




# MONOGENNÍ VS. KOMPLEXNÍ NEMOCI

**MOLEKULÁRNÍ PODSTATA  
PATOFYZIOLOGICKÝCH PROCESŮ**

**MGR. PETRA BOŘILOVÁ LINHARTOVÁ**



# Obsah přednášky

- **Struktura lidského genomu a cytogenetika**
- Exonové, intronové a promotorové mutace
- Monogenní a polygenní choroby a vztah multigenních nemocí a prostředí
- Genetické studie a klinická genetika
- Genové terapie a farmakogenetika/genomika

# Genetika

- brněnský kněz a středoškolský profesor **Johann Gregor Mendel** se zabýval křížením různobarevných odrůd hrachu
- Genotypové zákony:
  - **Zákon o samostatnosti alel**  
Genotyp je soubor samostatných genů určujících znaky. Každý znak je určen dvojicí samostatných alel.
  - **Zákon o segregaci alel**  
Dvojice samostatných alel se při zrání rozcházejí a do každé gamety přechází jedna z obou alel.
  - **Zákon o nezávislé kombinaci alel**
- Fenotypové zákony
  - **Zákon o uniformitě hybridů**  
Křížíme-li dominantního homozygota s homozygotem recesivním, jsou jejich potomci F1 generace v sledovaném znaku všichni stejní. Reciproká křížení u jakýchkoliv jedinců F1 generace dávají shodné výsledky.
  - **Zákon o štěpení v potomstvu hybridů**  
Při křížení heterozygotů lze genotypy a fenotypy vzniklých jedinců vyjádřit poměrem malých celých čísel. Vzniká genotypový a fenotypový štěpný poměr.

# Genetika

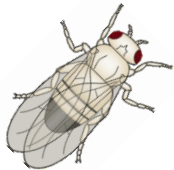
- specializovaný biologický obor zabývající se variabilitou a dědičností
  - **klinická genetika**
    - zabývá se diagnostikou, léčením a prevencí genetických nemocí (u celé rodiny!)
    - genetické poradenství
  - **lidská genetika**
    - studuje variabilitu a dědičnost u člověka
  - **cytogenetika**
    - studium chromozomů
  - **molekulární genetika**
    - studium struktury a funkce jednotlivých genů
  - **populační genetika**
    - studium proměnlivosti populací
  - **komparativní a evoluční genetika**
    - mezidruhové srovnání a studium evoluce druhů



# Genomika

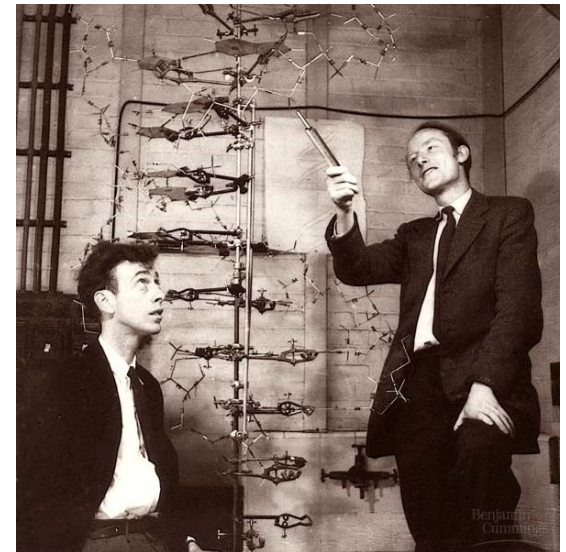
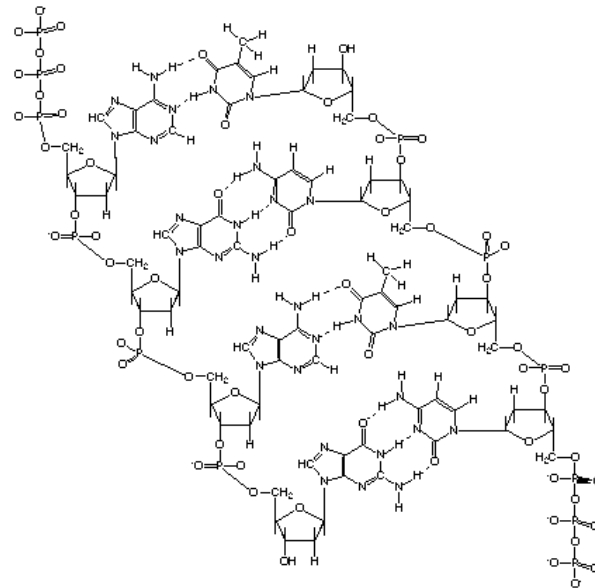


- studuje strukturu a funkci genomů pomocí genetického mapování, sekvenování a funkční analýzy genů
- snaží se o pochopení veškeré informace obsažené v DNA živých organismů
  - **strukturní genomika** = pochopení struktury genomu
    - konstrukce detailních genetických, fyzických a transkripčních map genomů příslušných organismů
    - reprezentovala zejména iniciální fázi analýzy genomů; konečným cílem byla kompletní znalost DNA sekvence (např. HUGO projekt)
  - **bioinformatika** = shromažďování, analýza a vizualizace biologických souborů dat
    - využívá metod výpočetní techniky, tvorba databází a softwarů
  - **funkční genomika** = studium funkce genů a ostatních částí genomu
    - využívá poznatků strukturní genomiky a snaží se o poznání funkce genů; velmi často k tomu využívá modelové organizmy (kvasinka, nematoda, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Mesocricetus auratus* aj.) jako časově a finančně výhodnou alternativu vyšších živočichů (zejm. pro možnost studovat mnoho generací v relativně krátkém čase)



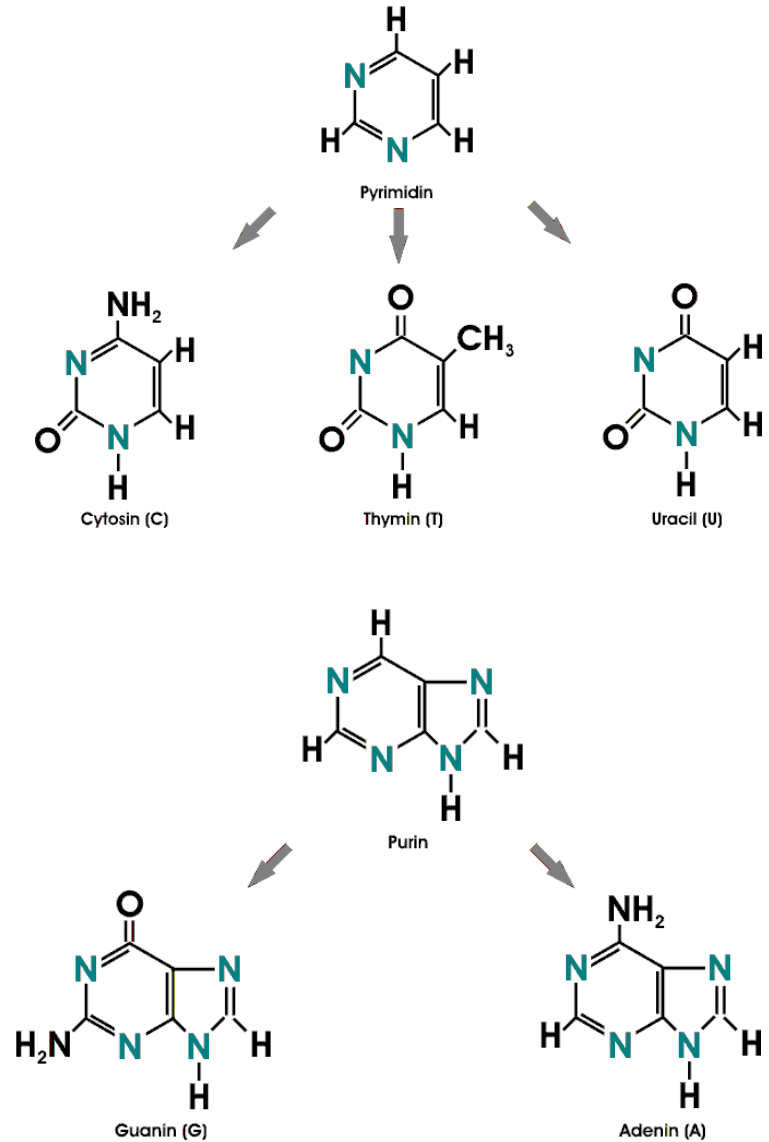
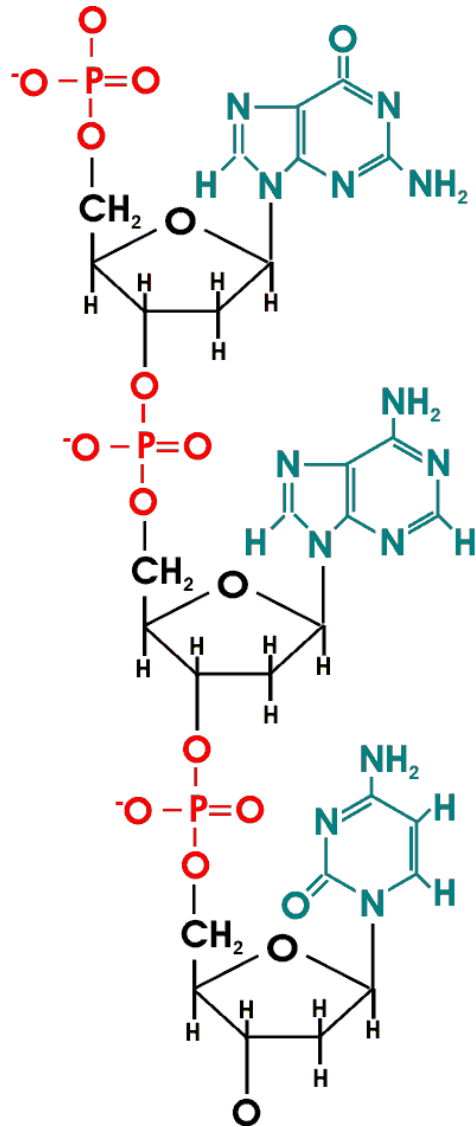
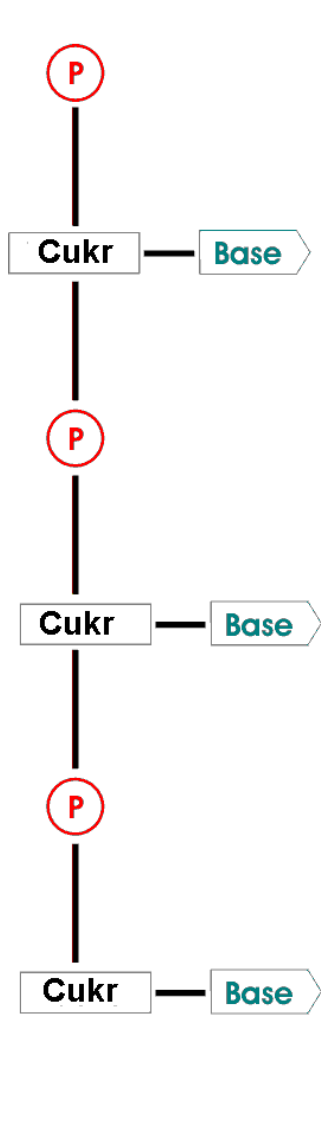
# DNA

- molekula DNA jako taková byla objevena v roce 1869, kdy se švýcarskému lékaři Friedrich Miescherovi podařilo izolovat DNA z leu



- 1962 obdrželi společně Francis Crick, James Watson a Maurice Wilkins Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství. Rosalyn Franklin se pro tragické úmrtí této ceny nedočkala.

# DNA



# Gen

= konkrétní úsek molekuly DNA nesoucí informaci pro tvorbu proteinu nebo NA (rRNA, tRNA...).

