabilitu genomu

- Rozpoznání poškozené DNA a aktivace p53 vyžaduje přítomnost ATK. Tento gen kóduje kinasu, která aktivuje jak CHK2 tak p53 při poškození DNA. Děti trpící *ataxií-teleangiectazií* mají inaktivující mutaci obou alel.
- V klinickém obraze je pak imunodeficience, mozečkové příznaky a zvýšené riziko vzniku maligního nádorového onemocnění, především lymfomů. Buňky těchto pacientů nemohou aktivovat p53 jako odpověď na poškození DNA.

Geny udržující stabilitu genomu

Jiný syndrom označovaný jako *NBS (Nijmegen breakage syndrom)* je způsoben homozygotní inaktivací genu *NBS*, který se podílí přímo na opravách poškozené DNA. Do tohoto mechanismu rozpoznávajícího a opravujícího poškozenou DNA vstupuje též gen *BRCA1*. Mutace v jedné alele zárodečných buněk nesoucích tento gen je odpovědná asi za polovinu případů karcinomu mléčné žlázy s familiárním výskytem. Při účinku proteinu *BRCA1* hraje důležitou funkci jak *ATM* tak *CHK2*, které umožňují jeho fosforylaci, když dojde k poškození DNA. *ATM* také fosforyluje kofaktor *BRCA1* - *CtIP*, který reguluje transkripci genu *BRCA1*. Defekty DNA-opravného mechanismu přispívají k akumulaci genetických defektů (viz genová nestabilita navozená genem *HNPCC* = gen pro hereditární nepolypózní kolorektální karcinom) a podporují progresi maligně transformovaných buněk.

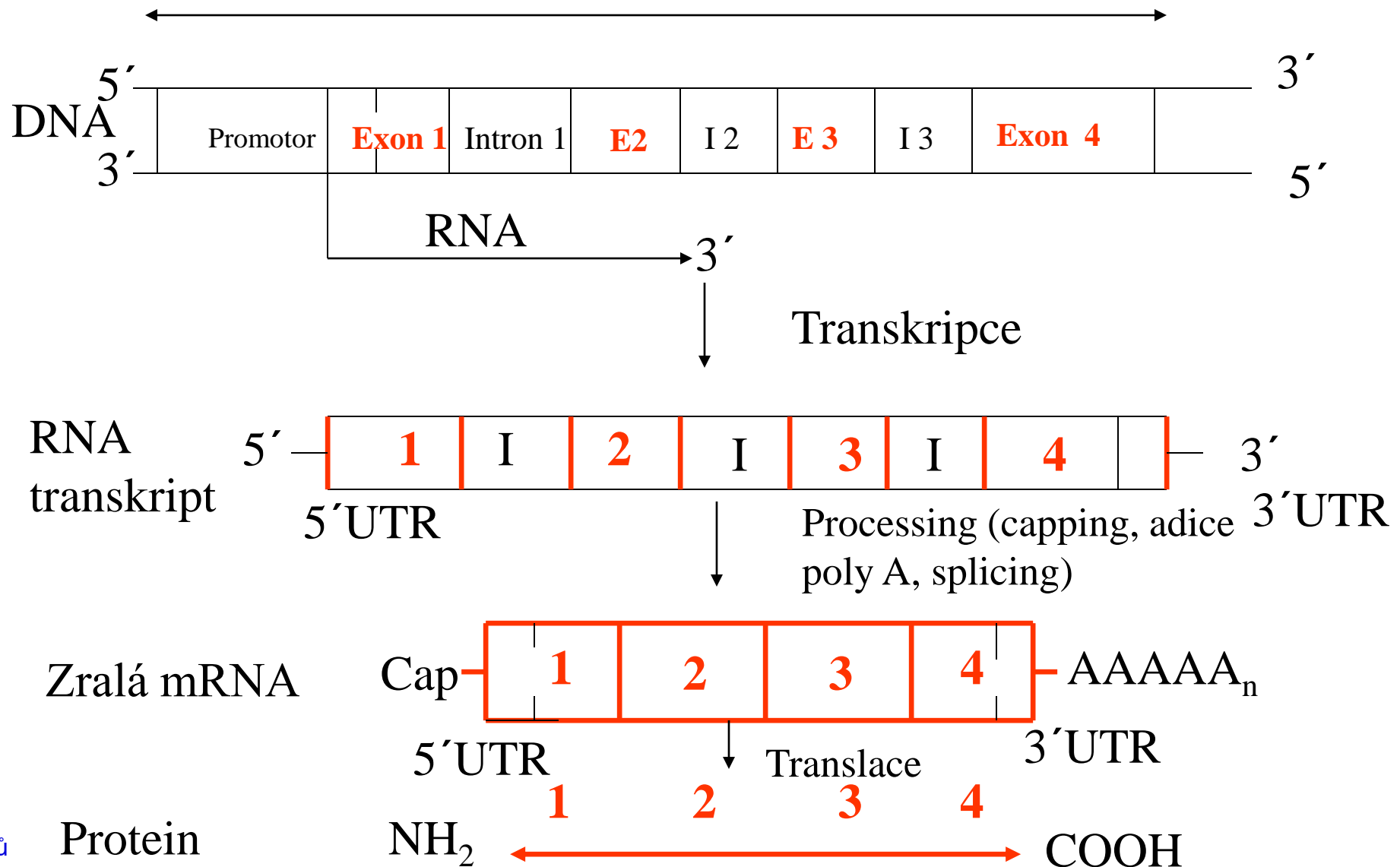
Tumor-supresorový protein p53 (TP53)

- je jeden z nukleárních proteinů, který má klíčovou úlohu v regulaci cyklu buněčného dělení při přechodu z G0 do G1-fáze. Obsahuje domény pro vazbu na specifický úsek DNA, dále oligomerizující a transkripci aktivující domény. Váže se jako tetramer na vazebné místo na určitém úseku DNA a tím aktivuje expresi genů, kódujících faktory inhibující proliferaci a podporující invazivitu buněk.
- *Mutanty genu p53* jsou nalézána u řady maligních tumorů. Pozměněný TP53 ztrácí schopnost vazby na příslušný lokus DNA, což vede k nedostatečné produkci faktorů potlačujících nádorový růst. Alterace genu p53 se objevuje nejen jako somatická mutace, ale též jako mutace v zárodečných buňkách u některých nádorových onemocnění s familiárním výskytem (*syndrom Li-Fraumeni*)

Tumor-supresorový gen p53

- je klíčovým regulačním faktorem, který monitoruje poškození DNA. I
- inaktivace p53 bývá jedním z prvních kroků, který vede k maligní transformaci při vývoji řady nádorových onemocnění.
- Pacienti s *Li-Fraumeniho syndromem* mají obvykle jednu mutantní alelu v zárodečných buňkách a tím i riziko vzniku sarkomů, leukemie a karcinomu mléčné žlázy. Vzácně pacienti s *Li-Fraumeniho syndromem* nemají v zárodečných buňkách tuto mutaci, ale mutaci genu *CHK 2*, kódující proteinkinasu, která fosforyluje protein p53, čímž dochází k jeho aktivaci. Tito pacienti však mívají alteraci v jiných genech – *MDM 2* a *p14ARF*, které regulují expresi p53.

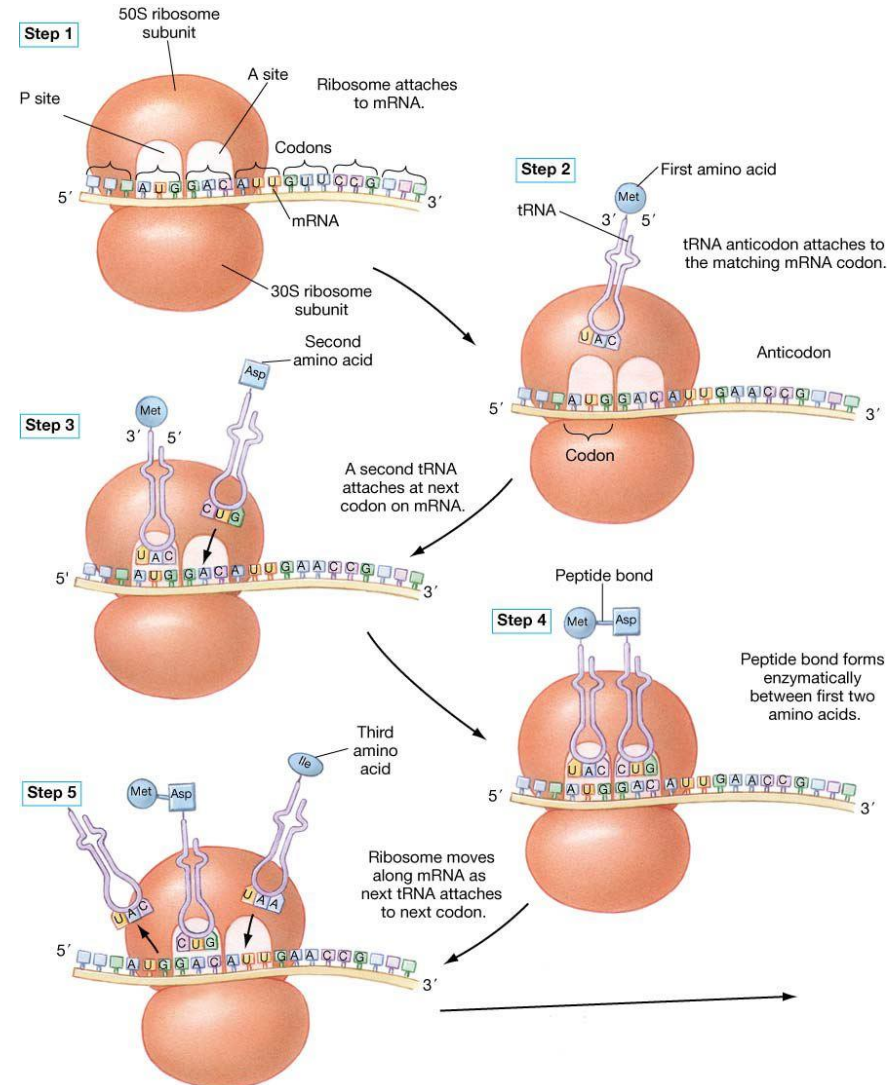
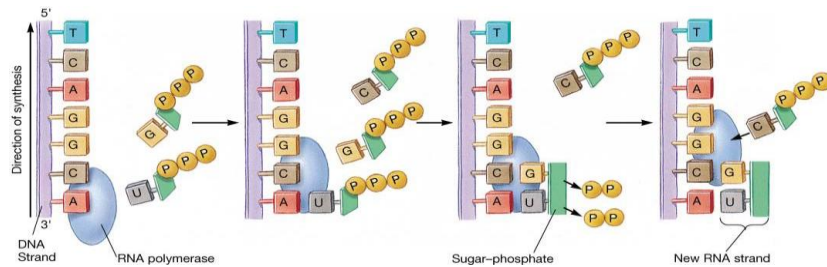
Lidský gen



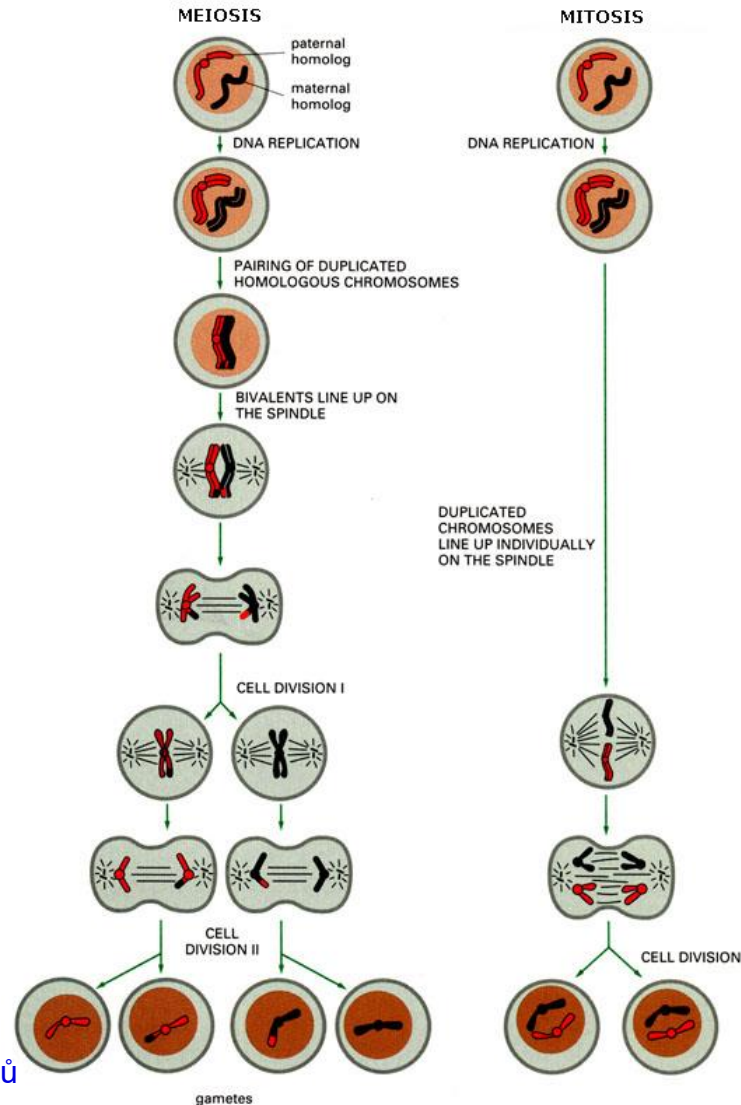
Základní terminologie

- 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

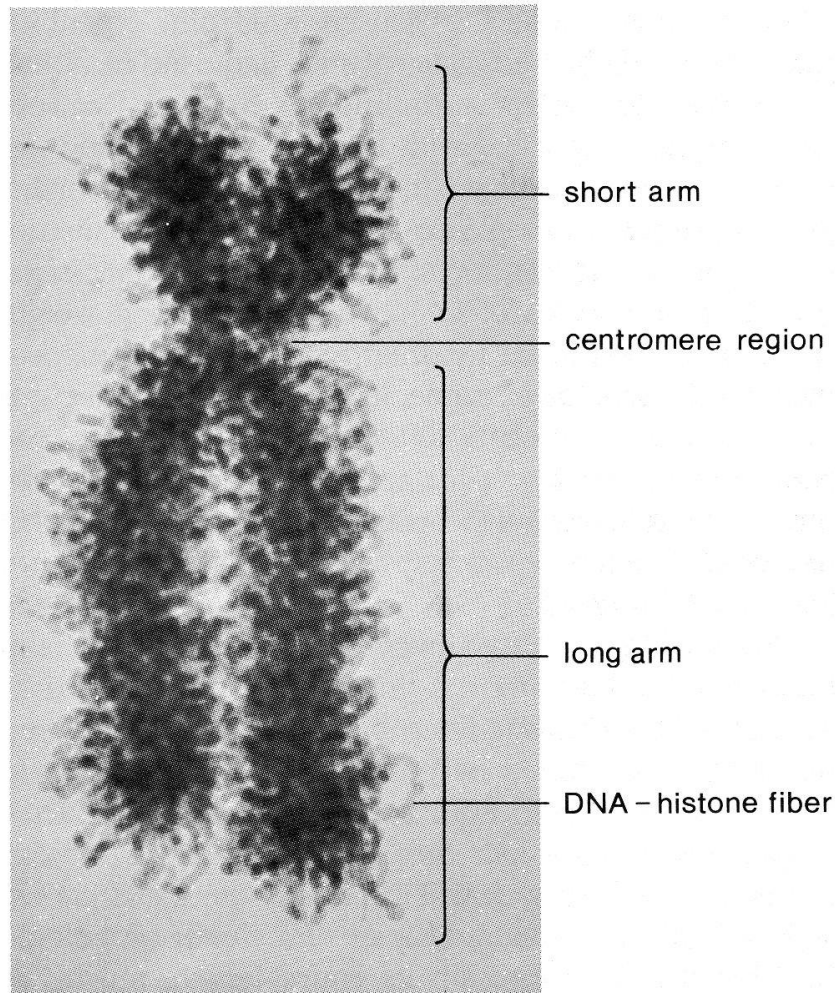
2 dceřinné buňky s haploidním počtem chromozomů