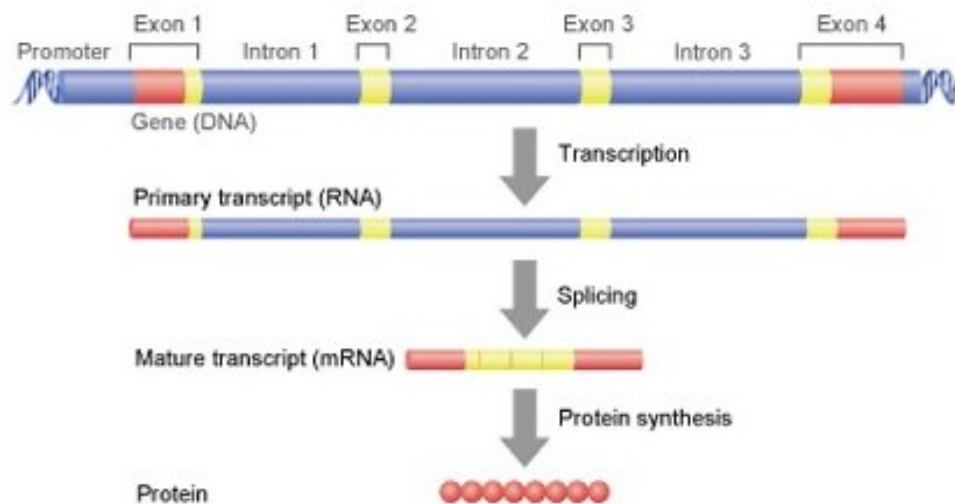
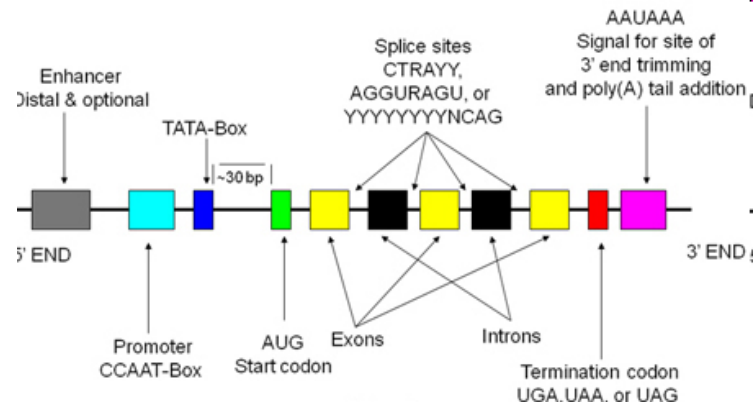
- geny strukturní
- geny pro RNA
- geny regulační
  
- **exony** = funkční úseky genu, které jsou přepisovány do mRNA a dále translantovány při proteosyntéze
- **introny** = úseky genu, jejichž funkce dosud nebyla zcela objasněna a které nejsou využívány pro translaci

Dle jejich obsahu geny dělíme na:

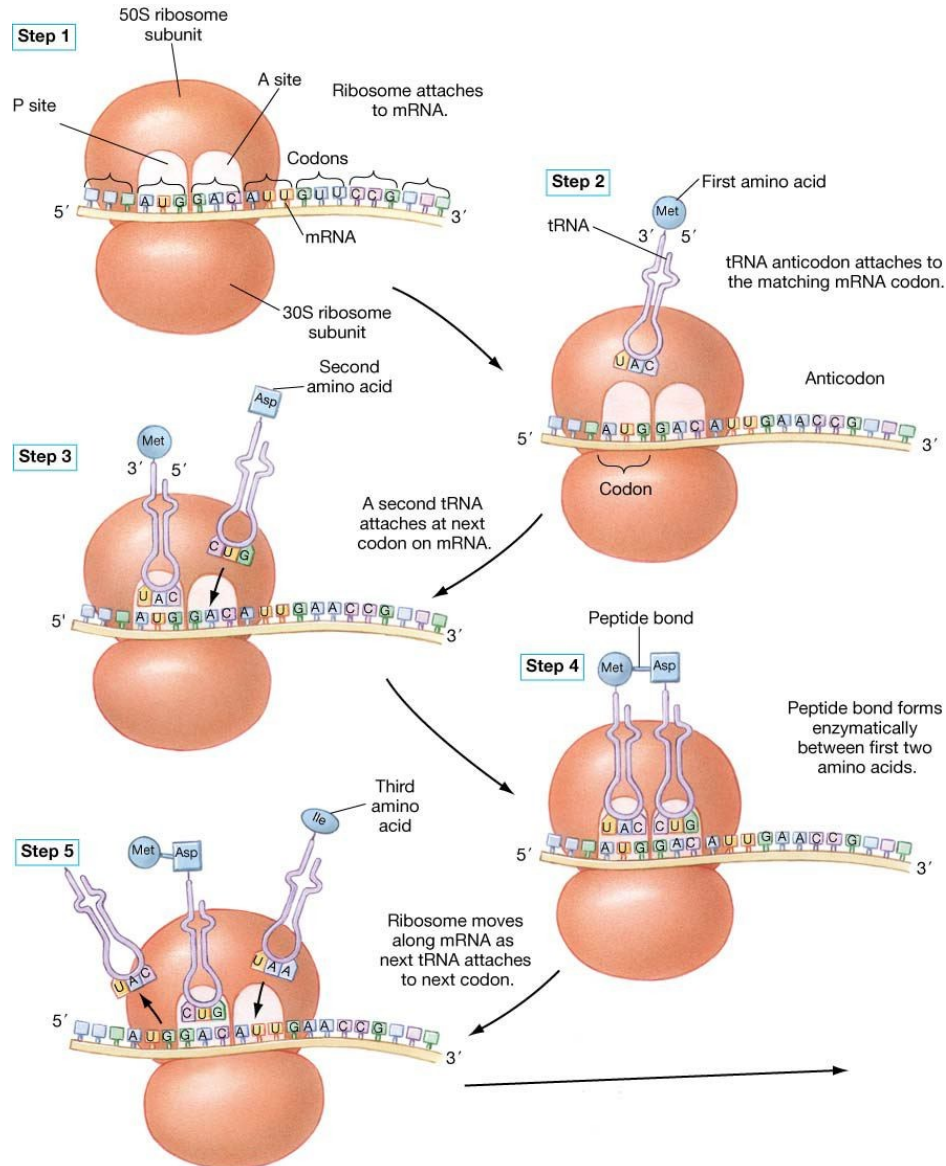
- **jednoduché** - obsahují pouze exony
- **složené** - obsahují i introny
  
- **genové rodiny** = sekvenčně podobné geny, které vznikly zřejmě duplikací během evoluce, např. geny pro (hemo)globiny, imunoglobuliny, ...



# Struktura genu a transkripce

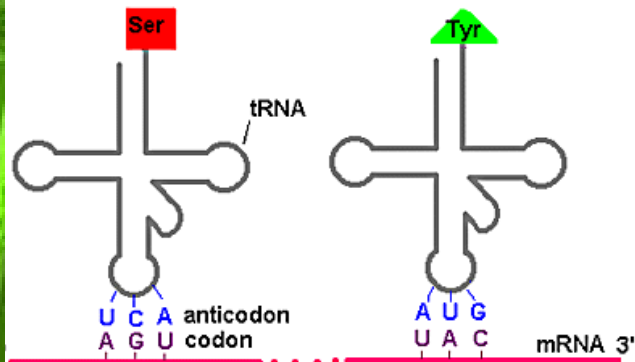


# Genová translace



# Genetický kód

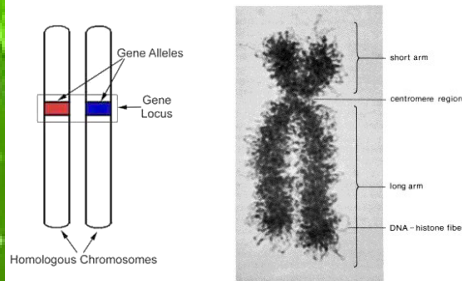
- určuje pořadí aminokyselin v proteinu
- univerzální = podobný princip u většiny živých organismů
- tripletový = trojkombinace 4 nukleotidů (A, C, G, T)
- degenerovaný =  $4^3 = 64$ , ale aminokyselin jen 21



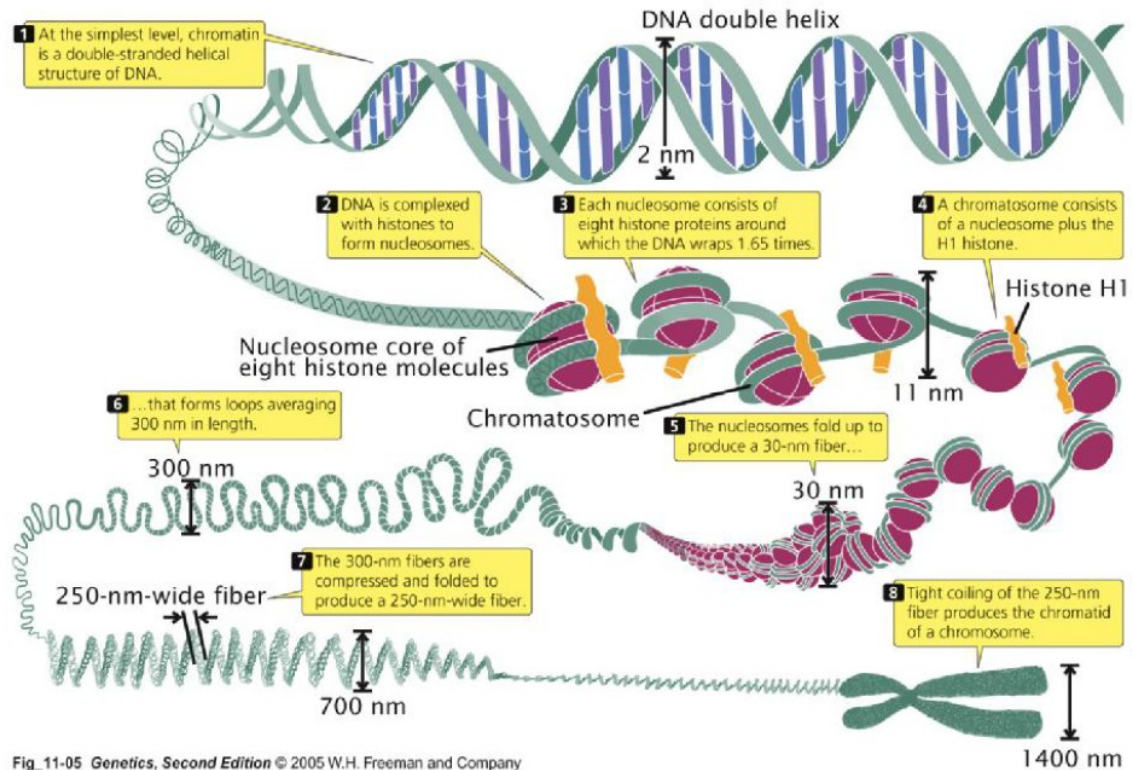
	1. pozice		2. pozice		3. pozice				
	U	C	A	G					
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop	A
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C
	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G

# Základní genetické pojmy

- chromozom



- lokus
- alely
- dominantní
- recesivní
- homozygot
- heterozygot
- genotyp
- fenotyp



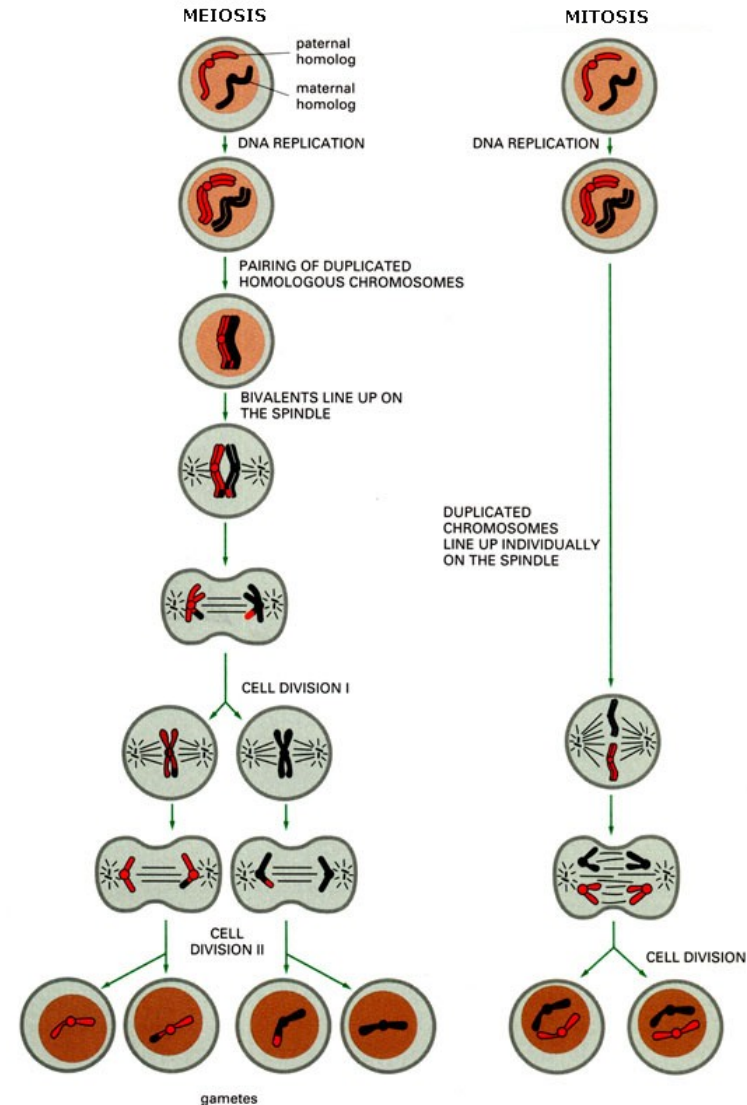
Fig\_11-05 Genetics, Second Edition © 2005 W.H. Freeman and Company

# Mitóza a meióza

**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

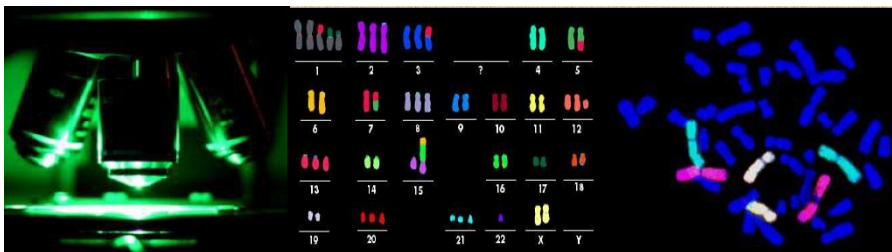


# Cytogenetika a stanovení karyotypu

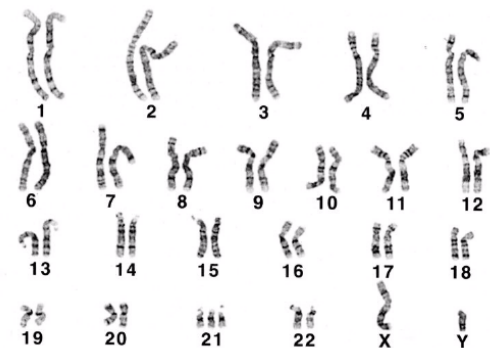
- cytogenetika se zabývá studiem organizace genomu, struktury a funkce chromozomů u eukaryot

## Vyšetření chromozomů

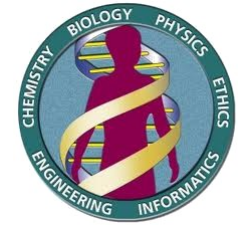
- materiál: b. z periferní krve, plodové vody atd. se kultivují in vitro (stimulace mitózy pomocí fytohemaglutininu), zastavení mitózy za 2-3 dny (pomocí kolchicinu, kt. zabraňuje tvorbě dělicího vřeténka)
- b. do hypotonického prostředí → barvení → fotografování
- **karyotyp** = soubor všech chromozomů v jádře b., zjišťuje se na základě cytogenetického barvení, kt. využívá různé barvitelnosti sekvencí bohatých na AT páry a GC páry nukleotidů
- idiogram = obraz chromozomů v b. určitého jedince
- **FISH**



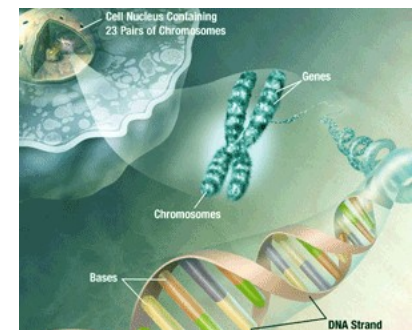
Karyotyp podle Denverské klasifikace



# Lidský genom

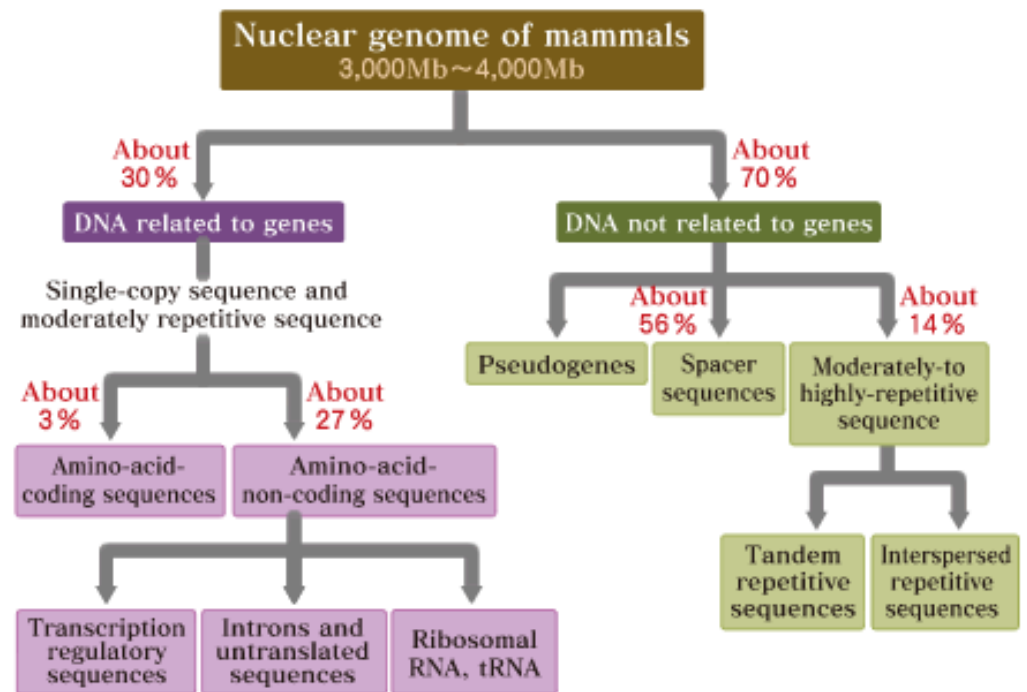


- **Human Genome Project** (HUGO) - James D. Watson - v r. 2001 zveřejnění prvních výsledků
- **gen** = konkrétní úsek molekuly DNA nesoucí informaci pro tvorbu proteinu nebo NA (rRNA, tRNA...). ~ 21 tisíc genů (2011)
- **pseudogen** = sekvence DNA, která je podobná genu, ale nedochází k jejímu přepisování v RNA (transkripci). ~ 20 tisíc pseudogenů
- **genom** = soubor všech genů v jedné buňce, **genom jaderný a mitochondriální** (mtDNA)
- v jádru diploidní lidské buňky 22 párů chromozomů (autozomy) a pár pohlavních chromozomů X/Y (gonozomy) = karyotyp



# Lidský genom

- hustota genů na jednotlivých chromozomech dost heterogenní
- pouze ~ 10 % kódující sekvence
- ~ 75 % se skládá z jedinečné (neopakující se) sekvence
- zbytek repetitivní sekvence





# Lidský genom

**Repetitivní sekvence** = DNA s vysokým množstvím kopií

- se podílí na formování vyšších nukleoproteinových struktur, jako jsou telomery nebo centromery
- při chromozomových přestavbách, mají vliv na regulaci genové exprese při procesu zvaném RNA interference, zajišťují ochranu konců lineárních chromozomů, řídí správný průběh mitotického i meiotického dělení buňky
- zřejmě udržují strukturu chromozomů, možná jsou "evoluční" rezervou
  
- **rozptýlené**
  - DNA transpozony
  - retrotranspozony
  
- **tandemové**
  - mikrosatelity
  - minisatelity

# Lidský genom

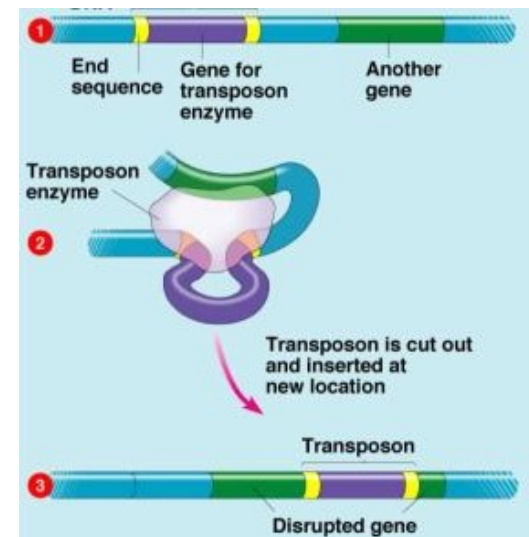
## DNA transpozony

- např. „Sleeping Beauty“ - možné využití při genové terapii díky více specifickým místům integrace, než je tomu např. u retrovirů
- jádrem je sekvence kódující enzym transponázu, který se váže k oběma koncům repetitivního elementu, jež jsou tvořeny invertovanými repeticemi
- invertované konce si tedy mohou "vyměnit" řetězce a stabilizovat tak strukturu stopka-klička, nezbytnou pro aktivitu transponázy
- transponáza pak vyštěpí transpozon a liguje takto vzniklé volné konce chromozomální DNA - podobnost u maturace genů pro Ig (V-D-J rekombinace) a TCR při vyštěpení mezilehlých sekvencí
- uvolněný **komplex transpozon-transponáza se váže na specifický sekvenční motiv** jinde v genomu, transponáza štěpí hostitelskou DNA a liguje transpozon na nové místo
- transpozon se pohybuje mechanismem vyjmout-vložit (cut and paste) a počet kopií zůstává stabilní

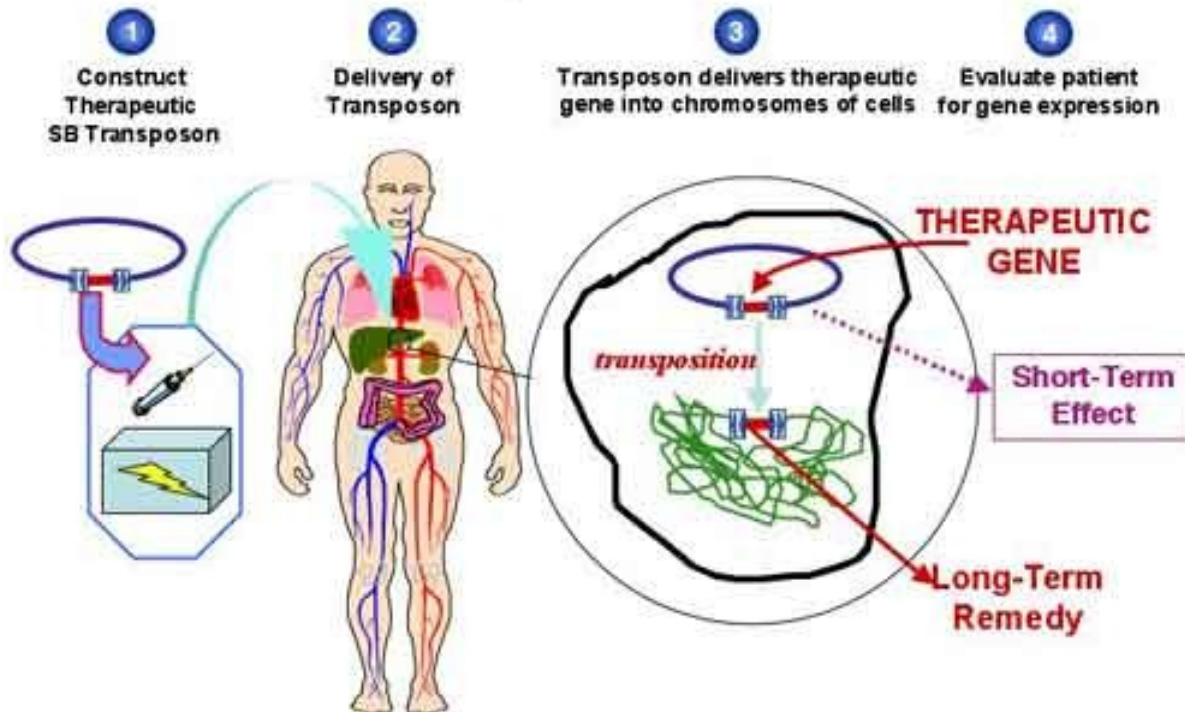
# Lidský genom

## DNA transpozony

- např. „Sleeping Beauty“



## *Sleeping Beauty- Mediated Gene Therapy* — A Straightforward Procedure —



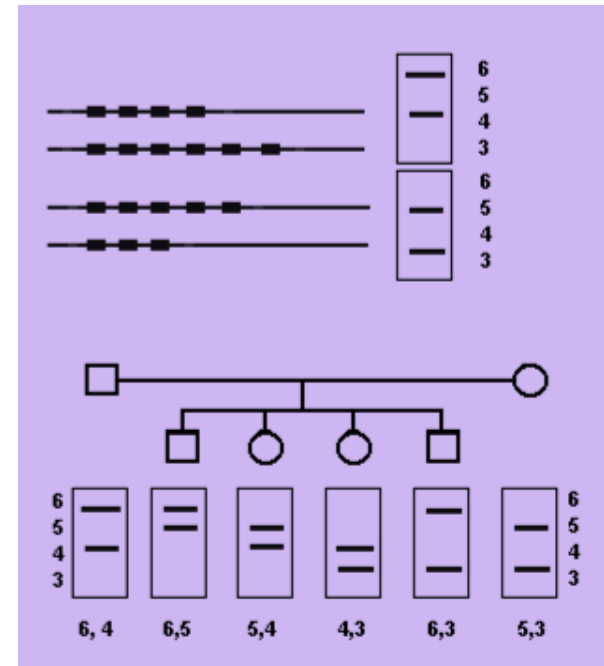
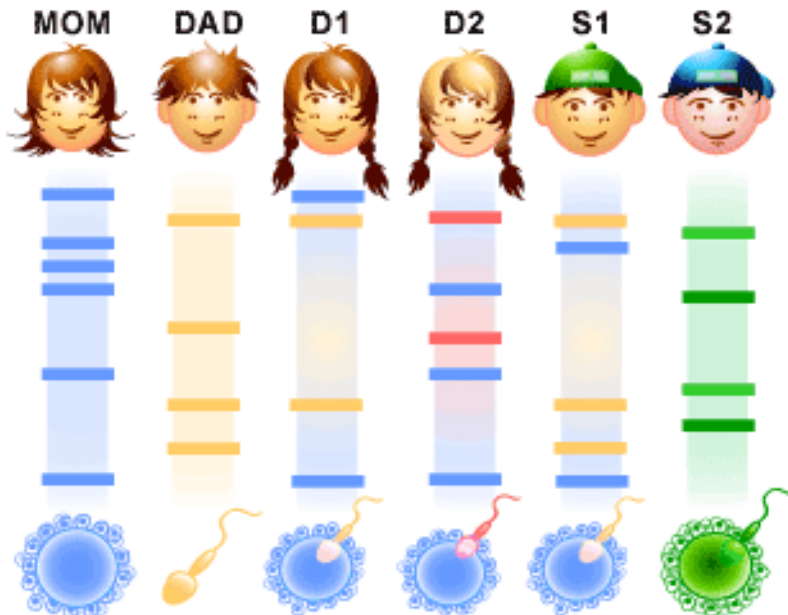
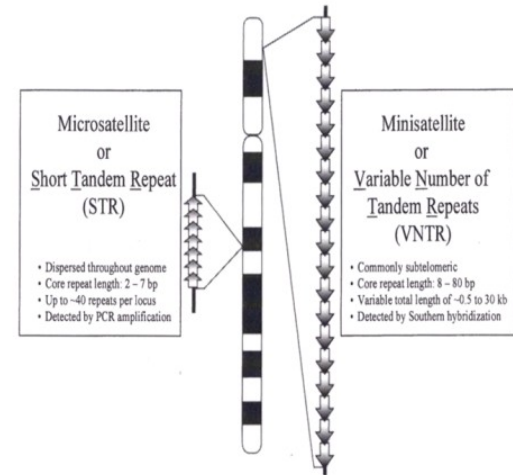
# Lidský genom