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 gonozomů (44XX nebo 44XY)

zárodečné (vajíčko, spermie) 23 – **haploidní**
struktura chromozomu

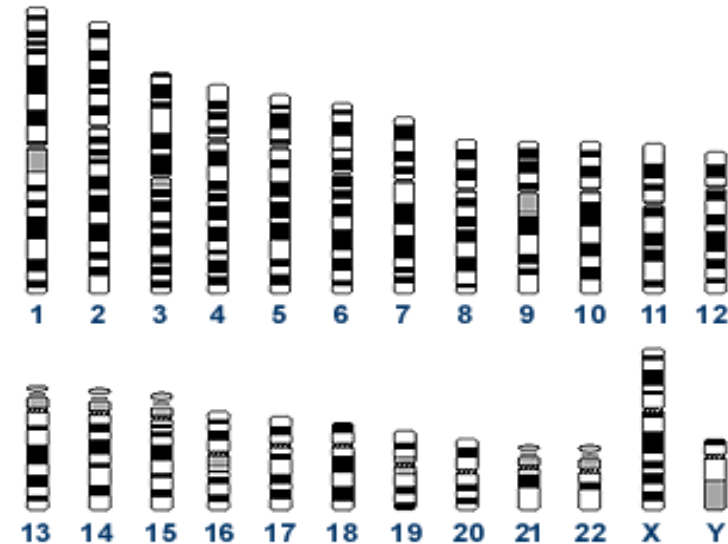
centromera

telomery (raménka)

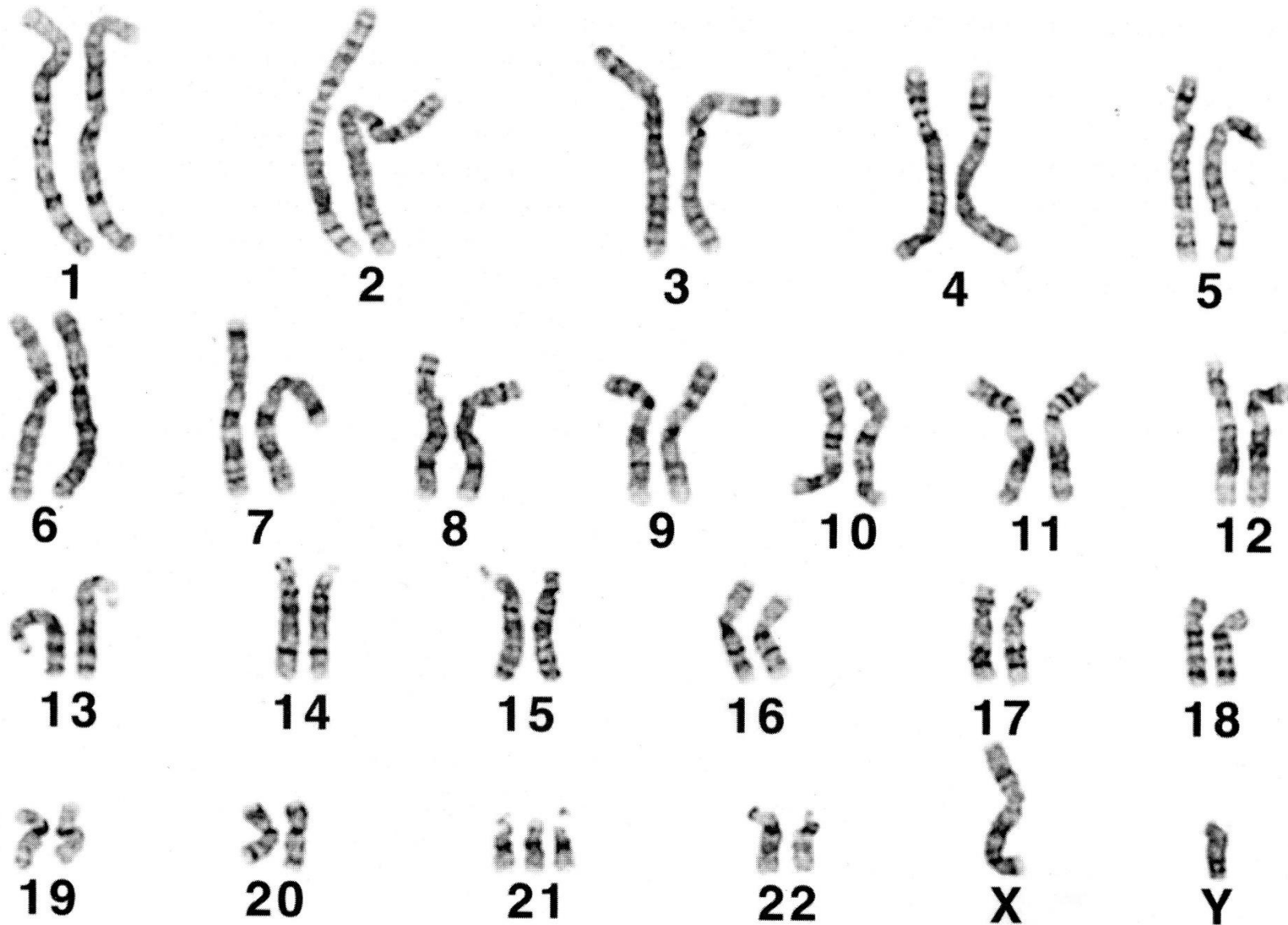
dlouhé - q

krátké - p

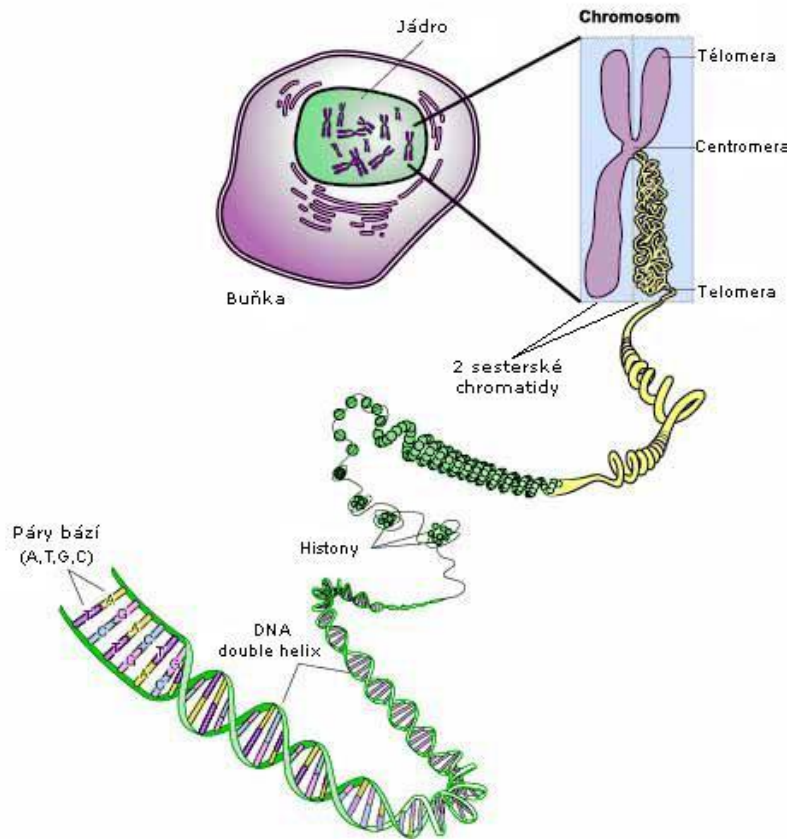
barvením chromozomů se dosáhne charakteristického pruhování a tím rozlišení jednotlivých chromozomů



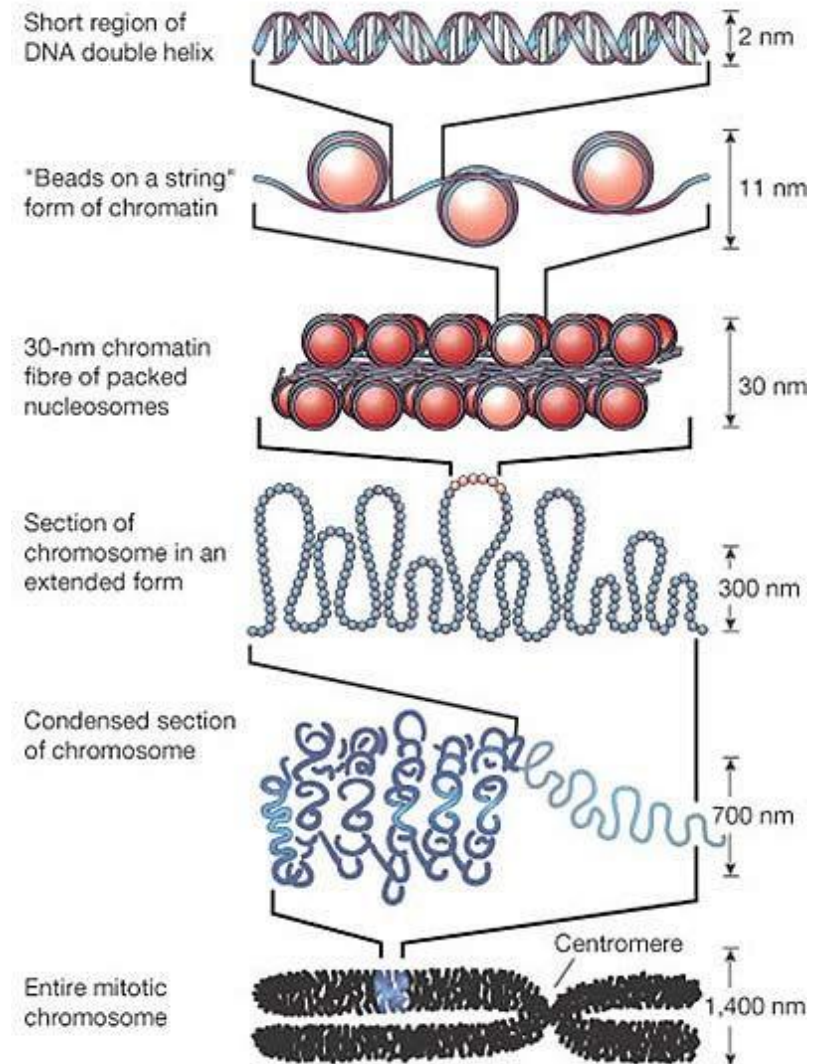
Karyotyp podle Denverké klasifikace



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)

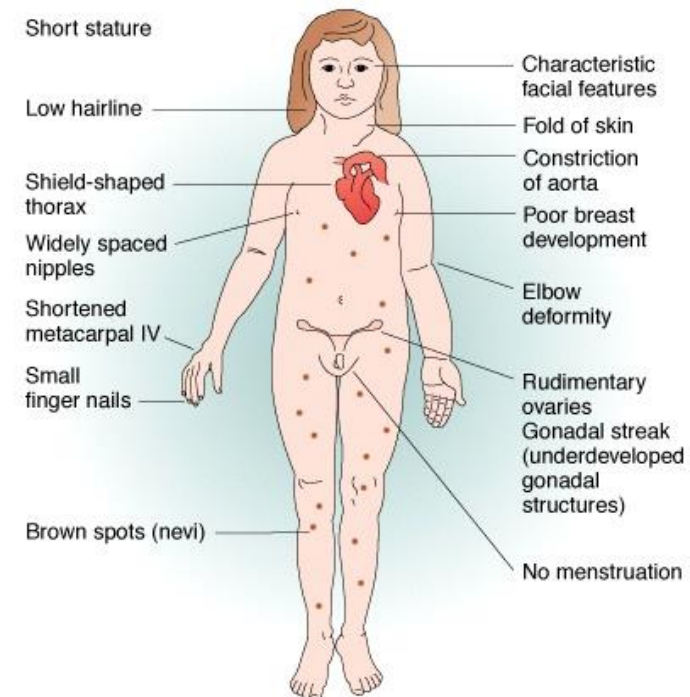
polyploidie (porucha rozdělení celých sad nebo
oplození 2 spermii [dispermie])

u člověka neslučitelné se životem

těhotenství je potraceno

molla hydrafidosa (a pak těhotenství nutno ukončit
potratem)

porod novorozence s triploidii – 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: β^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)₂₀CAGGTGACCTCAGTG
TAC(GTCGTCGTC)₂₀GTCCACTGGAGTCAC

RNA

AUG (CAGCAGCAG)₂₀CAGGUGACCUCAGUG

PROTEIN

Met-(Gln-Gln-Gln)₂₀Gln-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, β^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 přídatné další faktory genetické i faktory zevního prostředí. Příčinou těchto nemocí bývají především tzv. vzácné alely.