## Retrotranspozony

- endogenní retrovity - obsahují na koncích dlouhé repetitivní části zvané LTR („long terminal repeat“) a jsou poměrně časté, ačkoliv v lidském genomu nejsou známy žádné v současnosti aktivní
- autonomní - LINE (*long interspersed nuclear elements*) velmi hojné v lidském genomu (21 % celku), nejčastější L-1 obsahují ve své sekvenci i geny ORF1 a ORF2, které se účastní jejich další replikace
- neautonomní - SINE (*short...*) samy nekódují žádné geny a zneužívají pouze určité buněčné proteiny (včetně ORF proteinů LINE elementů), pouze se přepisují do RNA a následně pomocí reverzních transkriptáz zpět na nějaké místo do DNA, nejčastější jsou Alu-repetice (11 % celku),

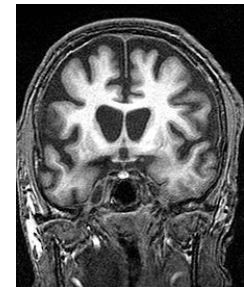
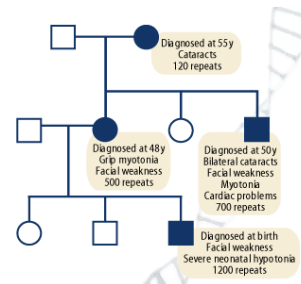
# Lidský genom

- **tandemové repetice**= za sebou jdoucí identické repetice
  - mikrosatelity - opakování 1- 5 bp
  - minisatelity - VNTR (v kb)
    - v subtelomerických oblastech
    - genetické markery



# Lidský genom

- **Huntingtonova chorea**, fatální neurologické onemocnění s nástupem v dospělosti, projevující se jako demence s extrapyramidovou poruchou motoriky. V genu pro **huntingtin** je repetitivní sekvence  $(CAG)_n$ , která kóduje úsek bílkoviny tvořený zbytky glutaminu (polyglutaminový úsek, polyglutamine tract). Za normálních okolností mají lidé méně než 20 trinukleotidů  $CAG$  a tedy i glutaminů v huntingtinu, kde tyto tvoří důležitou doménu pro interakce s jinými proteiny. Pokud se však mutací toto množství zvětší nad 30 glutaminů, protein nepracuje správně s výsledným progresivním odumíráním neuronů v nucleus caudatus.
- **myotonické dystrofie** (svalová dystrofie se svalovou slabostí provázenou paradoxně zvýšeným svalovým tonem) se nachází patologická expanze trinukleotidu  $CTG$  v 3' nepřekládané oblasti genu  $DMPK$  (dystrophia myotonica protein kinase). Mutantní mRNA má sama o sobě patogenní potenciál.
- expanze trinukleotidových repetitivních sekvencí
- autosomálně dominantní choroby



# Lidský genom

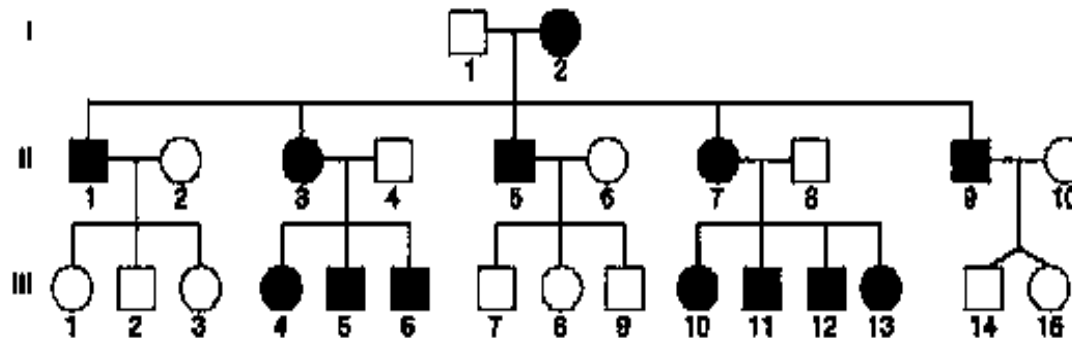
## mtDNA

- původ: alfaproteobakterie pohlcena eukaryotickou buňkou
- mnoho genů během evoluce bylo z mtDNA horizontálně přeneseno do buněčného jádra (geny v jádře kódující různé mitochondriální proteiny silně připomínají bakteriální proteiny)
- ~ 16,5 tisíce bp
- kóduje 37 genů
  - 24 genů pro různou nekódující RNA
  - 13 genů kóduje vlastní mitochondriální polypeptidy zapojené v mitochondriálních procesech (využívány během oxidativní fosforylace)
- maternální dědičnost - 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

# Lidský genom

## mtDNA

- frekvence mutací je u mitochondrií 10-20x vyšší než u jaderné DNA
- → **heteroplazmie** = smíšená populace s více variantami mtDNA, 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

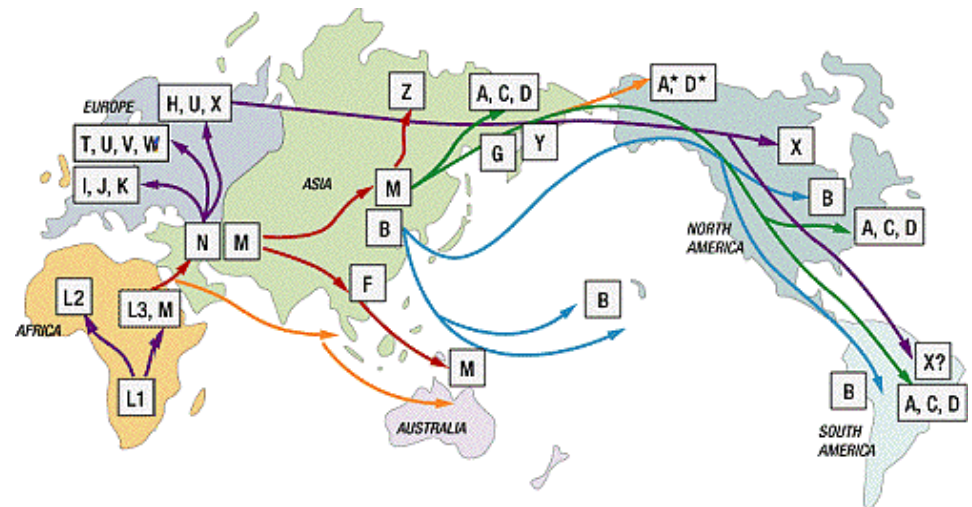
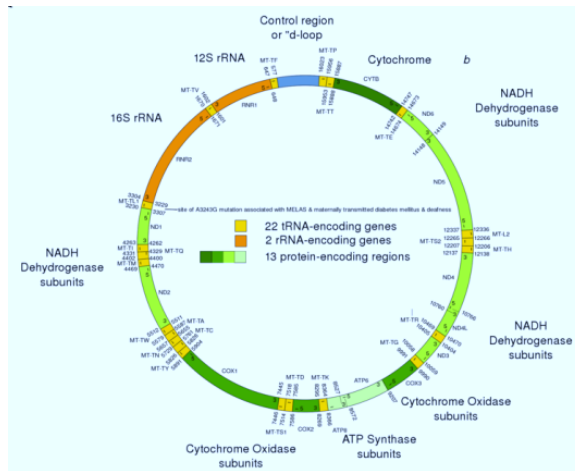




# Lidský genom

## mtDNA

- na základě mtDNA určena migrace lidstva - „mitochondriální Eva“, která žila ~ před 140 000 lety v místech dnešní Etiopie, Keni nebo Tanzanie



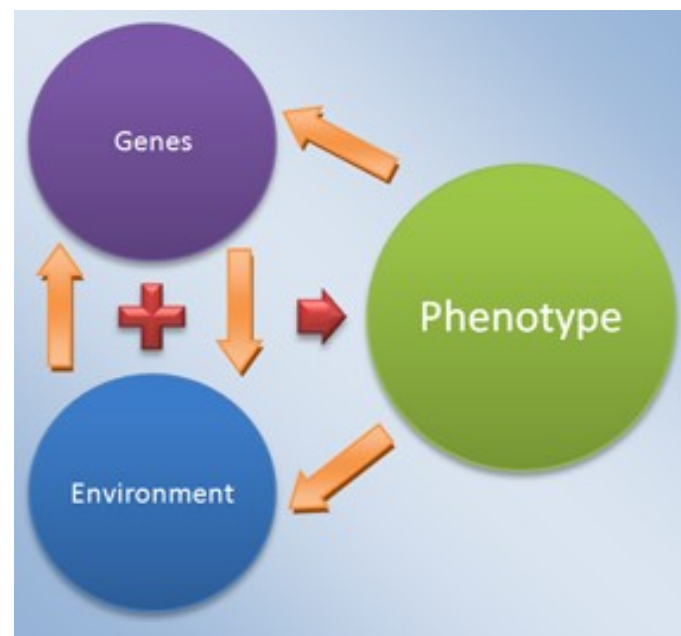


# Obsah přednášky

- Reakce lidského genomu na vlivy prostředí. Exonové, intronové a promotorové mutace
- Monogenní a polygenní choroby a vztah multigenních nemocí a prostředí
- Genetické studie a klinická genetika
- Genové terapie a farmakogenetika/genomika

# Vliv prostředí na lidský genom

- Genetická výbava jedince je zadána v okamžiku zplodění, ale není pro další život konečná - v průběhu života se může měnit jak pod vlivem četných faktorů **epigenetických** (vlivy prostředí), tak pod vlivem **dalších faktorů genetických** (např. mutacemi somatických buněk v průběhu maligní transformace).
- **Biologické mutageny:**  
onkogenní viry: adenoviry, herpes viry, virus Epstein-Barr, Rousův sarkomální virus a Rauscherův virus leukémie
- **Fyzikální mutageny:**  
záření (rentgenové, gama, UV - tvorba thymidinových dimerů)
- **Chemické mutageny:**  
organické, alkylační činidla (ATB), anorganické látky, alkaloidy, kationty těžkých kovů, peroxidy, dusitany, aromatické chlorované deriváty, volné radikály (O·)



# Genetická proměnlivost

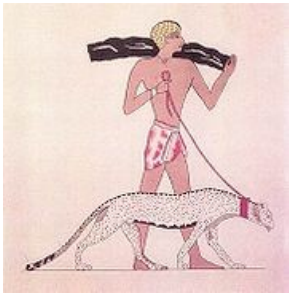
- je zdrojem individuální variability (vytváří se nové kombinace alel):
  - segregace alel při vzniku gamet
  - rekombinace při crossing-overu
  - vznik náhodných kombinací alel při oplození

## Mutace

- procesy, při kterých se mění počet alel (mění se kvalita a kvantita genů)
- **mutageneze** = proces vzniku mutací
- mutace = náhodné změny genotypu, změna genetické informace, poměrně vzácné

Typy mutací (indukované nebo spontánní, ty mají četnost  $\sim 10^{-7}$ , oprava polymerázou a proteinem p53):

- **Genové mutace**
- **Chromozomové mutace = aberace**
- **Genomové mutace**



# Genetická uniformita

Science.1983 Jul 29;221(4609):459-62.

The cheetah is depauperate in genetic variation.

[O'Brien SJ](#), [Wildt DE](#), [Goldman D](#), [Merril CR](#), [Bush M](#).



- A sample of **55 South African cheetahs** (*Acinonyx jubatus jubatus*) from two geographically isolated populations in South Africa **were found to be genetically monomorphic at each of 47 allozyme (allelic isozyme) loci**. Two-dimensional gel electrophoresis of 155 abundant soluble proteins from cheetah fibroblasts also revealed a low frequency of polymorphism (average heterozygosity, 0.013). Both estimates are dramatically lower than levels of variation reported in other cats and mammals in general. The extreme monomorphism may be a consequence of a demographic contraction of the cheetah (a population bottleneck) in association with a reduced rate of increase in the recent natural history of this endangered species.

# Vzácné mutace a polymorfismus

- **vzácné mutace** - jsou výrazně patologické a tudíž jsou z populace odstraňovány selekcí, nebo vznikly nedávno a nestačily se v populaci rozšířit), vyskytuje se v populaci méně než v 1 %
- **polymorfismus** - častá mutace, tyto mutace jsou základem interindividuální variability jedinců, v jediném genu je často mnoho polymorfizmů, jejich kombinace tvoří haplotypy, vyskytuje se v populaci více než v 1 %
  - **SNP** = jednonukleotidový polymorfismus - bialelické
  - **minisatelitní a mikrosatelitní polymorfismy** - multialelické

## Germinativní a somatická mutace

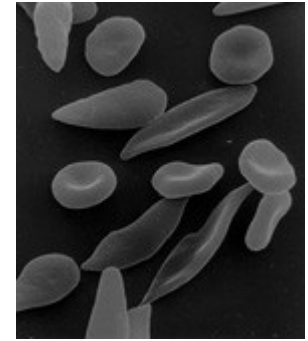
- **germinativní mutace** - přenášeny na potomstvo (často příčinou zániku plodu), u potomka přítomny ve všech buňkách, mají vliv na vývoj druhu, „úspěšnost“ germinativní mutace 1:100000
- **somatické mutace** - vznikají v somatických buňkách v průběhu života (maligní transformace x žádný fyziologický vliv)

# Genové mutace

- mění jednotlivé geny (alely), většinou jsou indukované
- podstata je molekulární, mění se struktura DNA, ale nenarušuje se celistvost stavby chromozomu
- v somatických nebo v pohlavních buňkách
- mutace v regulačních genech pro množení a diferenciaci → nádorového onemocnění
  
- **bodové mutace - substituce** = záměna páru nukleotidu za jiný (→ změna AA sekvence, změna v regulaci, ovlivnění transkripce a translace... nebo tvorba STOP kodonu), transverze/tranzice, spíše v exonech
  
- **delece/inzerce** = ztráta/zařazení nukleotidů (→ možný posun čtecího rámce), spíše v intronech



# Genové mutace



## Srpkovitá anemie

- **missense** mutace genu pro hemoglobin na 6. pozici v  $\beta$ -řetězci (hydrofóbní valin místo hydrofilní glutamové kyseliny, tvorba shluků Hb a tím změna tvaru ery)  $\rightarrow$  HbS
- autosomálně recesivní

	ancestral	mutant
DNA	-CTC-	-CAC-
mRNA	-GAG-	-GUG-
AA	-glu-	-val-

- Srpkovité červené krvinky mnohem hůř přenášejí kyslík. Lidé se srpkovitou anémií mají proto ve srovnání s obyčejnými lidmi červených krvinek víc. To jim dává proti malárii velkou výhodu, díky níž mají lepší šanci přežít.



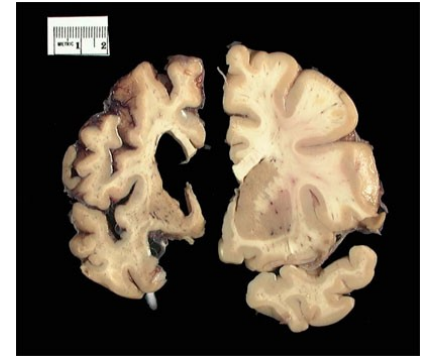
# Genové mutace

## $\beta^0$ thalasemie

- **nonsense** mutace pro Hb - chybná syntéza jednoho z řetězců globinu
- autosomálně recesivní

	ancestral	mutant
DNA	-AGT-	-ACT-
mRNA	-UCA-	-UGA-
AA	-ser-	-STOP

# Genové mutace



## Huntingtonova choroba

- trinukleotidová expanze

	ancestral	mutant
DNA	...TAC-GTC-...	...TAC-(GTC-GTC-GTC) <sub>20</sub> -GTC-...
mRNA	...-AUG-CAG-...	...-AUG-(CAG-CAG-CAG) <sub>20</sub> -CAG-...
AA	...-met-gln-...	...-met-(gln-gln-gln) <sub>20</sub> -gln-...

## Hemofilie A

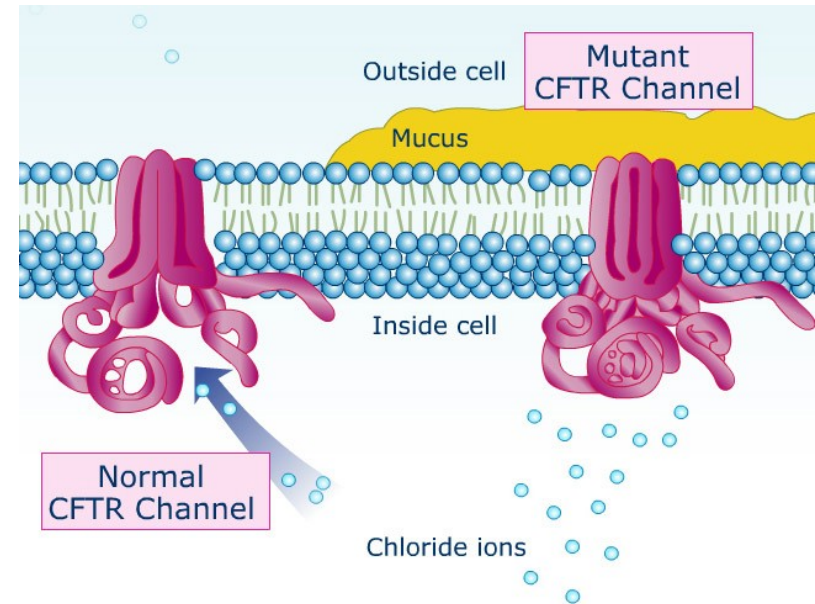
= nedostatek srážecího faktoru VIII

- **inzerce** 3000 bp - snížení tvorby proteinu
- gonosomálně recesivní - vazba na X chromozom
- žena je přenašečka

# Genová mutace

## Cystická fibróza

- deleční mutací genu produkujícího protein CFTR (chloridový ABC transportér na buň. membráně) → nefunkční protein
- **delece** 3 bp v pozici 1652 až 1655 v exonu 10 (delece phe v kodonu 508)
- autosomálně recesivní



	ancestral	mutant
DNA	-TAG-AAA-CCA-	-TA A-CCA-
mRNA	-AUC-UUU-GGU-	-AUU-GGU-
AA	-ile-phe-gly-	-ile-gly-

# Cystická fibróza

- více než 30 mutací, které způsobují toto onemocnění

důvody k vyšetření jsou:

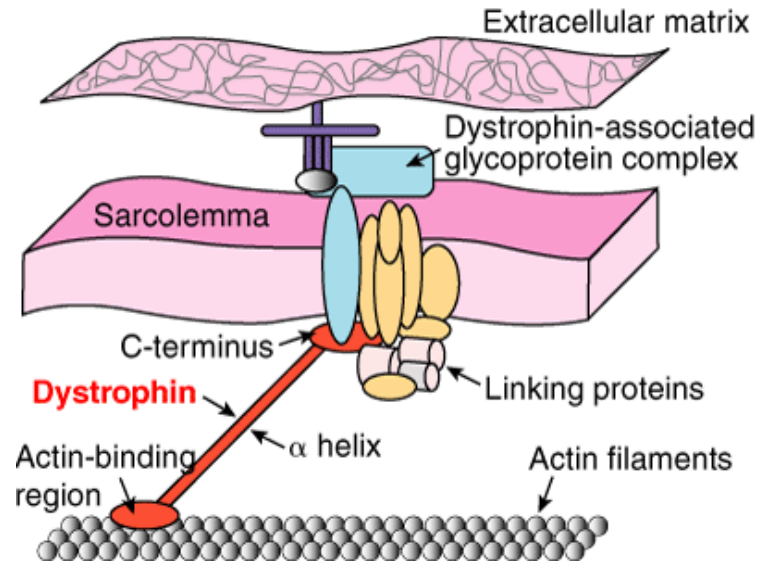
- podezření na klinické onemocnění
- příbuzenský vztah rodičů
- opakované potraty
- léčená neplodnost



# Genová mutace

## Duchennova svalová dystrofie

- „frameshift“ mutace = posun čtecího rámce v genu pro protein dystrofin
- gonosomálně recesivní - vazba na X chromozom



	ancestral	mutant
DNA	-CAC-TGT	-CAC- <b>TTG</b> -T..-
mRNA	-GUG-ACA-	-GUG-AAC-U..-
AA	-val-thr-	-val-gly-

# Chromozomové mutace - aberrace

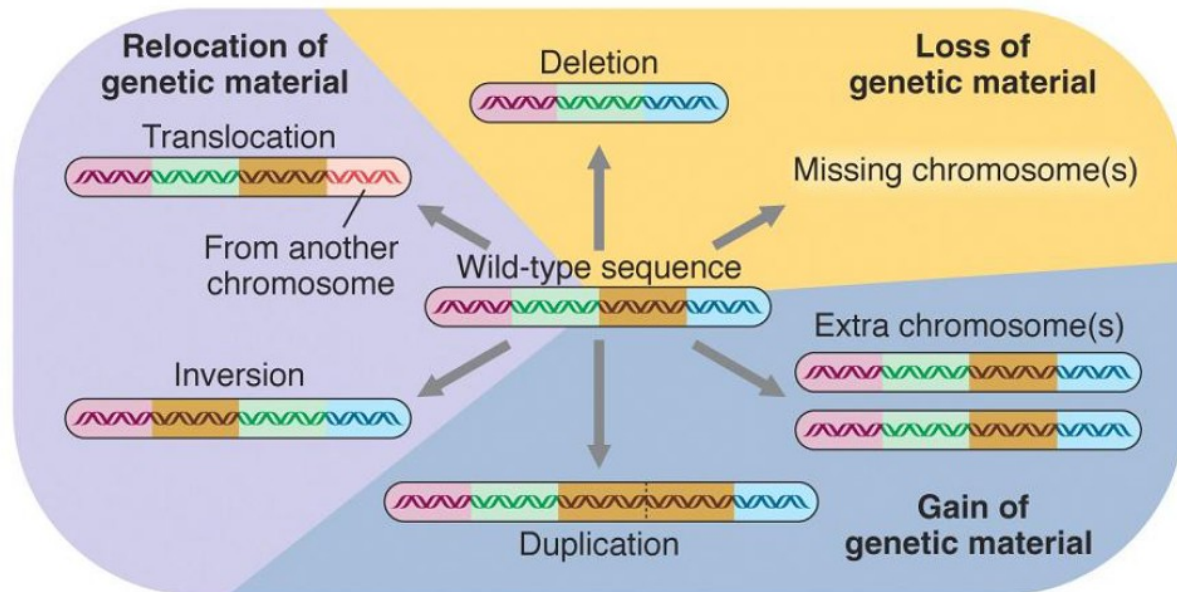
- nemění strukturu samotných genů, ale mění strukturu chromozomů
- dají se pozorovat ve světelném mikroskopu
- mohou být překážkou normálního průběhu meiózy a jimi postižené gamety mohou být sterilní nebo mohou po splynutí vznikat neživota schopné zygoty

## Strukturní chromozomové aberrace

- následkem chromozomových zlomů, na které navazuje určitá přestavba - primární je tedy porucha struktury
- dělíme je na:
  - **balancované** - je zachováno původní množství genetického materiálu
  - **nebalancované** - část genetického materiálu chybí či přebývá

# Chromozomové mutace - aberrace

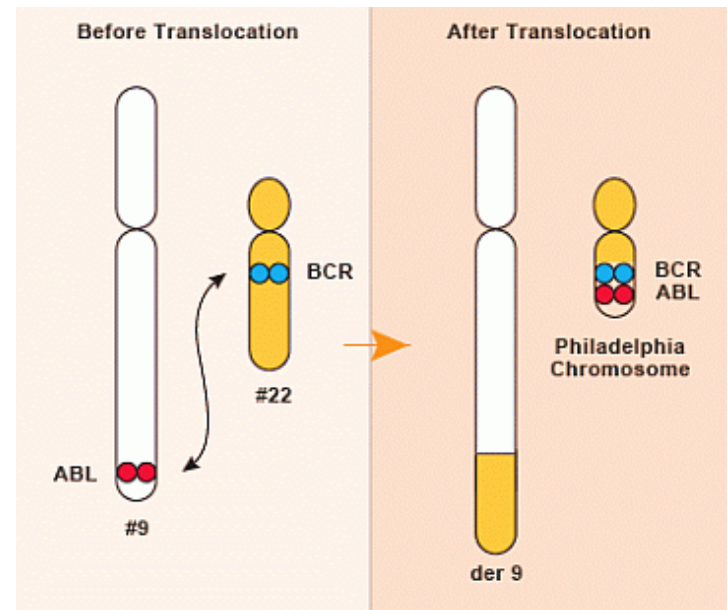
- **deficiencie** = ztráta koncové části chromozomu, oddělený kousek se rozpadne v cytoplazmě, dochází ke ztrátě genů, ztráta důležitých genů vede ke smrti
- **delece** = ztráta vnitřní části chromozomu.
- **duplikace** = zdvojení některých částí chromozomů
- **inverze** = převrácení části chromozomu o 180°
- **fragmentace** = rozpad na malé části
- **translokace** = přesun části chromozomu na jiný chromozom, může vést k vytvoření nového znaku



# Chromozomové mutace - aberrace

## Philadelphský chromozom

- chromozomální translokace mezi dlouhými raménky 9. a 22. chrom. t(9;22)(q34;q11),
- u CML je fúzní gen ABL/BCR exprimován jako cytoplazmatický protein p210, ten asociuje s cytoskeletárním aktinem
- p210 má silnou tyrozin-kinázovou aktivitu → fosforylace více než 50 proteinů → fenotyp. změny b.:
- proliferační aktivity (mitogenní úč.)
- adhezivita ke stromatu krvetv. tkáně
- rezistence k apoptóze
- nestabilita genomu





# Genomové mutace

## Numerické chromozomové aberace

- způsobeny abnormálním počtem chromozomů v karyotypu
- struktura chromozomů je neporušená, patologicky se uplatňuje nestandardní množství genů
- vznikají díky chybě při rozchodu chromozomů do dceřiných buněk během buněčného dělení (nondisjunkce) nebo abnormalitami fertilizace či časně embryogeneze
- **aneuploidie** - numerická odchylka se týká pouze určitého chromozomu nebo chromozomů, ne však celé sady
  - Konkrétní chromozom může být buď znásoben - **trisomie** ( $2n + 1$ ), **tetrasomie** ( $2n + 2$ )
  - nebo naopak ztracen - **monosomie** ( $2n - 1$ ), **nulisomie** ( $2n - 2$ )

# Genomové mutace

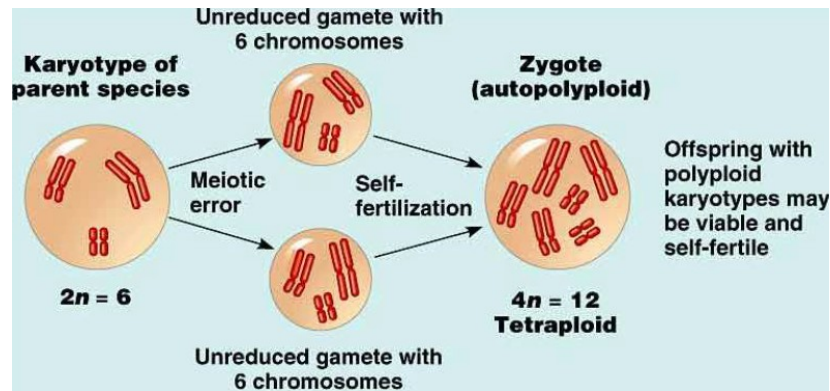
## Aneuploidie

- monosomie
  - gonosomální
    - Turnerův sy. (45, X0)
  - trisomie
    - autosomální
      - Downův sy. (47, XX/XY + 21)
      - Edwardsův sy. (47, XX/XY + 18)
      - Patauův sy. (47, XX/XY + 13)
    - gonosomální
      - Klinefelterův sy. (47, XXY)
      - super female - triple X sy. (47, XXX)
      - super male = Jacobův sy. (47, XYY)