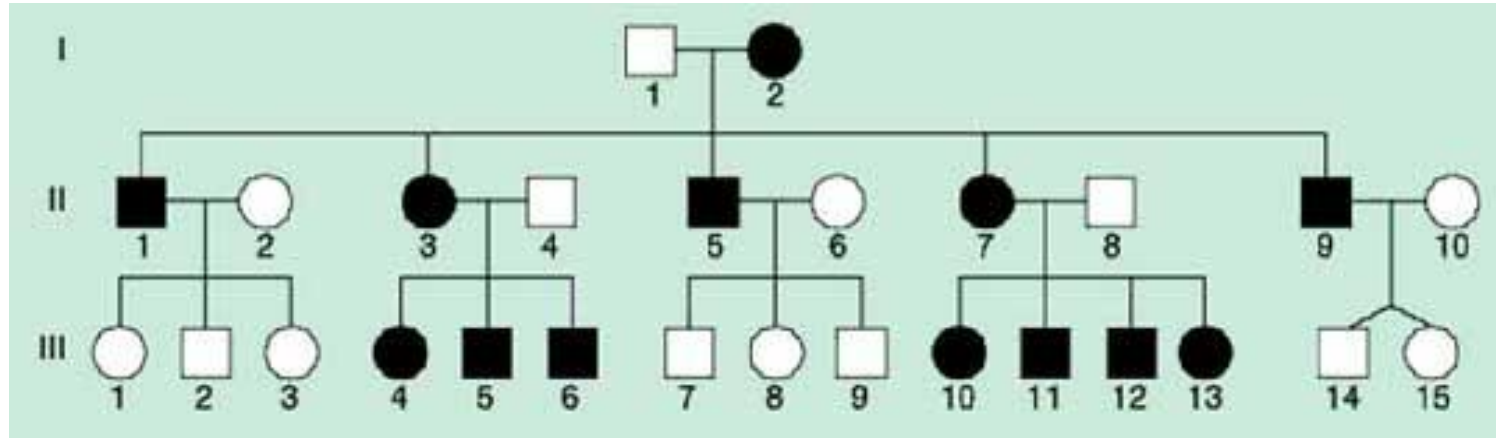
Čtyři základní typy monogenní dědičnosti

	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 dceřinným 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 (X0,x0)
- 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 nebo dokonce v intergenových oblastech, 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.*

DNA markery

- U komplexních nemocí se ukazuje, že je možno asociovat alely mnohých polymorfismů s výskytem komplexní nemoci nebo některými intermediálními 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):

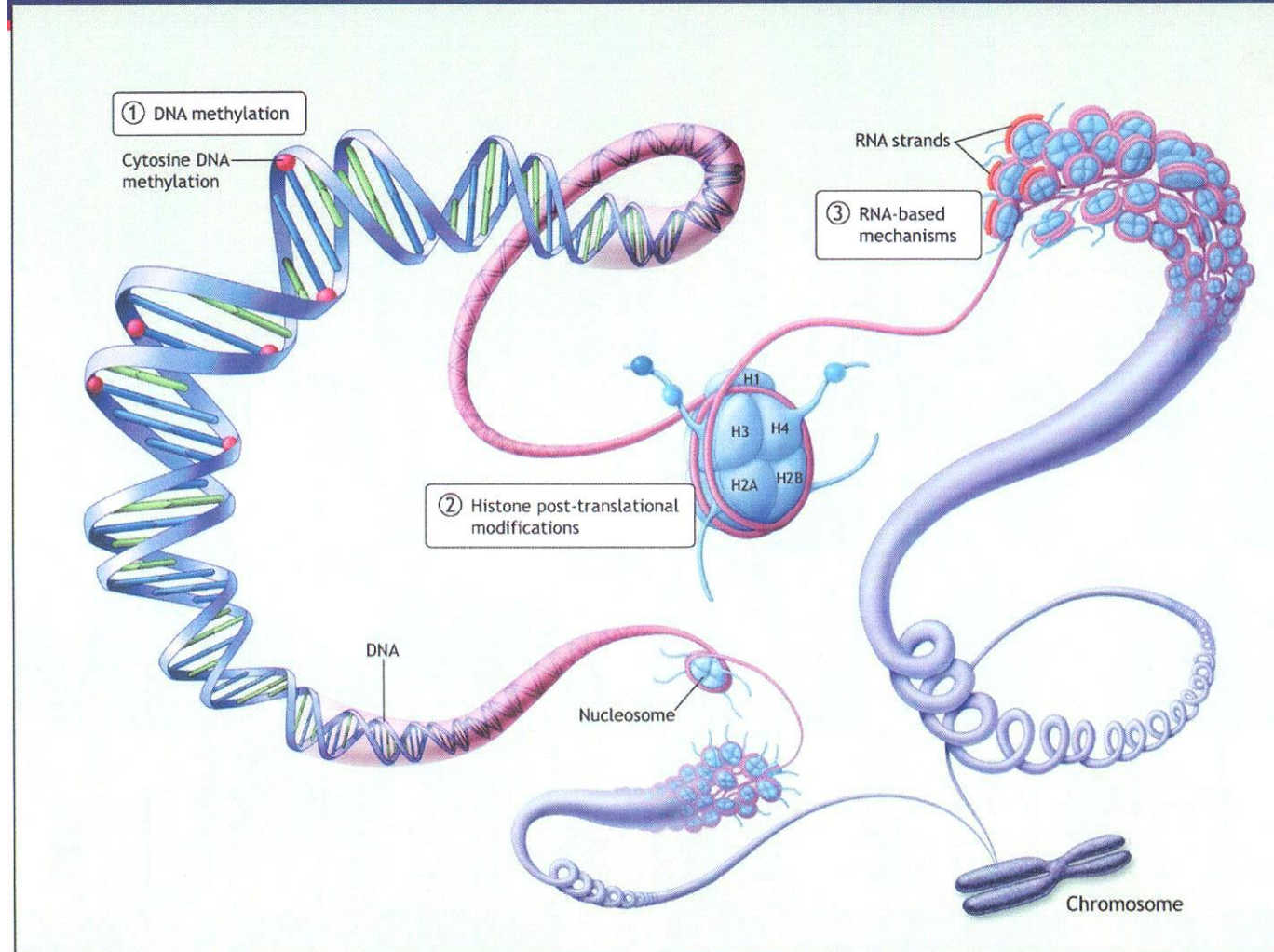
$$\frac{\text{Počet nemocných s riz. genotypem} \times \text{počet zdravých bez riz. genotypu}}{\text{Počet nemocných bez riz. genotypu} \times \text{počet zdravých s riz. genotypem}}$$

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

Epigenetika

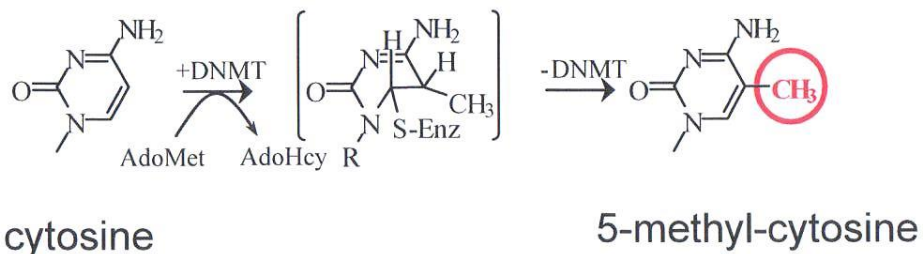
- = stabilní a heritabilní změny v genové expresi, které nezahrnují změny v sekvenci DNA
- Epigenetické procesy řídí genovou expresi během buněčného cyklu, vývoje a v odpovědi na modifikace prostředím nebo biologickými faktory

Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation

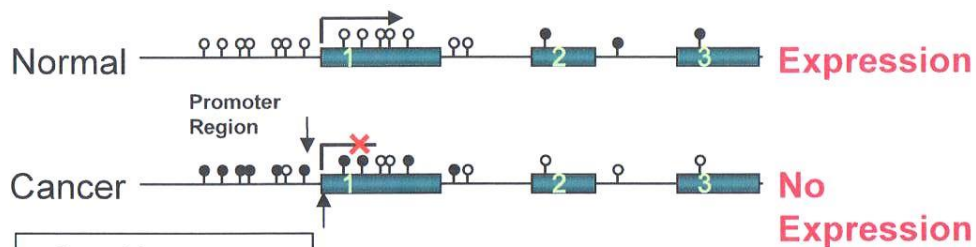


Typy epigenetických procesů

- 1. Metylace DNA** = kovalentní vazba metylových skupin na CpG ostrůvky v DNA:
- Typicky jsou metylovány v netranskribujících se genech
 - Typicky jsou sníženež metylovány v genech, které jsou transkribovány
 - Změna metylačních programů jako výraz dysregulace („rakovinný program“)
 - 5 typů metyltransferáz (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, DNMT3L a DNMT2)



- Stable, covalent DNA modification that targets CpG dinucleotides
- 70%-80% of the CpG dinucleotides are methylated in healthy mammalian cells
- These methylated regions are typical of the bulk chromatin that is relatively inaccessible to transcription factors.
- Associated with gene silencing



Adapted from Herman, J. and Baylin, S. N. Engl. J. Med. 2003

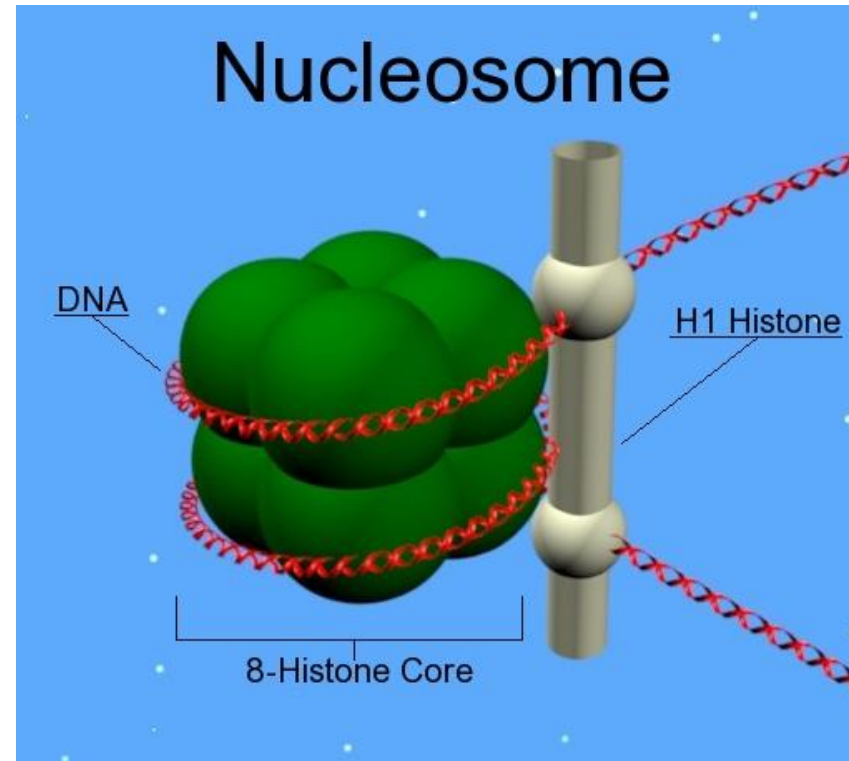
- CpG islands: CpG-rich regions in human gene promoters
- Promoter CpG islands are usually unmethylated in normal tissues.
- Exceptions include genes involved in X-chromosome inactivation, gene imprinting and tissue-specific expression.

Typy epigenetických procesů

2. Postranslační modifikace histonů

Nukleosom je základní jednotka chromatinu skládající se z 146 bp DNA obtočené kolem oktameru proteinů, který se skládá ze dvou podjednotek všech 4 histonů : H2A, H2B, H3 a H4.

2 typy modifikací: acetylace a metylace

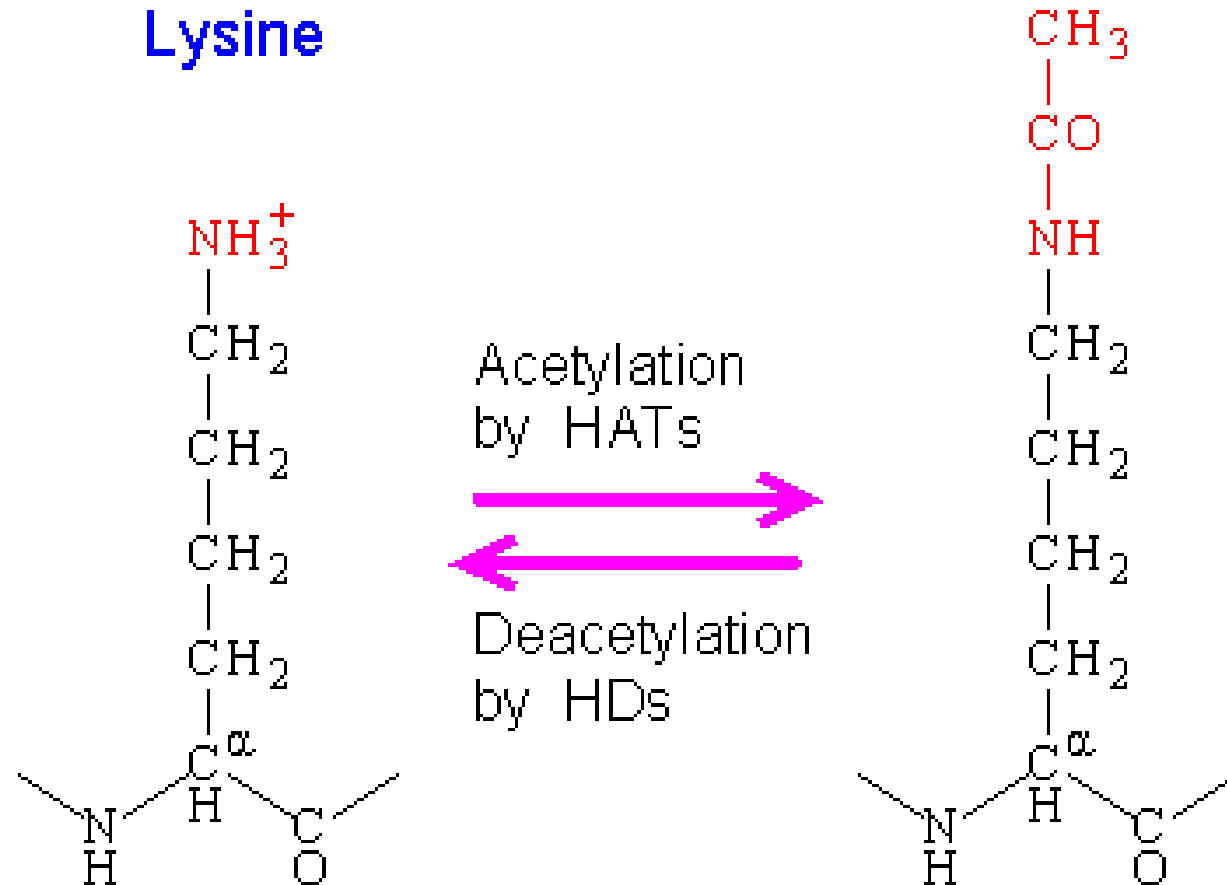


Typy epigenetických procesů

3. Mechanismy založené na RNA

- Zralé mikroRNA (*miRNA*) jsou malé jednořetězcové molekuly RNA, typicky s 22 nukleotidy.
- Poprvé byly identifikovány u organismu *Caenorhabditis elegans* v roce 1993, dosud identifikovány u mnoha druhů živočichů i rostlin.
- V lidském genomu bylo dosud identifikováno více než 700 genů pro miRNA (<http://microrna.sanger.ac.uk/>).
- Asi 30% lidských genů je patrně regulováno miRNA.