# Genomové mutace

- **polyploidie** - znásobena je celá chromozomová sada - porucha rozdělení celých sad nebo oplození spermii (dispermie), u člověka přichází v úvahu zejména triploidie ( $3n = 69$  chromozomů) a tetraploidie ( $4n = 92$  chromozomů), většinou ale:
  - těhotenství je potraceno
  - molla hydatidosa (a pak těhotenství nutno ukončit potratem)
  - porod novorozence s triploidii - velmi časná letalita



- u rostlin polyploidie časté: triploidie (banány), tetraploidie (brambory), hexaploidie (pšenice), oktoploidie (jahody) - spojitost mezi růstem a vnitřními hodinami rostlin → hybridní a polyploidní rostliny mají za denního světla sníženou funkci represorů transkripce, kt. regulují aktivitu genů → během dne jsou tak aktivnější geny, jejichž produkty se účastní fotosyntézy a metabolismu škrobu → díky zvýšenému výkonu fotosyntézy i ukládání škrobu pak hybridní a polyploidní rostliny rostou lépe



# Obsah přednášky

- Monogenní a polygenní choroby a vztah multigenních nemocí a prostředí
- Genetické studie a klinická genetika
- Genové terapie a farmakogenetika/genomika

# Monogenní nemoci

- **mendelistická dědičnost**
- dědičný podklad - 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**
  - 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“ alelu na jednom nebo obou chromozomech
  - mají charakteristický způsob přenosu v rodinách

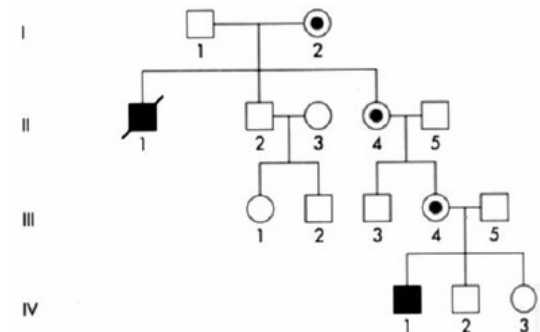
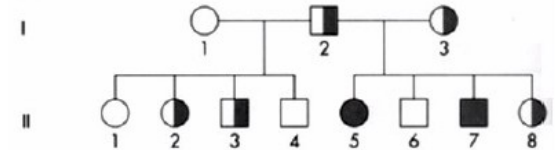
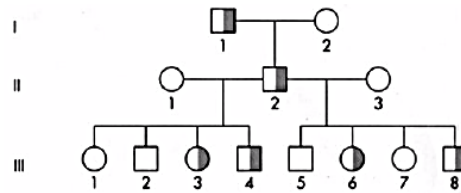
# Monogenní nemoci

- choroby dětského věku
- méně než 10 % z nich se manifestuje po pubertě a pouhé 1 % se objeví po skončení reprodukčního věku
- často výrazně patologické
- 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
- doposud známé shrnuje OMIM (On-line Mendelian Inheritance in Man)  
~ 6000 klinicky významných fenotypů

# Monogenní nemoci

Základní typy dědičnosti:

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



# Monogenní nemoci

## Typy přenosu

- autozomální - geny na obou autozomech aktivní
- gonozomální (X-chromozom vázané)
  - muži hemizygotní
  - u žen 1 X-chromozom inaktivován!!
- jiné
  - imprinting = aktivita určitého genu regulována v závislosti na tom, od kt. rodiče byl gen zděděn
  - mozaicizmus = přítomnost dvou (nebo více) buněčných linií s různým karyotypem, pocházejících z jedné zygoty



# Monogenní nemoci

Podle projevu genotypu ve fenotypu

- recesivní - nemoc jen u mutovaného homozygota
- dominantní - nemoc stejná u heterozygota a mutovaného homozygota
- neúplně dominantní - odstupňovaná tíže nemoci u heterozygota a mutovaného homozygota
- kodominantní - jak normální tak patologická alela jsou vyjádřeny ve fenotypu

# Monogenní nemoci - AD

- nemoci jsou důsledkem jak mutací přenášených mezi generacemi tak vzniklých nově
- nemoc se projevuje v každé generaci - postižený jedinec má postiženého rodiče (a prarodiče), a to matku nebo otce
- riziko pro potomka 0,50 (pokud by byli oba rodiče postižení pak 0,75, ale to je vzácné)
  
- familiární hypercholesterolemie (1/500),
- myotonická svalová dystrofie (1/1000)
- Huntingtonova chorea (1/3000)

# Monogenní nemoci - AR

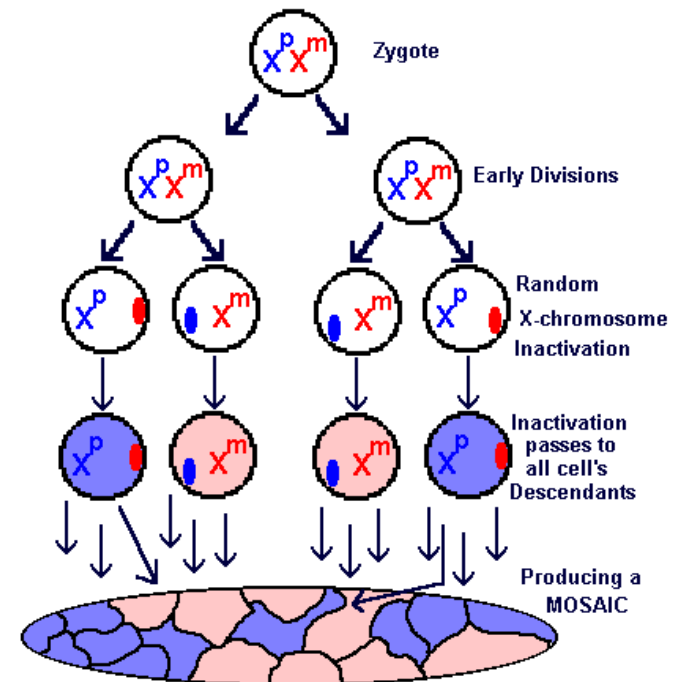
- u heterozygotů s 1 mutovanou alelou stačí produkt k udržení normální funkce
- manifestní onemocnění u heterozygota je důsledkem:
  - haploinsuficience - pro normální funkci je potřeba >50% aktivního genového produktu
  - dominantě negativního efektu - syntéza abnormálního proteinu, který "soutěží" s normálním a ovlivňuje fenotyp
  - zesílení funkce ("gain-of-function") - mutací je posílena přirozená vlastnost proteinu
  - ztráty heterozygotnosti (loss-of-heterozigosity, LOH) v somatické buňce - např. familiární predispozice k nádorům v důsledku mutací v supresorových genech (např. retinoblastom)
- velmi často enzymové defekty
- postižen je mutovaný homozygot (popř. sourozenci), heterozygotní rodiče jsou přenašeči (asymptomatictí) - riziko  $0,50 \times 0,50 = 0,25$
- frekvence přenašečů nemoci v populaci  $\gg$  frekvence nemocných
- nejčastější AR nemocí u bělochů je **cystická fibróza** (f nemocných 1/2000, f přenašečů 1/22)
- konsanguinita (příbuzní rodiče) a geneticky izolované populace (např. Aškenazi židé - Tay-Sachsova choroba )

# Monogenní nemoci - X-vázané

- ženy 3 genotypy, muži pouze 2
- X-vázané nemoci se manifestují u všech mužů, kteří zdědili mutaci, a pouze u homozygotních žen
- hemofilie A
- Duchenneova muskulární dystrofie
- Wiskott-Aldrichův syndrom (imunodeficiency)

## Inaktivace X-chromozomu u žen

- kompenzace dávky a exprese X-vázaných genů
- hypotéza Lyonové ("lyonizace") - v somatických bb. je 1 X inaktivovaný a v interfázi se zobrazuje jako "Barrovo" tělísko (viz sporné identifikace pohlaví), proces je náhodný, může se týkat jak otcovského tak mateřského X a důsledkem je variabilní exprese X-vázaných genů u heterozygotek ("manifestující přenašečka")
- funkční mozaicismus



# Komplexní nemoci

- multifaktoriální, multigenní
- roli hrají kombinace určitých genů a určitých faktorů zevního prostředí
- na odhalení nejobecnějších principů genetiky multifaktoriálních nemocí se na rozdíl od genetiky nemocí mendelistických v současné době stále ještě čeká
- 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
- pokud choroba má prokazatelně familiární výskyt, musíme očekávat podíl genetického podkladu na její manifestaci, a to i v tom případě, že není dosud dobře definován nebo dosavadní znalost nepovažujeme za přesvědčivou.
- své genetické pozadí mají i tak relativně vzdálené proximální fenotypy, jako je např. kvalita života u nemocných s chronickým kardiovaskulárním onemocněním

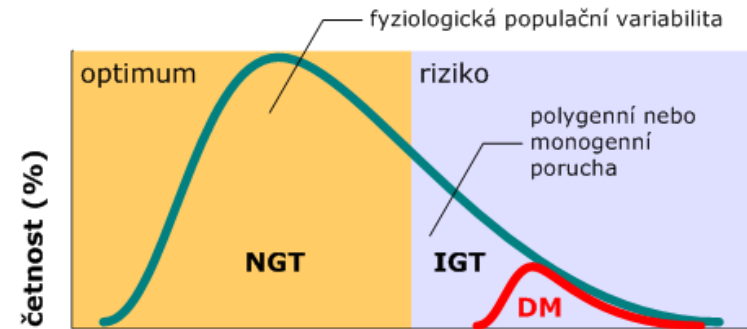
Každá choroba má nějaké genetické pozadí, jehož podíl na manifestaci dané choroby je různý.

# Komplexní nemoci

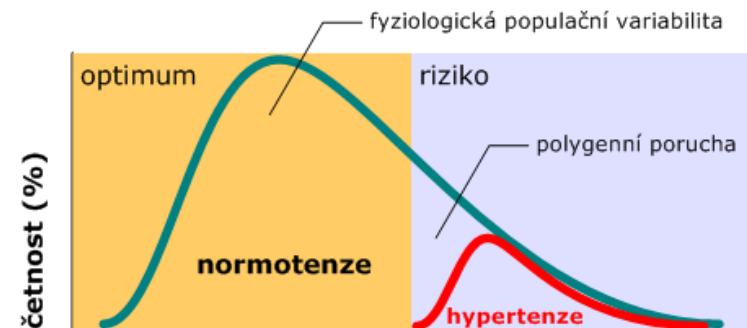
- **neúplná penetrance patologického fenotypu**
  - u určité části osob, přestože zdědí nevýhodný genotyp (zde ve smyslu souboru vícero genů) se patologický fenotyp nerozvine
- **existence fenokopii**
  - patologický fenotyp může být přítomen u lidí, kteří nejsou nosiči zmíněného genotypu
- **genetickou heterogenitou (lokusovou a alelickou)**
  - klinický obraz není specifický, ale může se rozvinout v důsledku záměn v genech ležících na různých lokusech (= lokusová heterogenita), v jednotlivých genech může být přítom vícero mutací či polymorfizmů (= alelická heterogenita)
- **polygenní dědičností**
  - predispozice k rozvoji patologického fenotypu se zvyšuje pouze při simultánním výskytu určitého souboru alel
- **vysokou populační frekvencí alel zodpovědných za rozvoj patologického fenotypu**
  - každá jednotlivá predisponující alela pravděpodobně není sama o sobě výrazně patogenní
- **spolupůsobením dalších mechanismů přenosu**
  - mitochondriální dědičnost, imprinting

# Komplexní choroby

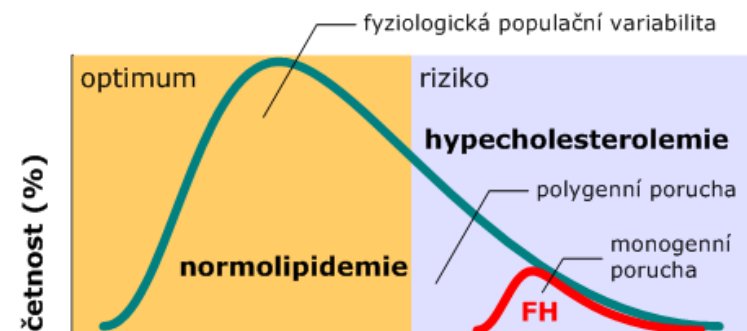
- choroby, na jejichž vzniku a progresi se podílí „komplex“ genetických, epigenetických a vnějších faktorů
  - fenotyp nevykazuje klasickou mendelistickou dominantní či recesivní dědičnost jako důsledek změn v jediném lokusu (tzv. jednolokusových)
- **predisponující „geny“** zvyšují pravděpodobnost onemocnění, ale nedeterminuje jednoznačně jeho přítomnost
  - je nutné spolupůsobení negenetických faktorů (**prostředí**)
    - dieta, fyzická aktivita, kouření, ...
  - a **interakcí genů** mezi sebou
- nejčastější komplexní nemoci
  - diabetes (1. i 2. typu)
  - dyslipidemie
  - esenciální hypertenze
  - alergie



glukóza (mmol/l)



krevní tlak (mmHg)

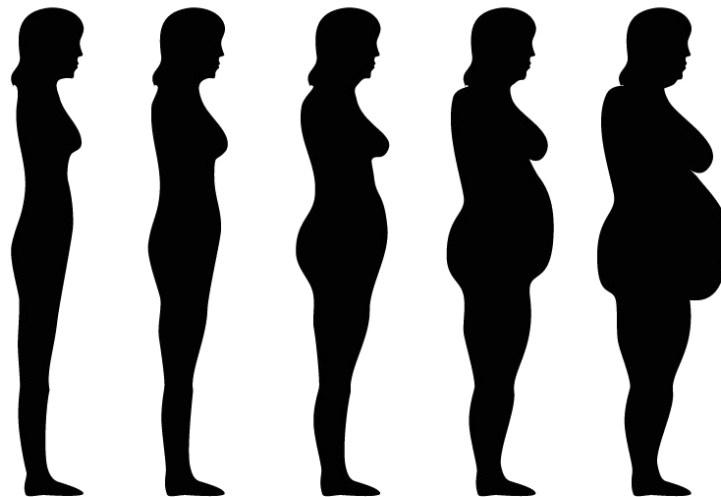


cholesterol (mmol/l)

# Komplexní nemoci

## Obezita - Hypotéza typu „thrifty genotype“

- V současné populaci jsou selektovány alely, které favorizují přírůstek váhy a skladování tuků, aby byl zajištěn dostatek živin pro častá období nedostatku potravy.
- Při konstantně vysoké nabídce potravy a poklesu fyzické aktivity tato predispozice vede k pandemii obezity v rozvinutých zemích.





	JEDNOLOKUSOVÉ NEMOCI	KOMPLEXNÍ NEMOCI
Závažnost		



# Obsah přednášky

- *Genetické studie a klinická genetika*
- *Genové terapie a farmakogenetika/genomika*

# 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.
- **Celogenomové asociační studie** (GWAS = Genome-Wide Association Study) vyhledávají polymorfismus jednotlivých nukleotidů nebo běžné genové variace, které se typicky chovají jako ukazatelé genových oblastí s malým efektem u stoupajícího rizika nemocí.
- 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 transmissi nemoci, je v principu možné použít obě metody.



# Genetické studie

## Kandidátní geny

- s intermediálním fenotypem
- s klinickou manifestací nemoci
- s klinickou závažností nemoci
- s odpovídavostí nemoci na léčbu

## Linkage (vazebná) analýza

- testuje kosegregaci genového markeru a fenotypu nemoci v rodině
- 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 např.:
  - klinické subtypy nemoci (studie case-case)
  - závažnost nemoci
  - časný začátek nemoci
  - rizikové faktory pro nemoc včetně pohlaví
  - vhodné biologické znaky (např. plasmatické hladiny cytokinů při asociaci genetických polymorfismů v cytokinových genech; studie genotyp-fenotyp).

# Klinická genetika

- zabývá se diagnostikou, léčením a prevencí genetických nemocí
- **genetické poradenství**
- **vrozené vady** - poruchy utváření orgánů, které vznikly v období nitroděložního života, i poruchy funkční (např. duševní opoždění) a poruchy na úrovni biochemické a molekulární (např. vrozené vady metabolismu)

Skupina	Příčina	Zastoupení
Primárně (geneticky)	chromozomální aberace	10 %
	monogenní dědičnost	20 %
Sekundárně (prostředí)	léky, infekce, záření	5 %
	porodní poranění	12 %
	infekce po narození	7 %
Neznámé (multifaktoriální)	geny + prostředí	46 %

# Klinická genetik

## Prenatální diagnostika

- zahrnuje vyšetřovací postupy směřující k vyhledávání statisticky významné odchylky ve struktuře nebo funkci, která přesahuje hranice fenotypové variability
- umožňuje v závažných případech ukončení gravidity, u dalších je možno v předstihu plánovat optimální perinatální péči.

## Rizikové faktory:

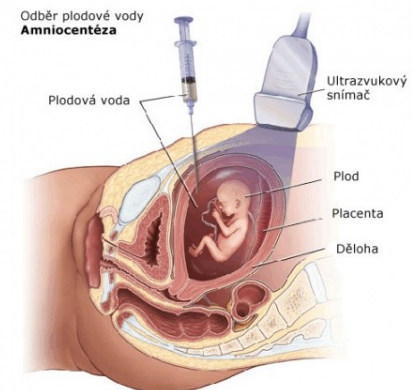
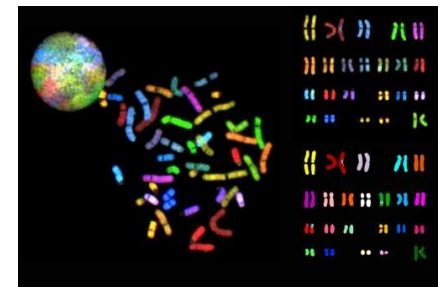
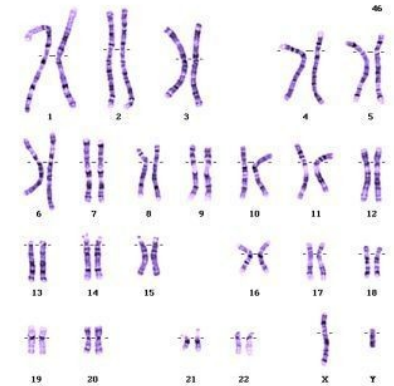
- věk matky v době porodu je vyšší jak 35 let nebo součet věku rodičů nad 70 let
- pozitivní biochemický screening z krve matky
- ultrazvukový nález, který zvyšuje riziko přítomnosti chromozomální aberace (nahromadění tekutiny v podkoží, nepřítomnost nosní kůstky, srdeční vada plodu aj.)
- přítomnost chromozomální aberace v rodině



# Klinická genetika

## Vyšetření karyotypu plodu

- invazivní metody - amniocentéza, biopsie choriových klků, kordocentéza
- genetické vyšetření, přesněji **vyšetření cytogenetické** (neboť se vyšetřují chromozomy), ovšem nejedná se o test DNA
- **FISH** - fluoresceční hybridizace in situ
  - vazba denaturované sDNA se specifickou sondou
- **AmnioPCR** je moderní metoda sloužící ke genetickému vyšetření plodu.
  - porovnání DNA markerů matky i plodu → stanovení počtu jednotlivých chromozomů u plodu.
  - výsledek je následně potvrzen klasickým cytogenetickým vyšetřením
  - k dispozici je v současné době vyšetření 21. chromozomu - amnioPCR, nebo sada vyšetřující chromozomy 13,18, 21, X a Y- tzv. multiamnioPCR.





# Klinická genetika

## Stanovení pohlaví plodu

- volné fetální DNA kolující v krvi matky
- neinvazivní s přesností ~98 %
- od 10. týdne těhotenství
- DNA plodu z venózní krve matky
- z klinického hlediska je určení pohlaví plodu důležité v případě rizika nějaké genetické choroby vázané na určité pohlaví (např. hemofilie)



## Preimplantační diagnostika

- metodu časně prenatalní diagnostiky, která je vázána na techniky umělého oplodnění, za účelem minimalizace chyby genetického vyšetření je třeba k oplozování vajíček použít metody intracytoplazmatické injekce spermie
- buňky pro genetické vyšetření jsou odebírány z embrya nejčastěji ve stadiu 8 buněk nebo blastocysty

## Postnatální diagnostika

- např. trombofilie, celiakie, cystická fibróza...



# Klinická genetik

## Celiakie

- celoživotní autoimunitní onemocnění způsobené nesnášenlivostí lepku (glutenu)
- lepek mění povrch sliznice tenkého střeva, mizí zde mikrokilky a klky, povrch tenkého střeva snižuje, s tím se zmenšuje jeho schopnost trávení a vstřebávání živin
- příznaky: průjem, plynatost, křeče, pokles hmotnosti nebo únava, anémie z nedostatku železa, zvracení, snížená chuť k jídlu, osteoporóza, zvýšená kazivost zubů, bolesti kloubů, deprese
- od dětství, nebo později - po zátěži (nemoc, těhotenství)
- bezlepková dieta

# Klinická genetik

## Celiakie

### Diagnostika

- stanovení autoprotilátek k tkáňové transglutamináze v krevním séru
- při pozitivním výsledku je indikována biopsie sliznice dvanáctníku u nemocného, který konzumuje stravu s obsahem lepku

### Cílený screening

- Pro osoby s rizikovými chorobami
- S podezřelými nebo nespecifickými symptomy
- S autoimunními chorobami asociovanými s celiakií (T1DM...)
- U příbuzných jedinců s celiakií



GHC GENETICS 1600Kč

- [http://medicinman.cz/?p=nemoci-sympt&p\\_sub=celiakie/f-dg](http://medicinman.cz/?p=nemoci-sympt&p_sub=celiakie/f-dg)

# Klinická genetika

## Celiakie

- AD s neúplnou penetrancí
- Genetické vyšetření predispozičních HLA alel II. třídy kódujících heterodimer DQ2 (DQA1\*0501/DQB1\*0201 nebo DQA1\*02:01/DQB1\*02:02) a heterodimer DQ8 (DQA1\*0301/DQB1\*0302)
- Heterodimer HLA-DQ2 se vyskytuje asi u 95 % pacientů s celiakií (jen ve 20 % u kontrolních osob).
- Riziko pro jednotlivce spojené s přítomností heterodimeru HLA-DQ2 je 50x zvýšeno oproti průměrnému riziku v populaci.
- Menšina pacientů, kteří jsou HLA-DQ2 negativní, bývají pozitivní na HLA-DQ8, často ještě ve spojení s alelou HLA-DRB1\*04.
- **Genetické vyšetření má vysokou negativní prediktivní hodnotu, nepřítomnost predispozičních alel DQ2/DQ8 téměř s jistotou (99%) vylučuje diagnózu celiakie.**
- Oproti sérologickému vyšetření protilátek vykazuje menší výskyt falešně negativních výsledků, zejména u dětí mladších 2 let a u pacientů na bezlepkové dietě.

# Metody léčby

## Symptomatická


- substituční terapie - dodání proteinu, který je v daném organismu defektní nebo zcela chybí (př. enzymopatie hemofilie - dodání faktoru VIII)
- karenční terapie - vyloučení nebo omezení složky potravy, která v důsledku defektu enzymu není odbourávána (př. fenylketonurie - potrava bez phe)

## Kauzální

- genová terapie - náhrada mutovaného, nefunkčního genu standardními, funkčními geny

# Genová terapie

- zahrnuje všechny postupy, které využívají přenosu genetického materiálu do buněk pacienta k léčebným účelům
- metodologie GT je uplatnitelná tam, kde je známa molekulární podstata nemoci
- vzhledem k tomu, že poznatků o patogenezi chorobných stavů na molekulární úrovni přibývá, rozšiřuje se i okruh indikací pro GT
- v nejbližších letech změní zásadním způsobem léčbu mnoha lidských nemocí




# Genová terapie

## Využití při léčbě

- vrozených chorob - korekce abnormality (nemoci monogenní i polygenní)
- i získaných chorob - jakákoliv manipulace s DNA, která příznivě ovlivní průběh nemoci (zhoubné nádory, léčba kardiovaskulárních a metabolických chorob, degenerativních nervových onemocnění, AIDS, v transplantační medicína

## Principy

- nahrazení nefčného genu fčným (homologní rekombinace)
- oprava nefčného genu (cílené mutace)
- přenesení nového genu (terapeutický gen)



# Genová terapie


Co je třeba znát před začátkem genové terapie?

- kompletní informace o defektním genu - umístění, mechanismus patologického účinku
- znalost přesné sekvence zdravého genu
- volba vhodného vektoru, vytipování cílových buněk
- souhlas pacienta



# Genová terapie

- opravu, vložení, vyřazení genu lze provádět *in vivo*, *in vitro* a nejč. *ex vivo*
- odběr bb. z pacienta -> kultivace *in vitro* -> modifikace DNA -> selekce -> proliferace selektovaných bb. -> přenos zpět do pacienta
- geny lze do genomu začlenit v časně embryogenezi (léčba v zárodečné linii)
- gen může být začleněn pouze do somatických bb., které jsou nejvíce poškozené (v tomto případě se geneticky opravená DNA nepředává následujícím generacím potomků)



# Genová terapie

## Postup při genové terapii

- vytvoření genetické informace určené pro transport do buněk
- vytipování cílových buněk (provedení *in vivo* x *in vitro* / *ex vivo*)
- vpravení vektoru (vektory = nosiče pro vpravení genetické informace do cílových buněk)

## Vlastnosti ideálního vektoru

- průnik do velkého počtu cílových buněk
- přenos genu v transkripčně aktivním stavu
- netoxický pro cílové buňky
  
- plazmidy, virové částice

# Genová terapie

## Virové vektory

- interakce s receptory na povrchu cílových buněk
- vybavení regulačními elementy zajišťujícími účinnou expresi transgenů
- integrace transgenů do buněčného genomu
- náročnější příprava (mimo jiné se musí se zbavit všech virových genů, aby nebyly infekční)
- malý rozměr částic
- vyšší biologická rizika (hrozí nebezpečí rekombinace a vzniku viru schopných replikace)
- nejčastěji používané virové vektory - retroviry (dělící se bb.), adenoviry (začlenění se i do nedělících se bb.), poxviry, adeno-asociované viry (AAV) a herpetické viry



# Genová terapie

## Genová terapie nádorových onemocnění

### 1. zvýšení účinnosti přirozených obranných mechanismů

- stimulace specifických tumor infiltrujících lymfocytů (TIL):
  - izolace TIL z primárního tumoru → kultivace TIL *in vitro* → aktivace TIL iL-2 → přenos TIL do pacienta (autologní přenos) → TIL zničí tumor
- začlenění genů pro-tumor asociované antigeny, IL-2, interferon