Lysine



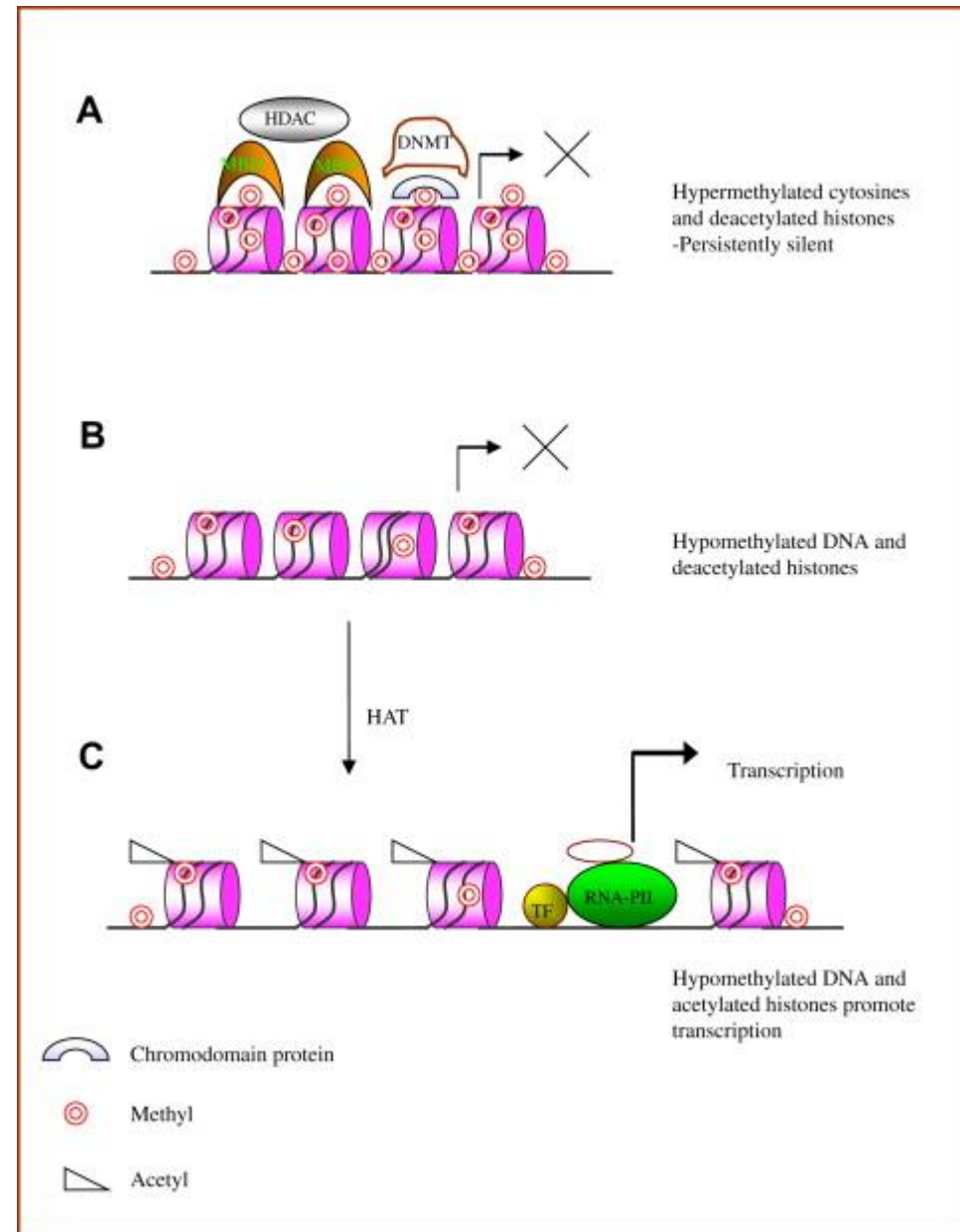
Acetylace histonů je katalyzována **histon acetyltransferázami (HATs)** a deacetylace histonů **histon deacetylázami (HDs nebo HDACs)**.

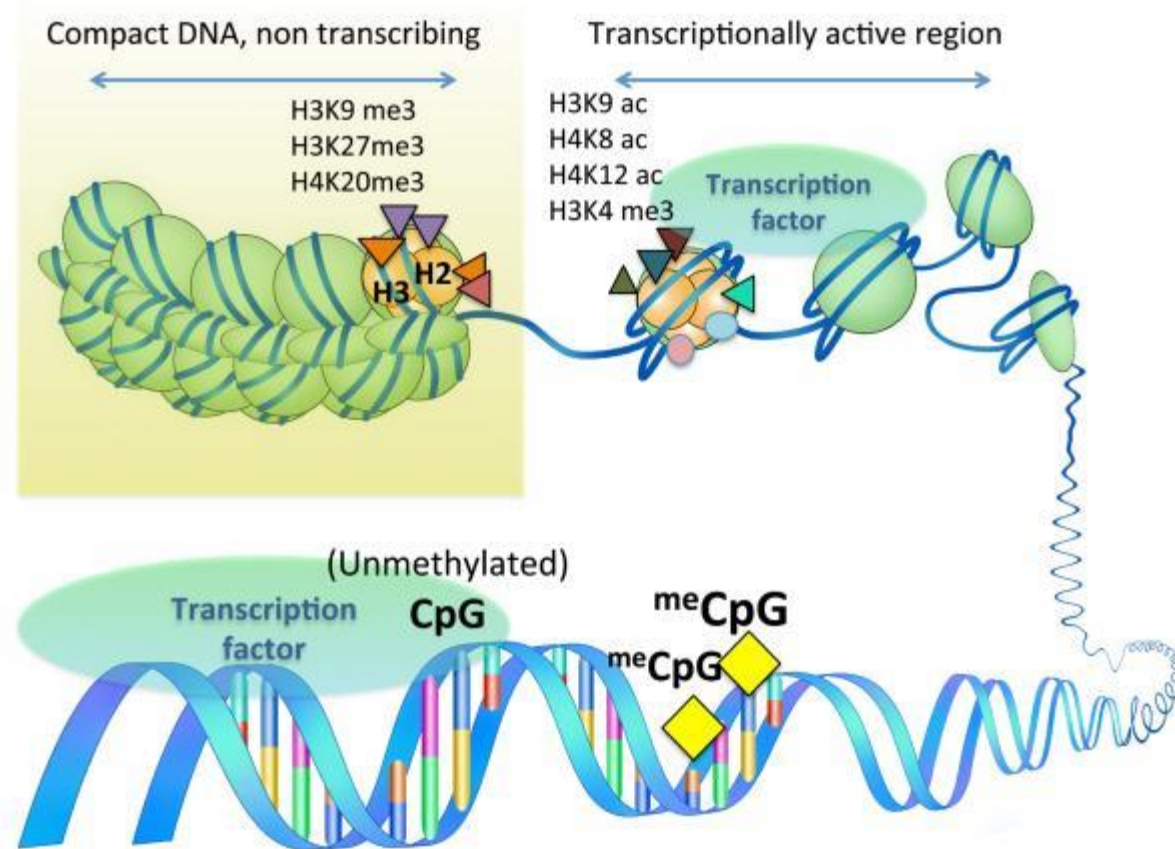
Role DNA metylace a histonové modifikace v regulaci genů.

A. Methylace cytosinu v CpG párech povolává proteiny obsahující methyl-CpG-binding domain (MBD), jako jsou MeCP2. Pokud se MBD naváže, vytváří komplex s histon deacetylázami (HDAC) nebo přímo blokuje vazbu transkripčních faktorů

B. MBD se nemohou vázat na hypometylovanou DNA.

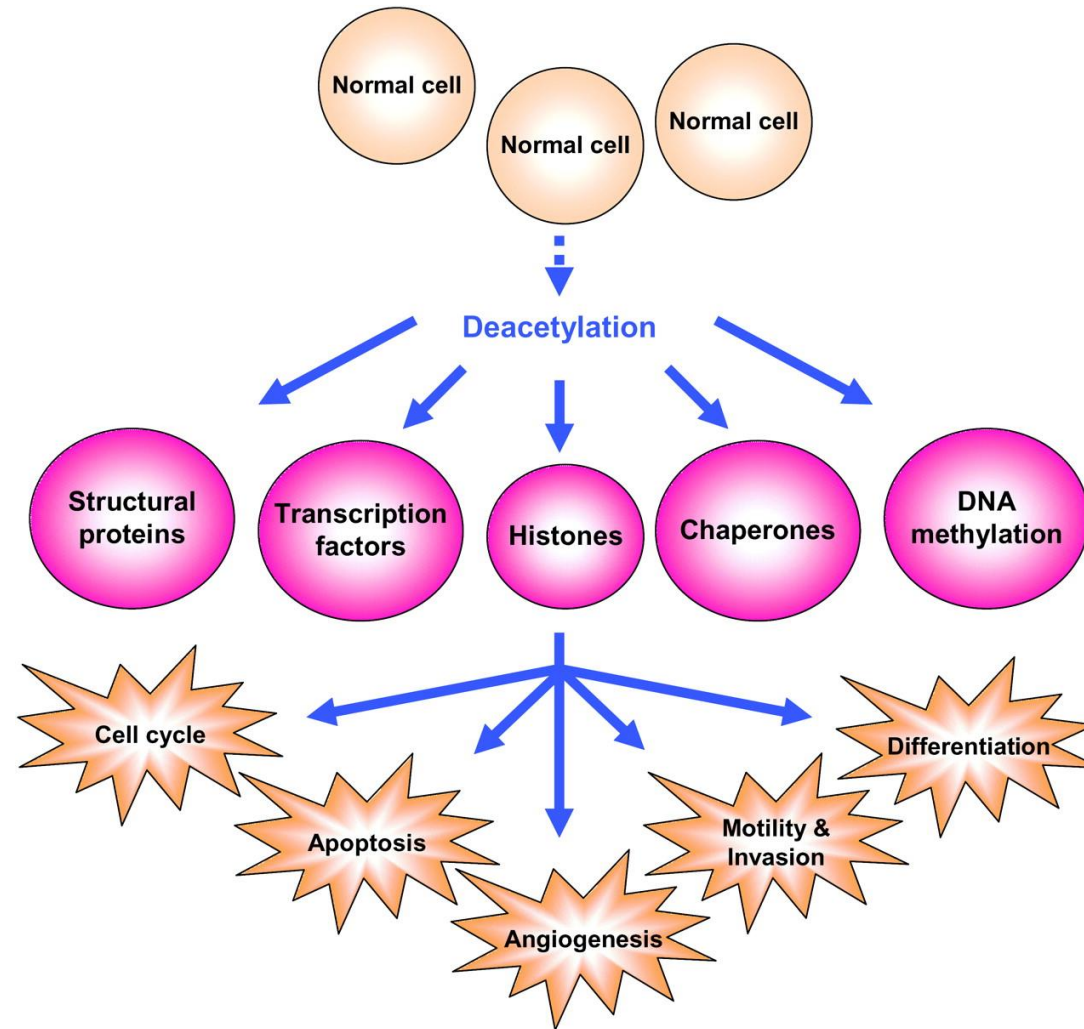
C. Acetylace pozitivně nabitých lysinových amino skupin v histonech histonovými acetyltransferázami (HAT) neutralizuje náboj a uvolňuje vazbu negativně nabitých fosfátů v DNA. Takto "relaxovaná" DNA podporuje vazbu a aktivní transkripci.





Epigenetické modifikace nukleosomálních histonů a DNA, které regulují expresi genů. Histonové modifikace kompaktně svinutého heterochromatinu nebo relaxovaného transkripčně aktivního chromatinu. H, histone; K, lysine; me, methylation; me3, trimethylation; ac, acetylation; DNA methylation silencing the gene; ^{me}CpG, methylated Cytosine in Cytosine-Guanine dinucleotide sequences within the DNA.

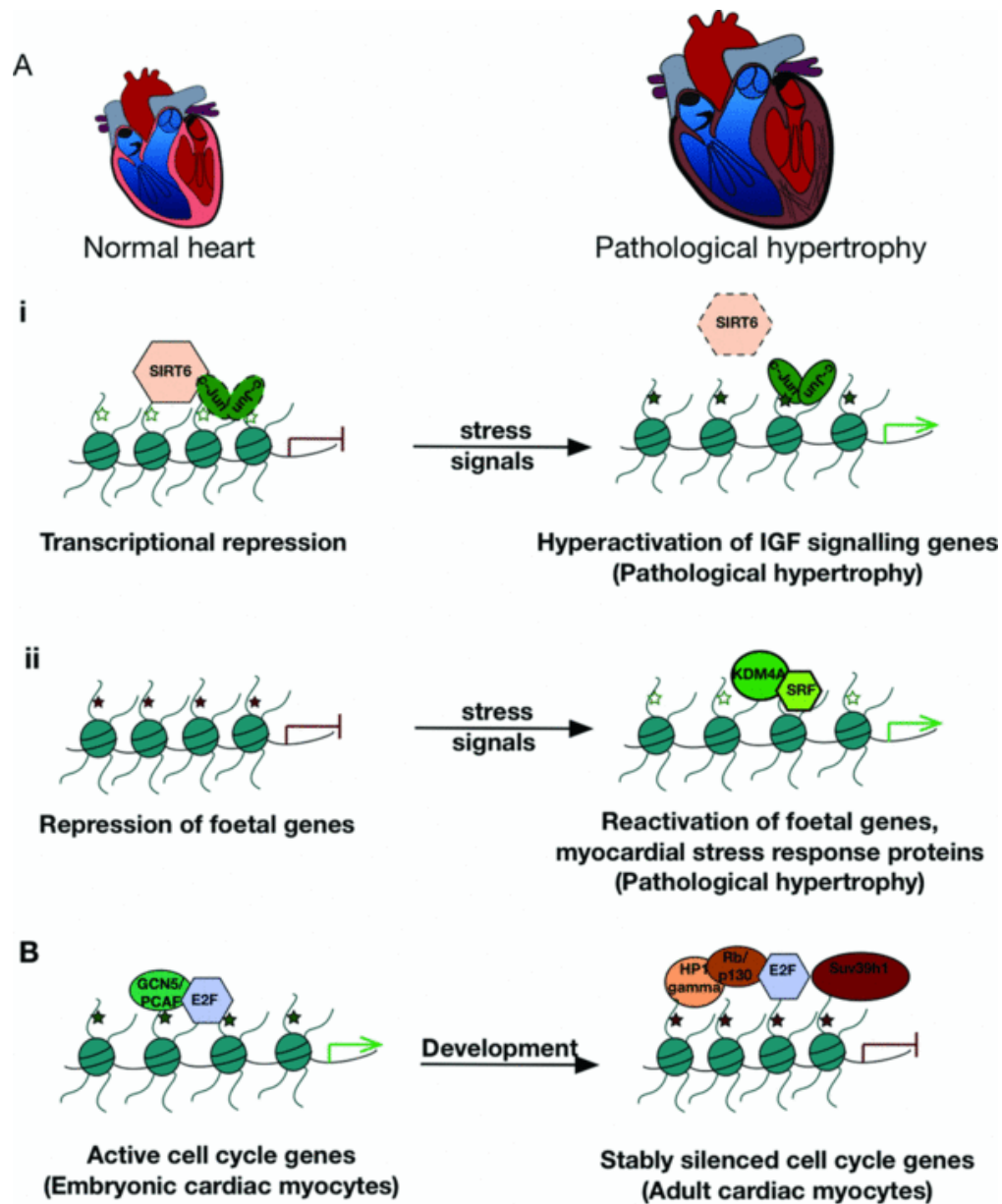
The pathways affected by HDAC activity.



Stimson L et al. Ann Oncol 2009;20:1293-1302

„Dostupnost“ chromatinu

- DNA je normálně svinuta do B-DNA= jeden pravotočivý závit na 10,5 bp. Toto svinutí ovlivňují topoizomerázy, vazba proteinů, transkripce, replikace, změny v iontovém složení.
- Zvýšené zavinutí („positive supercoiling stress“)
- Snížené zavinutí („negative supercoiling stress“)
- **Euchromatin – relaxovaný, transkripčně aktivovatelný**
- **Heterochromatin –kondenzovaný, relativně nedostupný**



Acetylační a metylační modifikace H3K9 regulují expresi srdečních genů.