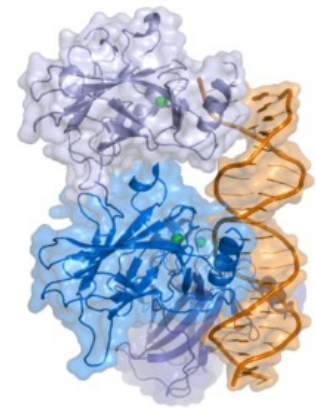
### 2. přenos vražedných nebo sebevražedných genů

- TIL obsahující vražedný gen (např. gen pro TNF)

### 3. protinádorové vakcíny

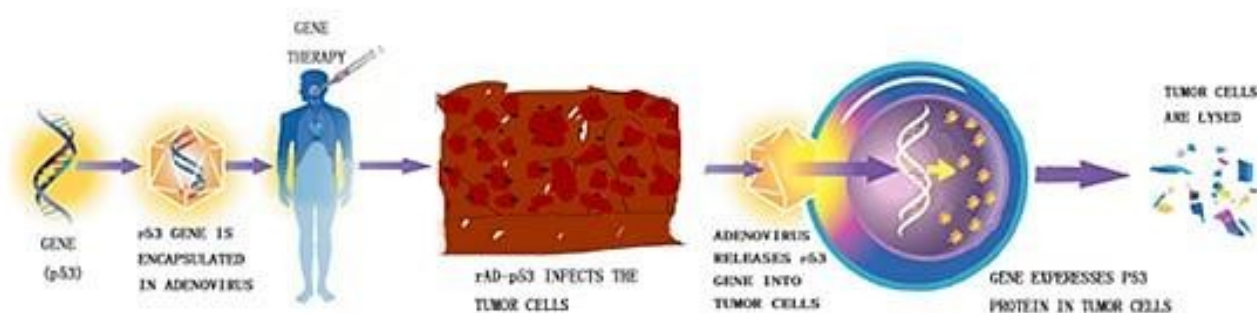
- nádory mají vyvolávat imunitní reakci
- reakci je možno podpořit imunizací tumor specifickými peptidy
- v případě, že nádor neexprimuje HLA, je možné přenést do bb. DNA kódující tento antigen, a tím vyvolat imunitní reakci
- je také možné vytvořit hybridní rekombinantní molekulu - tvořena epitopem nádoru spojeným s velmi antigenním epitopem

# Genová terapie



## GENDICINE

- dostupný od r. 2004
- povolen v Číně pro léčbu dlaždicobuněčného karcinomu (head and neck squamous cell carcinoma)
- virové částice (adenovirus) v injekční formě s genem p53
- injekce 1 týdně (po 8 týdnech kompletní remise u 64 % pacientů a u 32 % částečná regrese)



# Genová terapie

## DM 1. typu

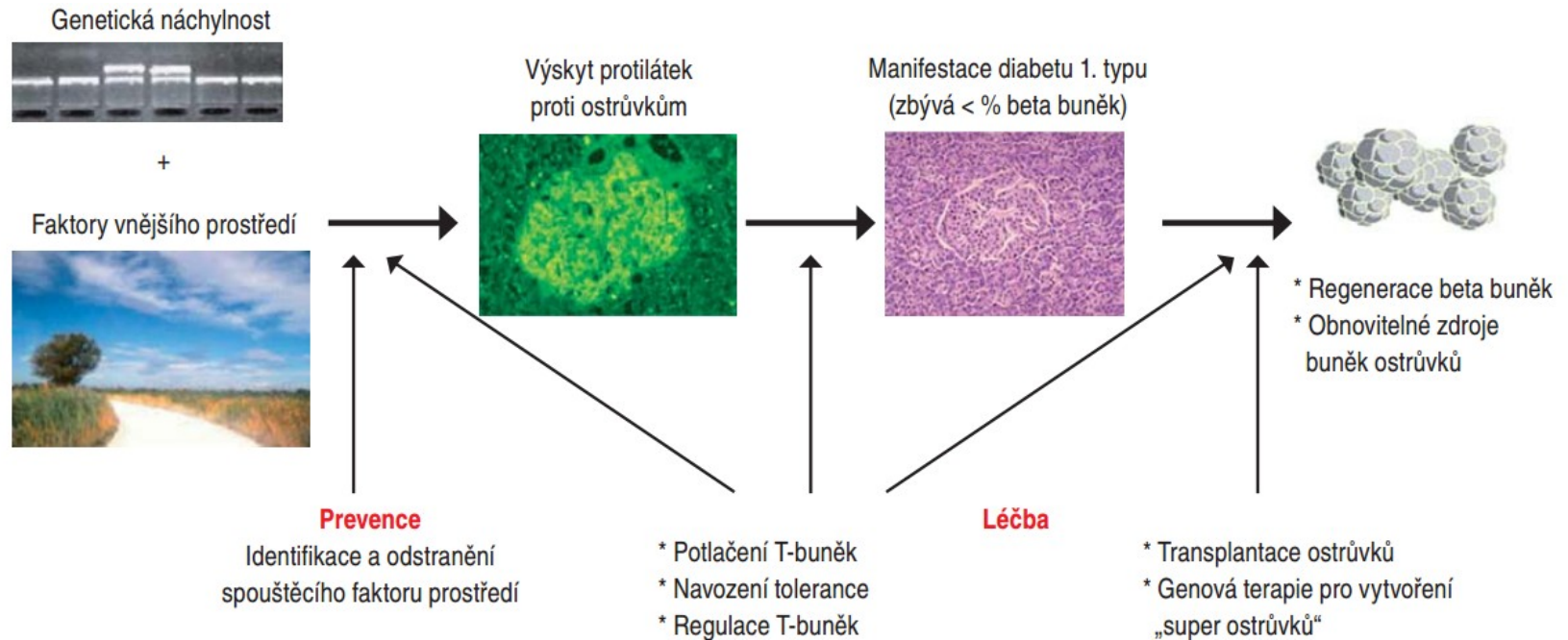
- vnesení genu pro inzulin do jader některých buněk => produkce inzulinu přímo v lidském organismu (testováno na myších)
- možnost získání většího množství buněk produkujících inzulin je důležitým tématem nejen jako zdroj materiálu pro transplantace ostrůvků, ale především jako lákavá možnost přímé kauzální léčby diabetu nahrazením buněk autoimunitním procesem již zničených.
- Probíhají experimenty s diferenciací nových beta buněk z různých pankreatických tkání po jejich dediferenciaci, z multipotentních pankreatických prekurzorů i cíleným množением beta buněk již nějakou cestou regenerovaných

# Genová terapie

## DM 1. typu

- kmenové buňky, ať již embryonální nebo dospělé, nabízejí další potenciální zdroj pro diferenciaci beta buněk
- při použití dospělých kmenových buněk z jiných linií by navíc nedocházelo k autorejekcím, protože by mohly být použity přímo autologní kmenové buňky pacienta. Podobná strategie léčby je založena na přeměně jiných somatických buněk na buňky produkující inzulin, jmenovitě hepatocytů po vložení genu pro inzulin pod kontrolou promotorového genu pro myši inzulin
- buňky ostrůvků se sníženou imunogenicitou, pocházející z transgenních prasat, jsou připravovány k prvním klinickým testům u lidí jako další možnost
- technické obtíží - při trvale probíhající autoimunitní reakci bez vhodné imunomodulace
- cíl: produkce buněk méně imunoreaktivních a nějakým způsobem provedenou blokádu autoreaktivních T lymfocytů

# Genová terapie

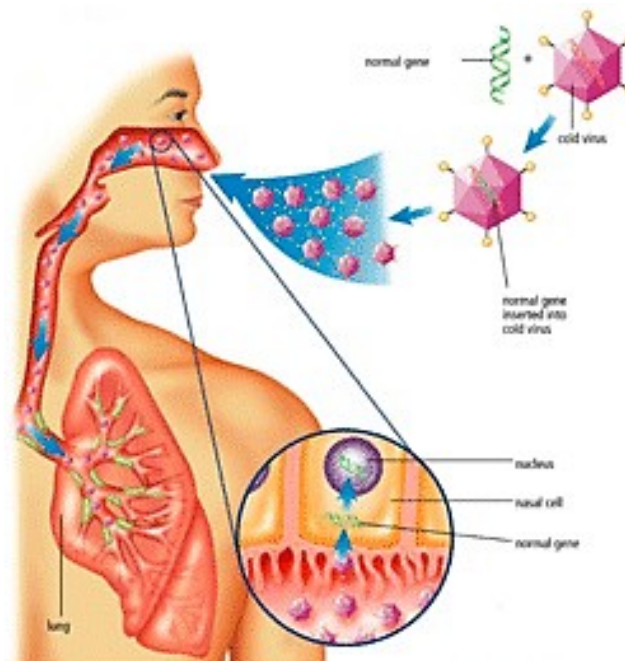




# Genová terapie

## Cystická fibróza

- genová terapie v prenatálním období



Gene therapy could deliver a working gene into a CF patient's cells.


(courtesy of BC Science 9, © McGraw-Hill Ryerson Limited, 2008.)

# Genová terapie



## Nevýhody genové terapie

- vysoká finanční náročnost
- technická a technologická náročnost
- problémy s uchycením vnášené genetické informace => nízká úspěšnost
- nebezpečí spuštění maligních procesů
- etické problémy - léčebná terapie x cílené ovlivňování genotypu lidí (tzv. superlidé)




# Farmakogenetika a farmakogenomika

## Farmakogenetika

- zabývá se hledáním vztahu mezi metabolismem, případně efektivitou léčiva a přítomností jednotlivých genetických variant (polymorfismů) genů, které se na absorpci, distribuci, metabolismu, eliminaci podílejí

## Farmakogenomika

- zkoumá vztah účinku léku na úrovni celého genomu, resp. transkriptomu
- screening známých genových polymorfismů
- účelná farmakoterapie, minimální nežádoucí účinky



# Farmakogenetika a farmakogenomika

## Farmakogenetika

- pro určení, který dostupný lék bude mít u konkrétního pacienta největší terapeutický benefit, zatímco nežádoucí účinky budou minimální.
- volba nejefektivnější a nejbezpečnější způsobu léčby

## Farmakogenomiky

- identifikace a genetické určení tzv. „drug targets“ (cílových struktur léčiva)
- stanovení genetických polymorfismů, které mohou tyto cílové struktury pozměňovat i polymorfismů asociovaných s rozvojem choroby a lékovou odpovědí
- vývoj účinnějšího léčiva s menším počtem nežádoucích účinků

# Farmakogenetika a farmakogenomika

## Kandidátní geny

- enzymy lékového metabolismu
- membránové transportní přenašeče
- receptorové proteiny
- proteiny iontových kanálů



# Proteiny iontových kanálů

- geny kódující proteiny Na a K iontových kanálů (geny skupiny LQTS)
- nalezeno v nich bylo přinejmenším 35 SNPs
- některé nalezené polymorfismy vedou k dramatické redukci hustoty kanálů nebo ke změně jejich elektrofyziologie, tj. ke změnám v aktivaci, inaktivaci a regeneraci kanálu
- tyto mutantní změny pak mohou vyústit až v patologickou arytmií
- mutace v genu pro Na kanál a souvislosti s rozdílnou odpovědí pacientů na antikonvulziva, rovněž jako s dědičnou dispozií k epilepsii (sledovány jsou především oblasti vazebných domén)

# Farmakogenetika

## Protinádorová terapie

### Azathioprin

- je antimetabolit purinových bází, který se používá při léčbě hematoonkologických onemocnění u dětí, k terapii autoimunitních onemocnění nebo střevních zánětů u pacientů rezistentních k jiné léčbě
- pro odbourávání je zásadní enzym thiopurinmethyltransferáza (TPMT)
- u evropského obyvatelstva je TPMT polymorfní, s výskytem přibližně 11 % jedinců, kteří mají jednu funkčně deficitní alelu v genomu → snížení katalytické aktivity enzymu → myelotoxicita po podání azathioprinu
- analýza genotypu TPMT je před zahájením podávání azathioprinu doporučována zejména u dětských pacientů s akutní lymfoblastickou leukemií, protože v případě deficitu TPMT je u pacientů nutné z důvodu toxicity odložit cyklus chemoterapie a tudíž je u nich potom horší prognóza

# Farmakogenetika a farmakogenomika

## Výhody individualizace farmakoterapie

- maximální účinnost léčby (efektivita farmakoterapie i z hlediska finančního pohledu)
- minimální nežádoucí účinky léčby (ochrana zdraví a prevence závažných komplikací)

## Limity

- nezbytnou předchozí identifikací významných genových polymorfismů na základě dlouhodobých klinických výzkumů
- Variabilita lékové odpovědi není obvykle dána jen variabilitou jednoho genu (monogenní variabilita) ale variabilitou mnoha genů (multigenní variabilita), neboť do odpovědi organismu na léčivo je zapojeno mnoho genů a tedy i mnoho genových polymorfismů. Všechno dohromady to pak vytváří „**individuální lékovou odpověď**“
- negenetické faktory, tj. faktory vnějšího prostředí znemožňuje předpovědět účinnost nebo bezpečnost léčiva **POUZE** na základě farmakogenetické informace. Genotyp sice není citlivý na vnější faktory, ovšem interakce drug-drug (léčivo s léčivem) a léková odpověď pacienta mohou být těmito vnějšími faktory ovlivněny.
- geneticky podmíněné rozdíly nejsou jen mezi jednotlivými osobami, ale i mezi celými populacemi





# Whither Gene Therapy?

Success has been mingled with failure;  
a few technical modifications could make  
the method safer