Signály srdečního stresu indukují patologickou hypertrofii prostřednictvím ztráty transkripční represe modulované SIRT6 (=histon acetyláza), kterou zajišťují geny pod vlivem IGF (insulin-like growth factor) (A, i) nebo prostřednictvím reaktivace fetálních genů a myokardiálních genů odpovídajících na stres (modulováno KDM4A =histon demetyláza (A, ii).

Trimetylace H3K9me3 pomocí Suv39h1 (=metyl transferáza) a následná represe genů buněčného cyklu udržuje postmitotický fenotyp zralých srdečních kardiomyocytů (B).

Biochemical Society Transactions (2013) 41, (789–796) (Printed in Great Britain)

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.
- Kandidátní gen může být asociován:
 - s intermediálním fenotypem
 - s klinickou manifestací nemoci
 - s klinickou závažností nemoci
 - s odpovídavostí nemoci na léčbu (farmakogenetika)

Genetické studie

- Dalším významným momentem je výběr statistické metodologie, která zhodnotí sílu asociace genů s chorobami. Možnosti jsou v zásadě dvě: linkage (vazebná) analýza a asociační studie. K detekci specifických genetických oblastí a genů, které se účastní v transmisi nemoci, je v principu možné použít obě metody.
- Linkage (vazebná) analýza testuje kosegregaci genového markeru a fenotypu nemoci v rodině. Čili marker a nemoc se v dané rodině mají vždy vyskytovat spolu.

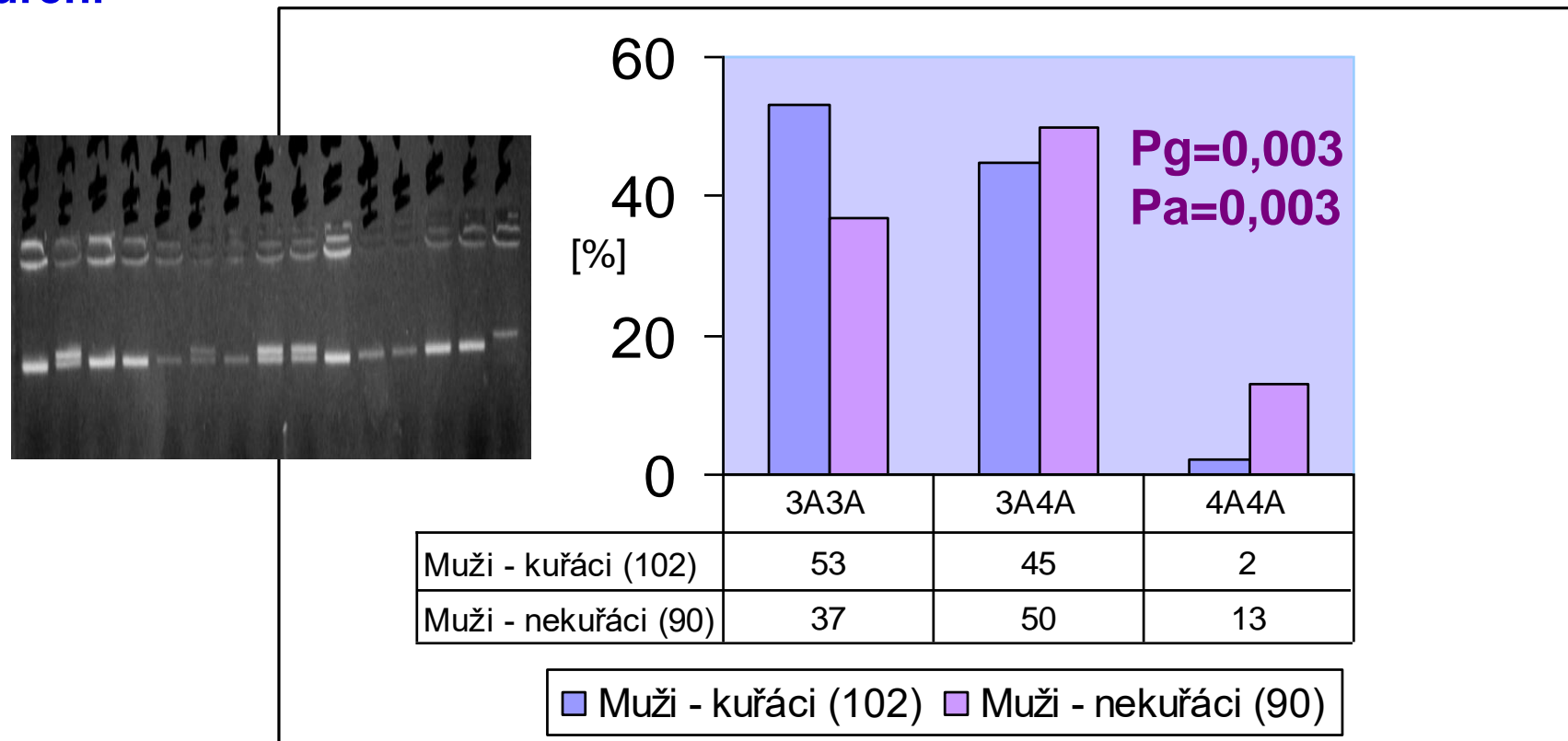
Genetické studie

Asociační studie vyšetřují související 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).

Zdraví čeští dobrovolníci středního věku (41-50 let)

Polymorfismus -3A/-4A v genu pro endotelin-1 (EDN1)

Kouření

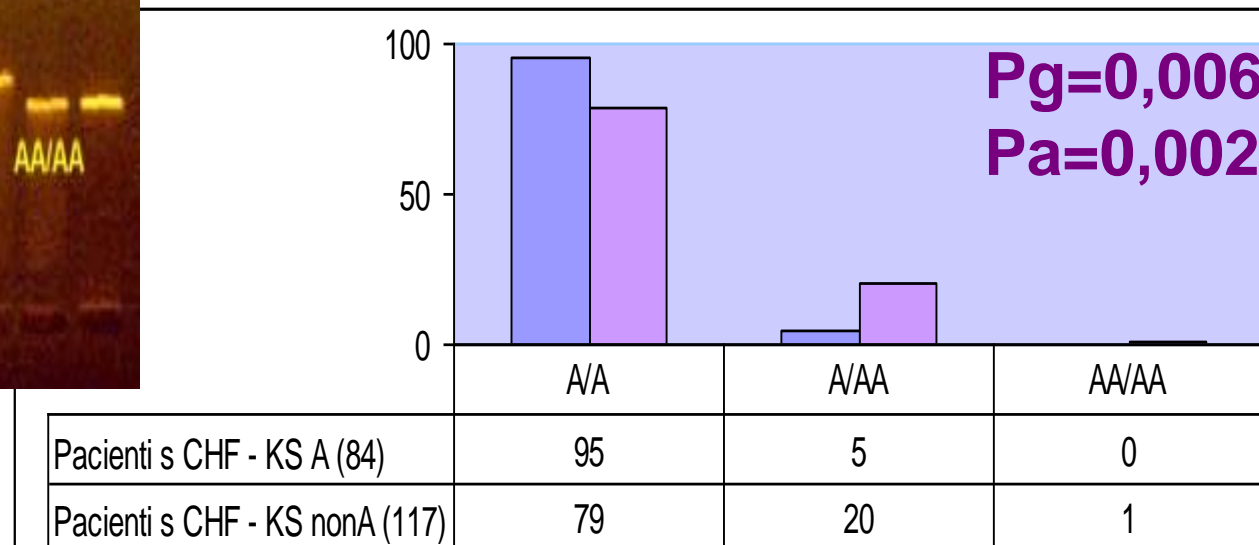
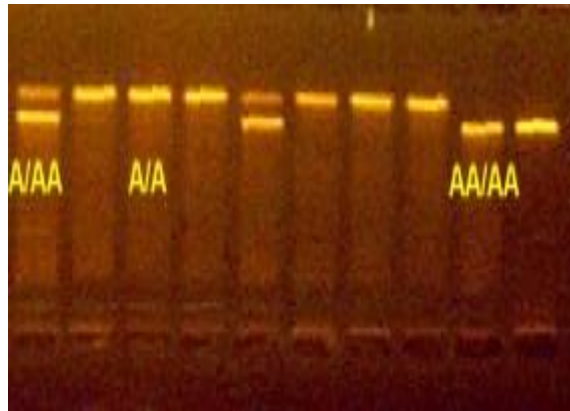


Genotypy 3A3A a 3A4A jsou častější u zdravých mužů kuřáků oproti mužům nekuřákům ($OR = 7,69$, $95\% KI 1,67-35,38$, $P=0,002$).

Chronické srdeční selhání

Polymorfismus RXR α 39526 A/AA

Krevní skupiny ABO

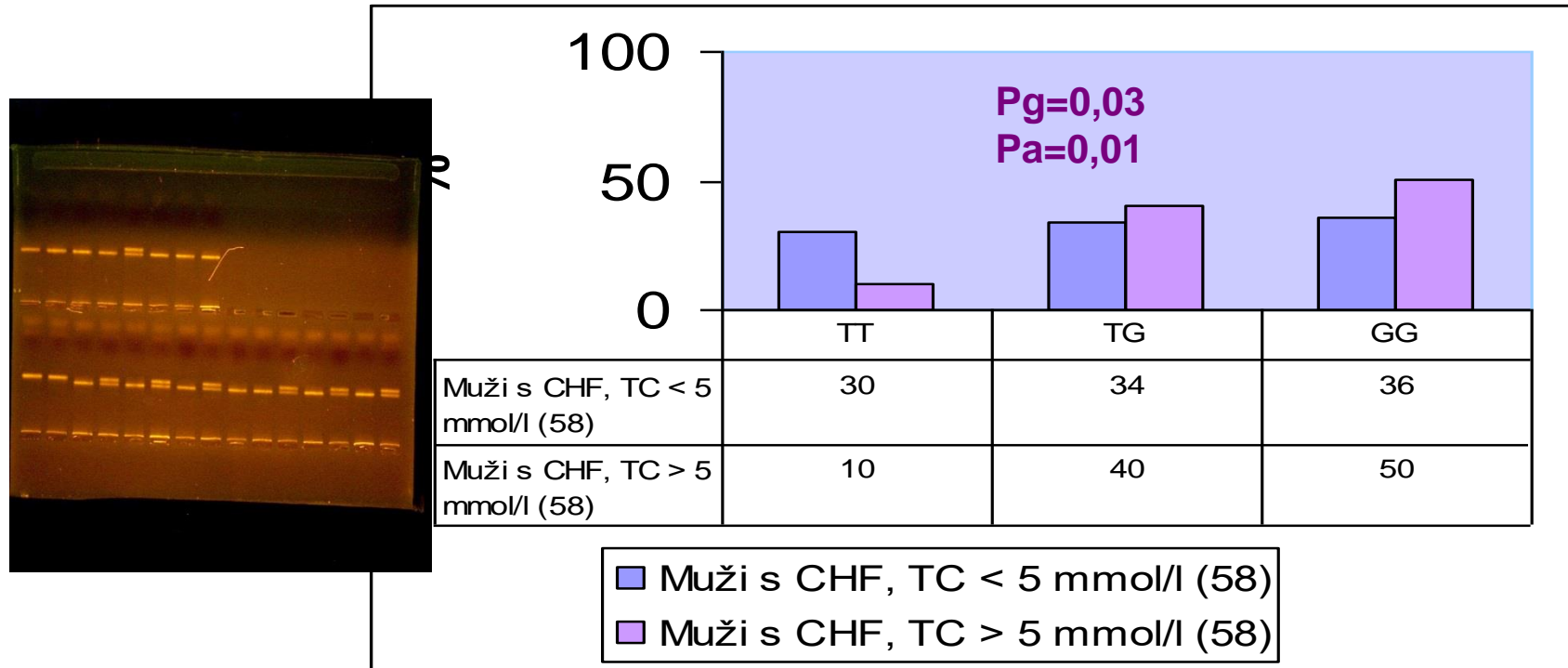


Alela AA přináší **5x vyšší OR** pro pacienty s CHF a krevní skupinou nonA (B+AB+O): **OR=5,16; 95%KI 1,72-15,50; P=0,0009**

Chronické srdeční selhání

Polymorfismus -790T/G v genu pro MMP-2

Celkový cholesterol



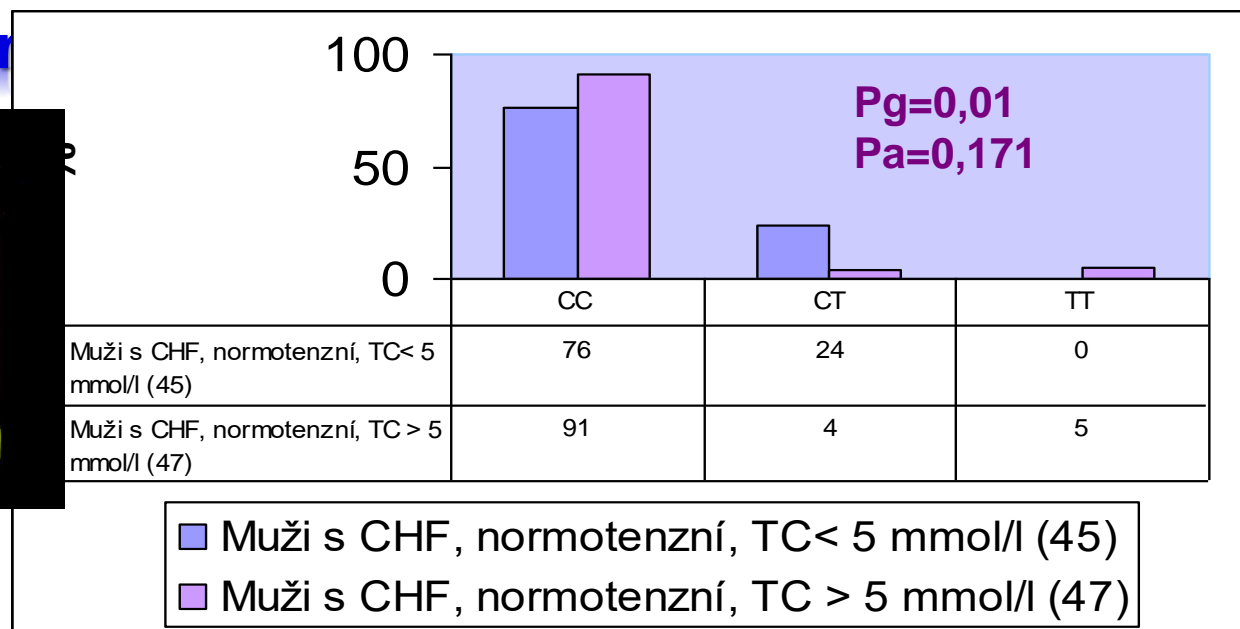
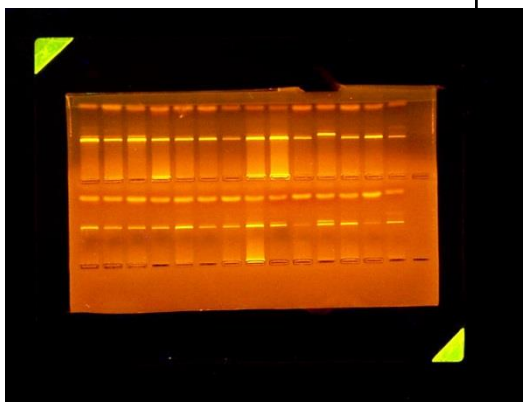
Genotypy TG + GG přinášejí **3,59x vyšší OR** pro muže s CHF a vyšší hladinou celkového cholesterolu: **OR=3,59; 95% KI 1,30-9,93; P=0,009**

Chronické srdeční selhání

Polymorfismus -735C/T v genu pro MMP-2

Hypertenze

Celkový cholesterol

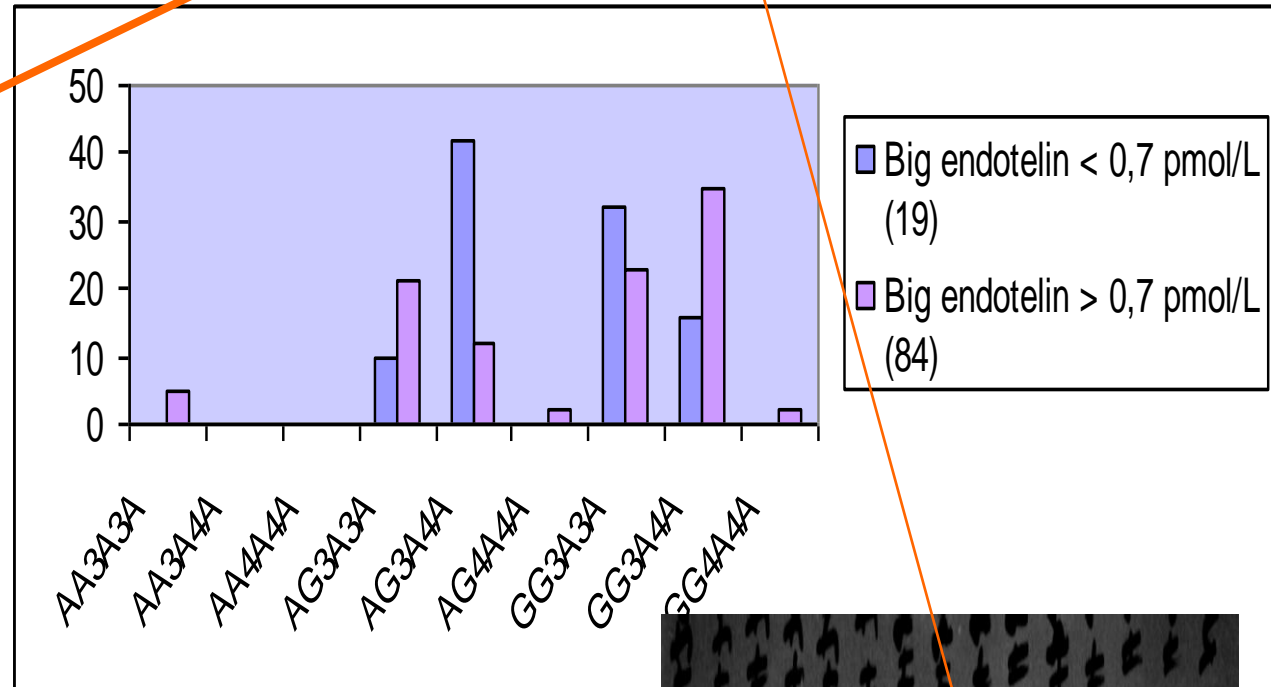
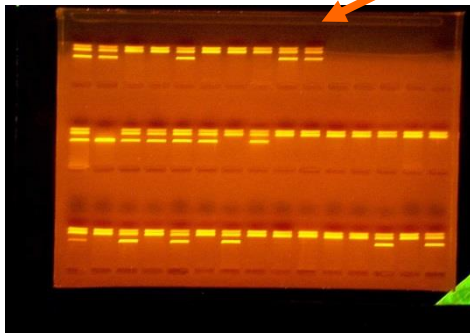


Genotyp CT přináší **7,28 x vyšší OR** pro muže s CHF, normotenzí a vyšší hladinou celkového cholesterolu: **OR=7,28; 95% KI 1,51-35,03; P=0,006**

Chronické srdeční selhání

Asociovaný genotyp 8002 G/A a -3A/-4A EDN-1

Big endothelin

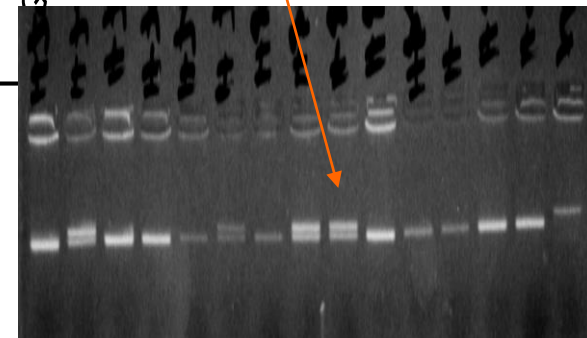


Asociovaný genotyp AG3A4A nese 5x vyšší OR pro chronické srdeční selhání ve skupině s nízkou hladinou big endothelinu oproti skupině pacientů s vysokou hladinou:

OR = 5,38;

95% KI = 1,75-16,58;

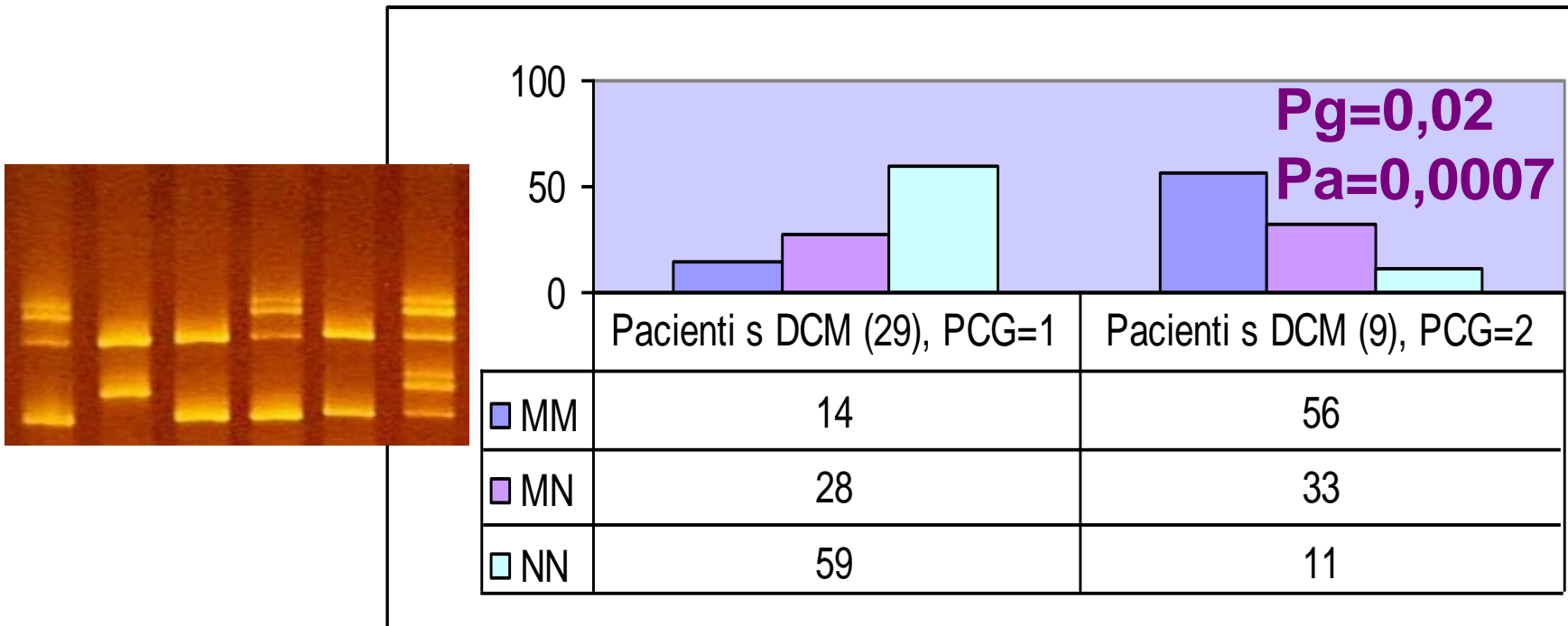
P= 0,005



Chronické srdeční selhání

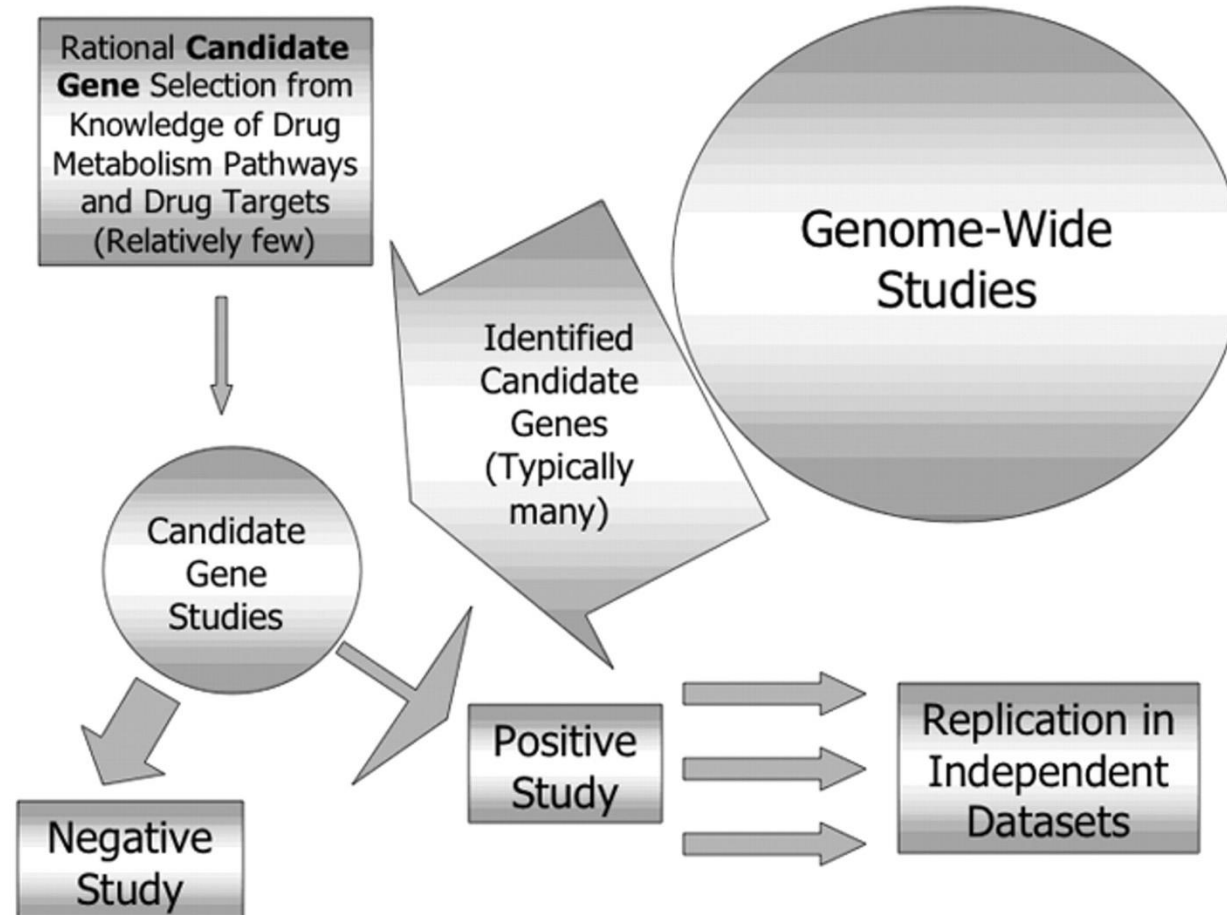
Dilatační kardiomyopatie (DCM), plicní městnání (PCG)

3'TACE



Genotyp MM nese **8x vyšší OR** pro DCM s PCG=2 oproti DCM s PCG=1: **OR=7,81, 95% KI = 1,45-42,17, P=0,02**

Figure 2. Relationship between genome-wide and candidate gene pharmacogenetic studies



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

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

Personalizovaná medicína?!

- Také v souvislosti s komplexními nemocemi hledáme vhodné genetické/epigenetické biomarkery, ať už **diagnostické, prognostické nebo prediktivní**.
- Prediktivní biomarkery jsou velmi významné v oblasti **farmakogenetiky (farmakogenomiky)**, protože nám mohou pomoci identifikovat pacienty, u nichž bude lék účinný a zároveň nebude mít významnější vedlejší účinky (farmakodynamika).
- Protože v případě komplexních nemocí se jedná u klinicky manifestních jedinců o souhru genetických a epigenetických faktorů, nedá se objektivně předpokládat existence jen jednoho dostatečně „silného“ biomarkeru dostatečně vystihujícího farmakogenetické aspekty léčby onemocnění. Musíme tedy na základě statistických lineárních a nelineárních modelů hledat mnohočetné kombinované biomarkery, které budou dostatečně klinicky specifické i senzitivní. Dále bude potřeba srovnat různé úrovně regulací (DNA, transkriptom, proteom, metabolom al.) pomocí integrální multi“omické“ biologické strategie („integromika“)

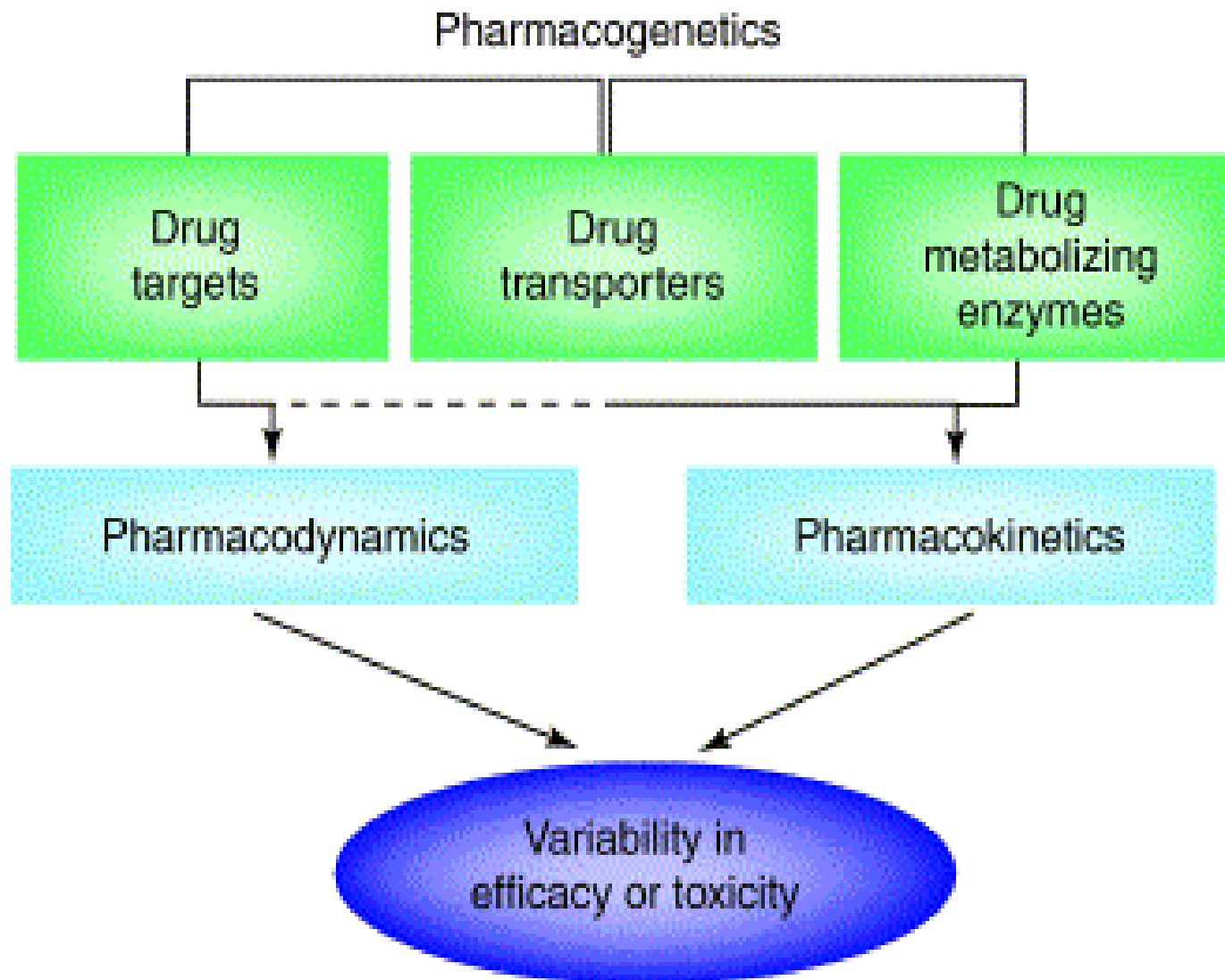
Personalizovaná medicína?!

- Mantrou **personalizované medicíny**, tedy „léčby na míru“ v léčbě komplexních nemocí je „**správná dávka správného léku ve správné indikaci správnému pacientovi ve správný čas**“. Logika tohoto přístupu je jasná: pokud rozumíme etiopatogenezi onemocnění, můžeme ho úspěšně léčit. V současné době už se blížíme k porozumění molekulární patofyziologii mnohých komplexních nemocí, což nám umožní identifikovat cesty řídící klinickou manifestací onemocnění a klíčové cílové proteiny. Co se týče vyšetření vrozeného genetického základu (germinativní alely, přítomné ve všech buňkách organismu), je možné je vyšetřovat i „preventivně“, před vlastní klinickou manifestací komplexní nemoci, zejména v rodině s pozitivní anamnézou této nemoci. Tuto možnost výrazně podporuje technologický rozvoj molekulárně biologické diagnostiky („next generation sequencing“), která dnes umožňuje determinovat celou sekvenci DNA jedince během 24 hod.

Personalizovaná medicína?!

- V medicíně byly prokázány tisíce monogenních nemocí, u nichž je genetický marker součástí diagnostiky a v mnohých případech implikuje i nejvhodnější léčbu.
- U komplexních nemocí se při jejich klinické manifestaci významně uplatňují nejen faktory **genetické (vrozené) predispozice**, ale také mocný vliv faktorů prostředí. Ty se „překládají“ do změn exprese genů, tedy **do účinků epigenetických**, které jsou celoživotně zdrojem subakutní až chronické adaptace na rychle se měnící charakteristiky prostředí, ve kterém žijeme.
- Statický model DNA matrice je tedy stále dynamicky opracováván tak, že **buňky mění své transkripční profily** na základě relativně jednoduchých změn DNA (metylace a acetylace DNA, metylace histonů, mikro RNA a další mechanismy epigenetických změn).

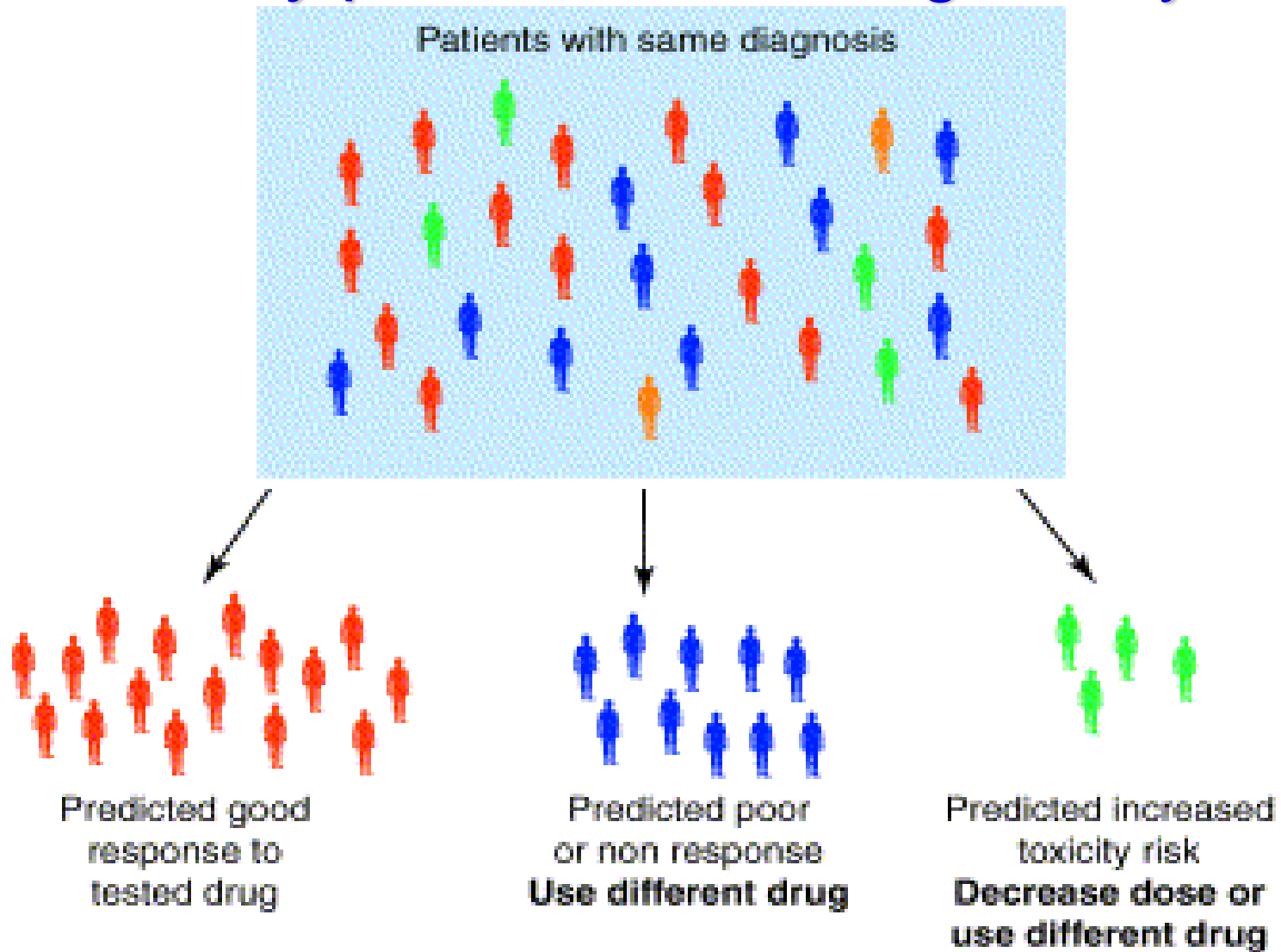
Klíčové složky farmakogenetiky



Farmakogenetika - cíle

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



Farmakodynamika x farmakogenomika

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

Farmakokinetika

- **Absorpce** (GIT, motilita?, pH žaludeční sekrece?, intestinální flóra?, místo absorpce)
- **Distribuce** (frakce léčiva vázaná na bílkoviny séra, afinita jednotlivých léčiv k BS – fenylobutazon-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)

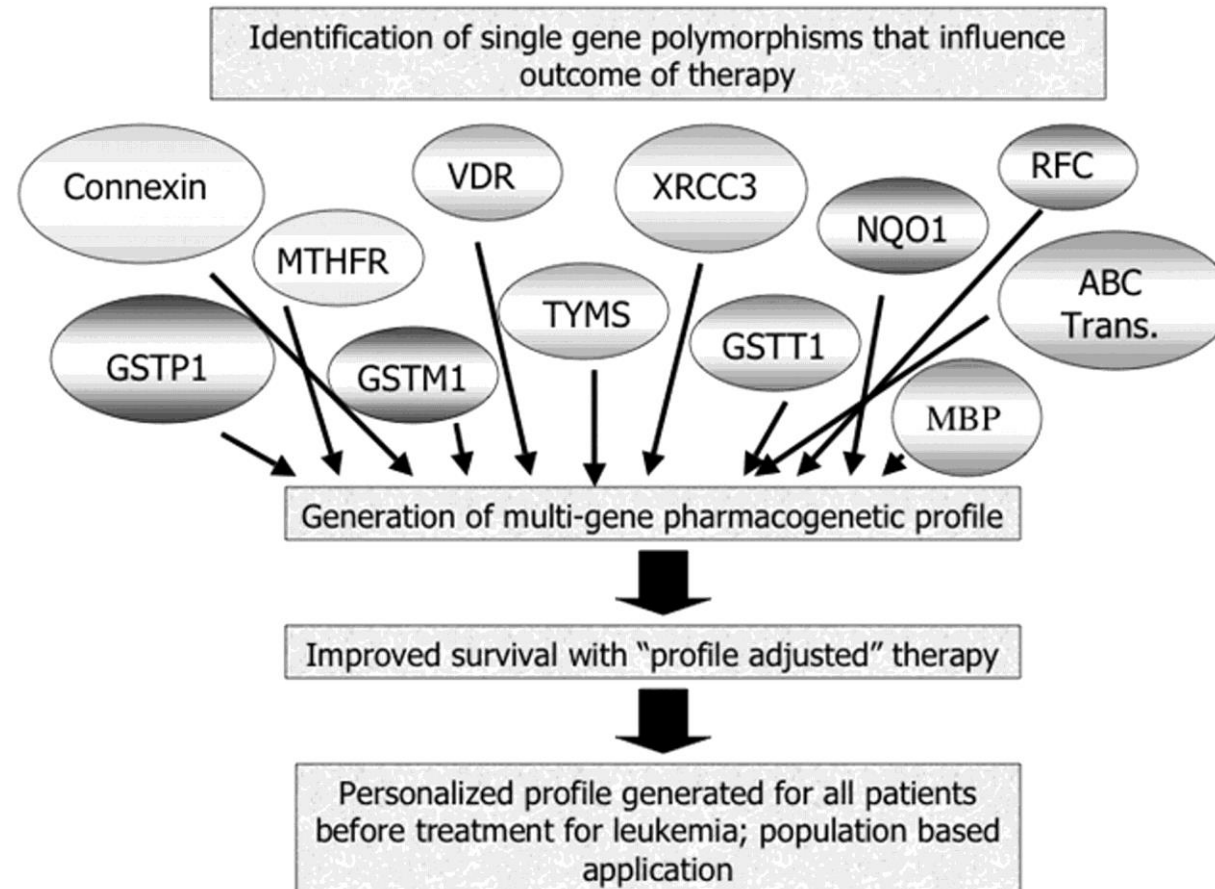
Farmakogenetika a vývoj léků

- 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.

P450

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

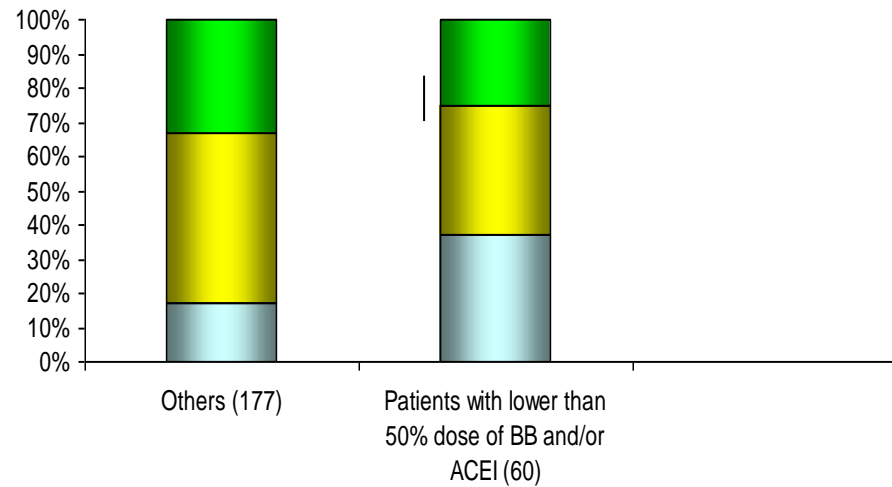
Figure 1. The hoped-for pathway of development of personalized medicine for the treatment of leukemia



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

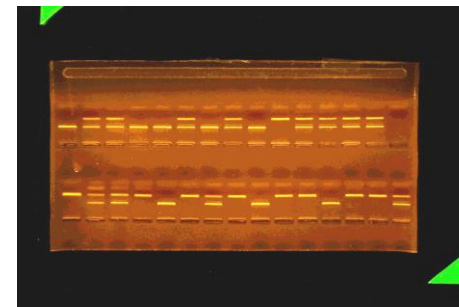
Chronické srdeční selhání

Farmakogenetické rozdíly v dávkování beta blokátorů a ACEI- I/D ACE

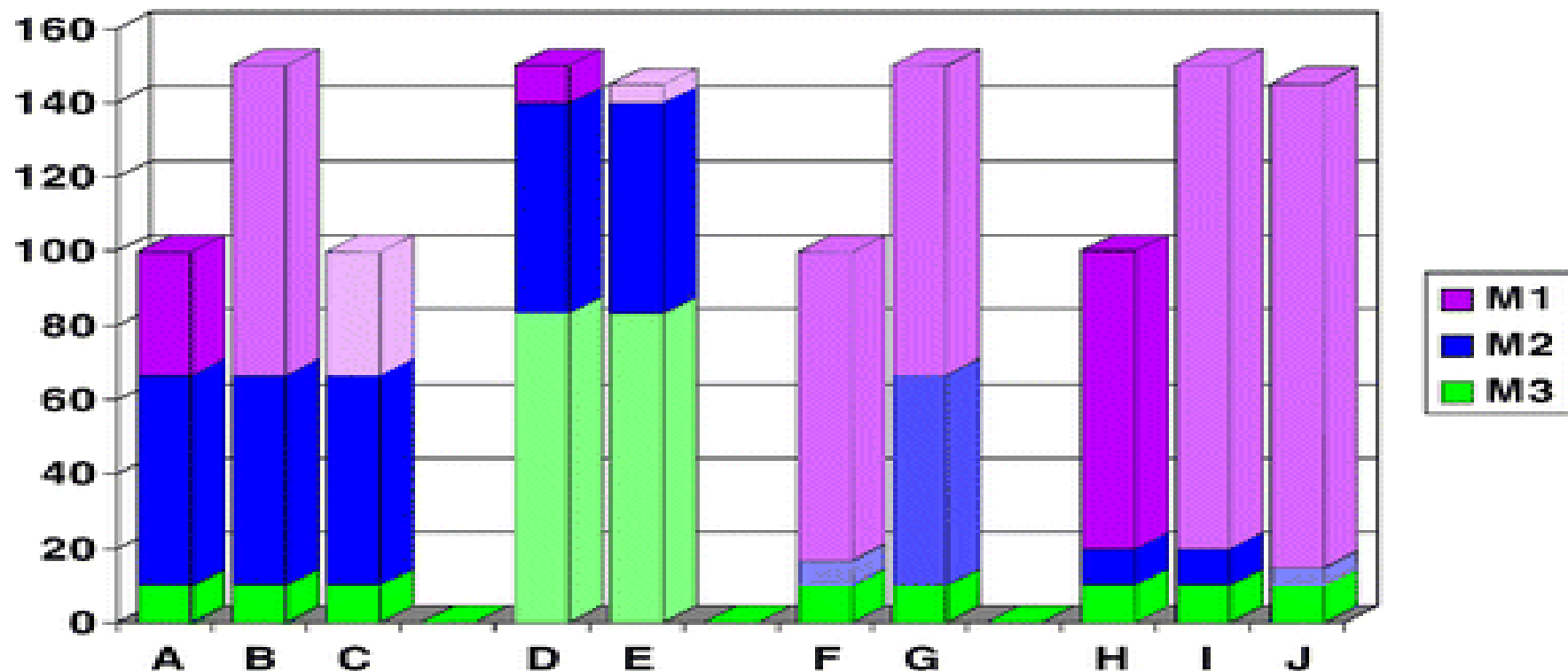


OR pro genotyp II u pacientů s nižší než 50% dávkou proti doporučené je (BB+ACEI) je **2,84, P=0,002**

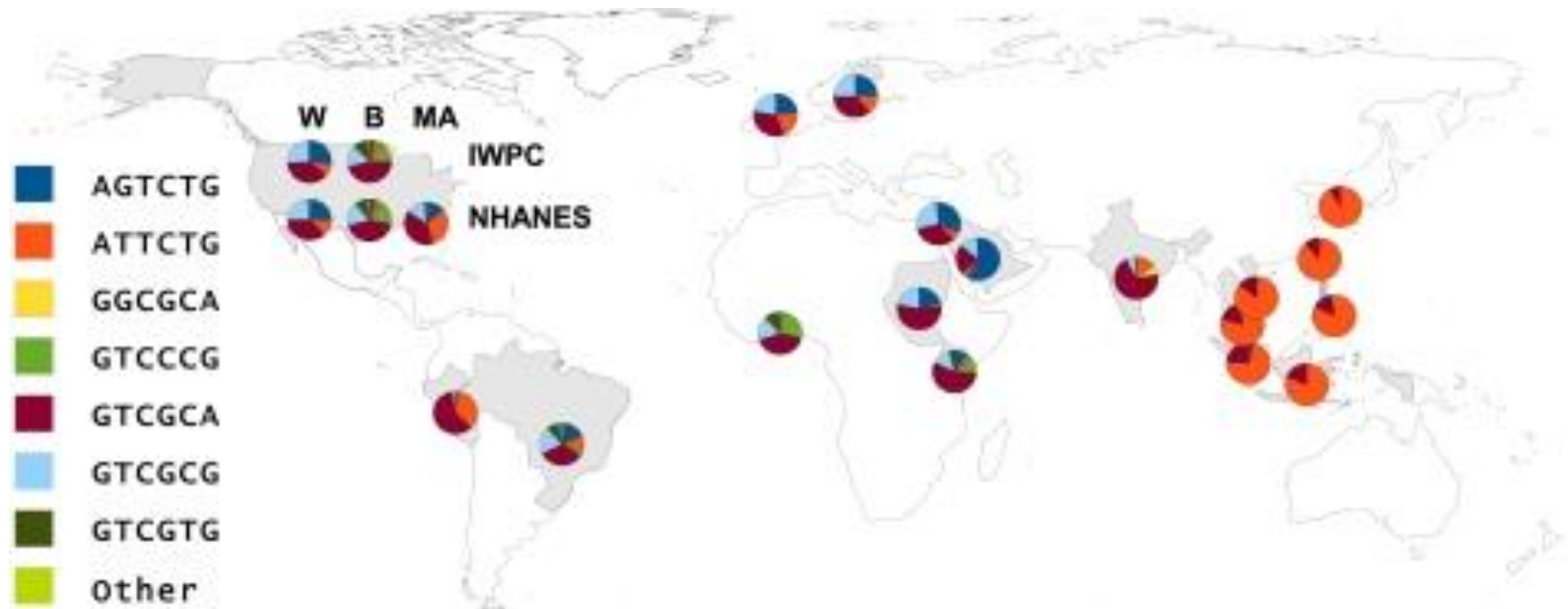
P_g=0,006, P_a=0,009



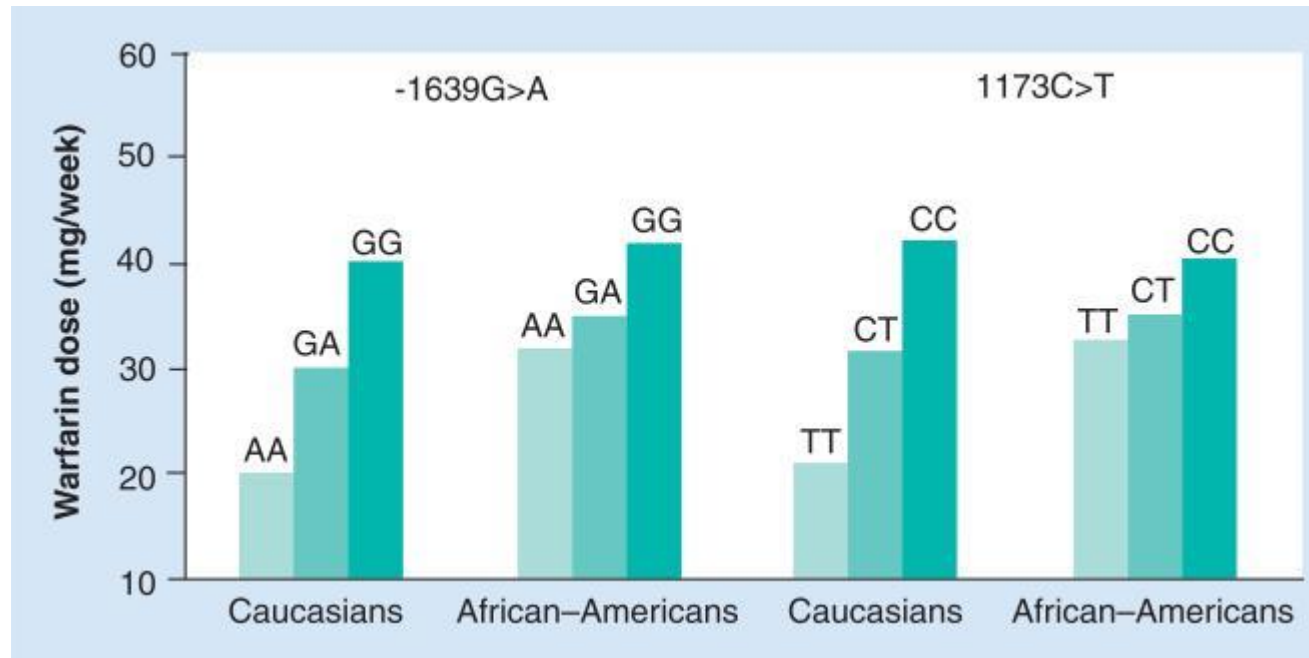
Model terapie hypertenze (podle Lindpaintnera, březen 2003)



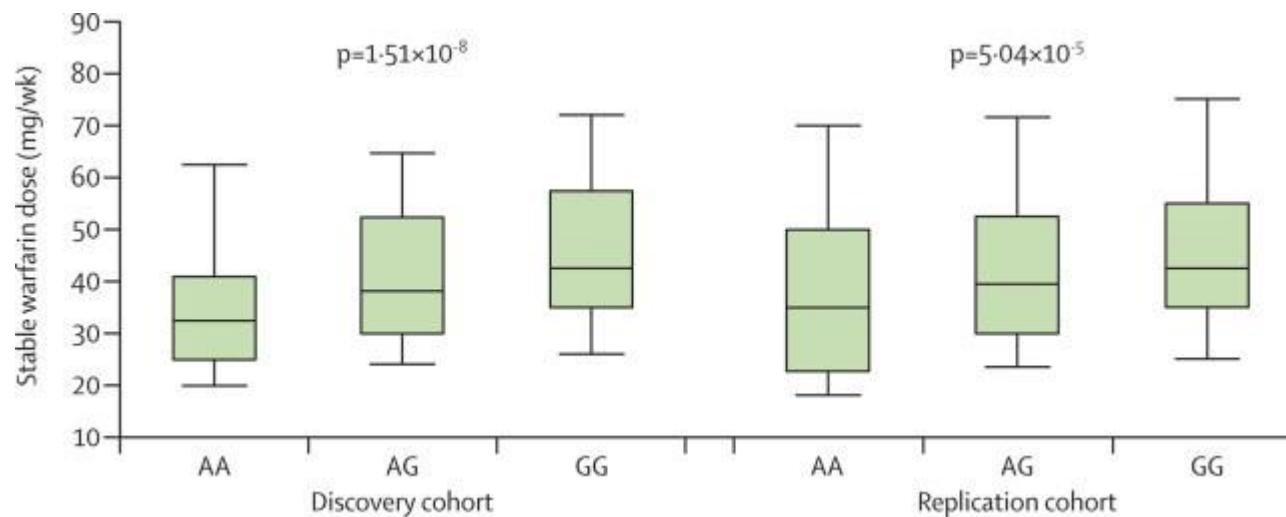
A=fyziologický stav: tři molekulární mechanismy (M1, M2, M3) se podílejí na determinaci znaku (TK), B=hypertenze D1: selhání M1 (příčina/účast)
 C=hypertenze D1: kauzální terapie T1 (cílená na M1), D= hypertenze D3: selhání M3 (příčina účast), E=hypertenze D3, léčení T1: terapie není kauzální, F=hypertenze 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



Worldwide haplotype distribution. The frequencies of 7 globally distributed haplotypes for 6 SNPs in the *VKORC1* gene are represented by pie charts over the country of origin of population samples from which they were derived. The SNPs are listed in the order in which they occur along the *VKORC1* gene: -1639G>A, 497T>G, 1173C>T, 1542G>C, 2255C>T, 3730G>A. All haplotypes occurring at frequencies of less than 2.5% in all population samples tested are grouped together in the “Other” category. For the United States, the population samples are broken down into white (W), black (B), and Mexican American (MA) subgroups and by the study under which they were collected: International Warfarin Pharmacogenetics Consortium or National Health and Nutrition Examination Survey III. [Blood. 2010 May 6; 115\(18\): 3827–3834.](#)



Polymorfismy v genech CYP2C9, VKORC1 a CYP4F2 byly asociovány se schopností udržovat adekvátní hladinu antikoagulace

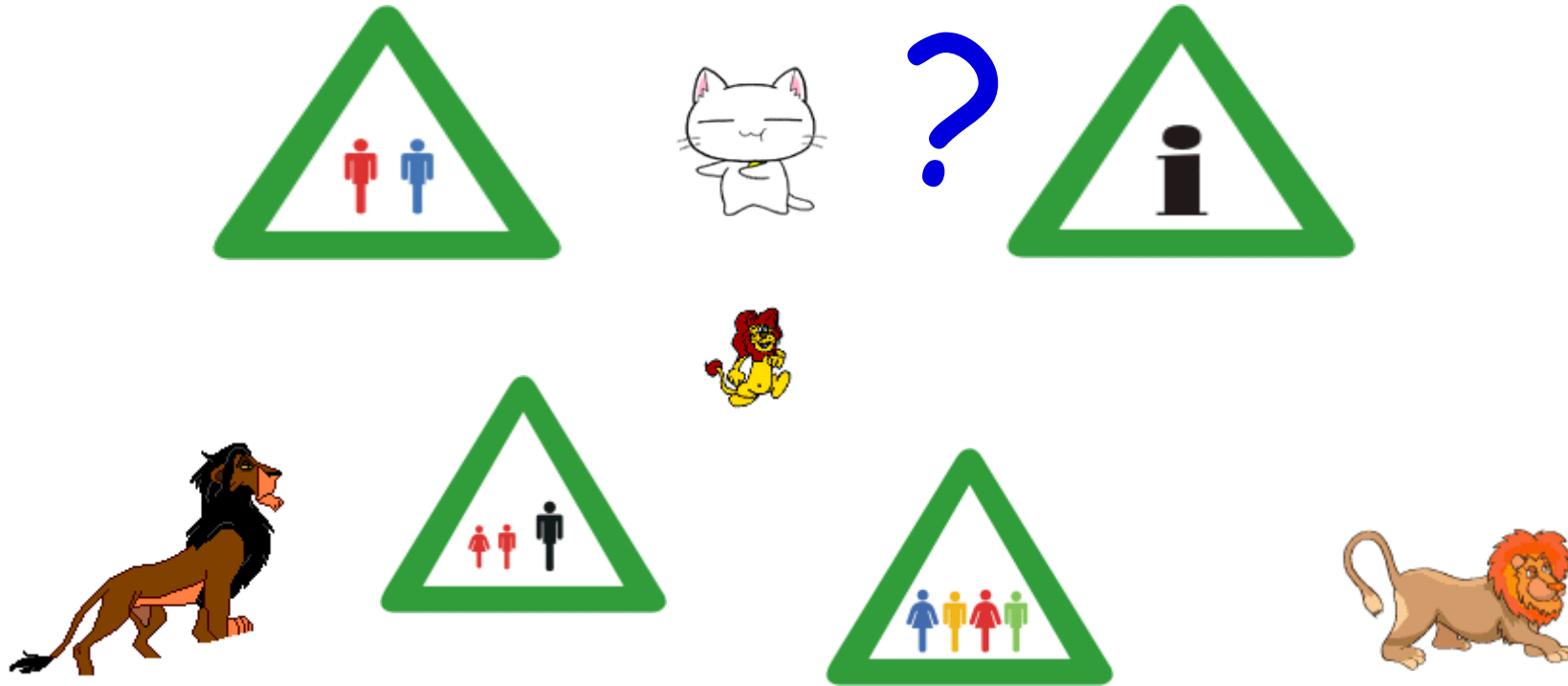


Overview of genetic associations with warfarin dose requirements

The primary genes contributing to warfarin dose requirements are vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKORC1) and cytochrome P450 2C9 (CYP2C9). The CYP2C9 enzyme metabolizes the more potent *S*-enantiomer of warfarin, while VKORC1 is the target protein for warfarin. Specifically, warfarin inhibits VKORC1, thus preventing reduction of vitamin K to vitamin KH₂, a necessary co-factor for carboxylation and activation of clotting factors. The gene for CYP4F2, which metabolizes vitamin K, provides a minor contribution to dose requirements, particularly in European and Asian populations.

A single polymorphism in the *VKORC1* regulatory region, c.-1639G>A (rs9923231), predicts dose requirements across ethnic groups. The minor A allele at this position is associated with approximately twofold lower gene expression and significantly lower warfarin dose requirements compared to the G allele. The frequency of the A allele varies by ethnicity with the highest frequency in Asians, intermediate frequency in Europeans, and the lowest frequency in African Americans. Differences in allele frequency account for the lower dose requirements generally observed in Asian populations and higher requirements in Africans compared to Europeans.

Děkuji vám za pozornost



MUNI
MED