

# Farmakogenetika

3. 12. 2004

Julie Vašků



# Cíl

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

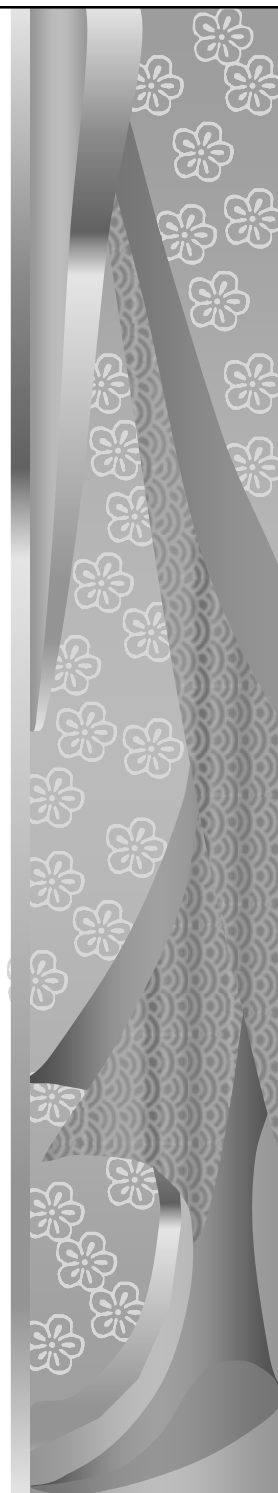
■ **Farmakogenomika**

■ **Farmakodynamika:** popisuje žádoucí či nežádoucí účinky léků na organismus

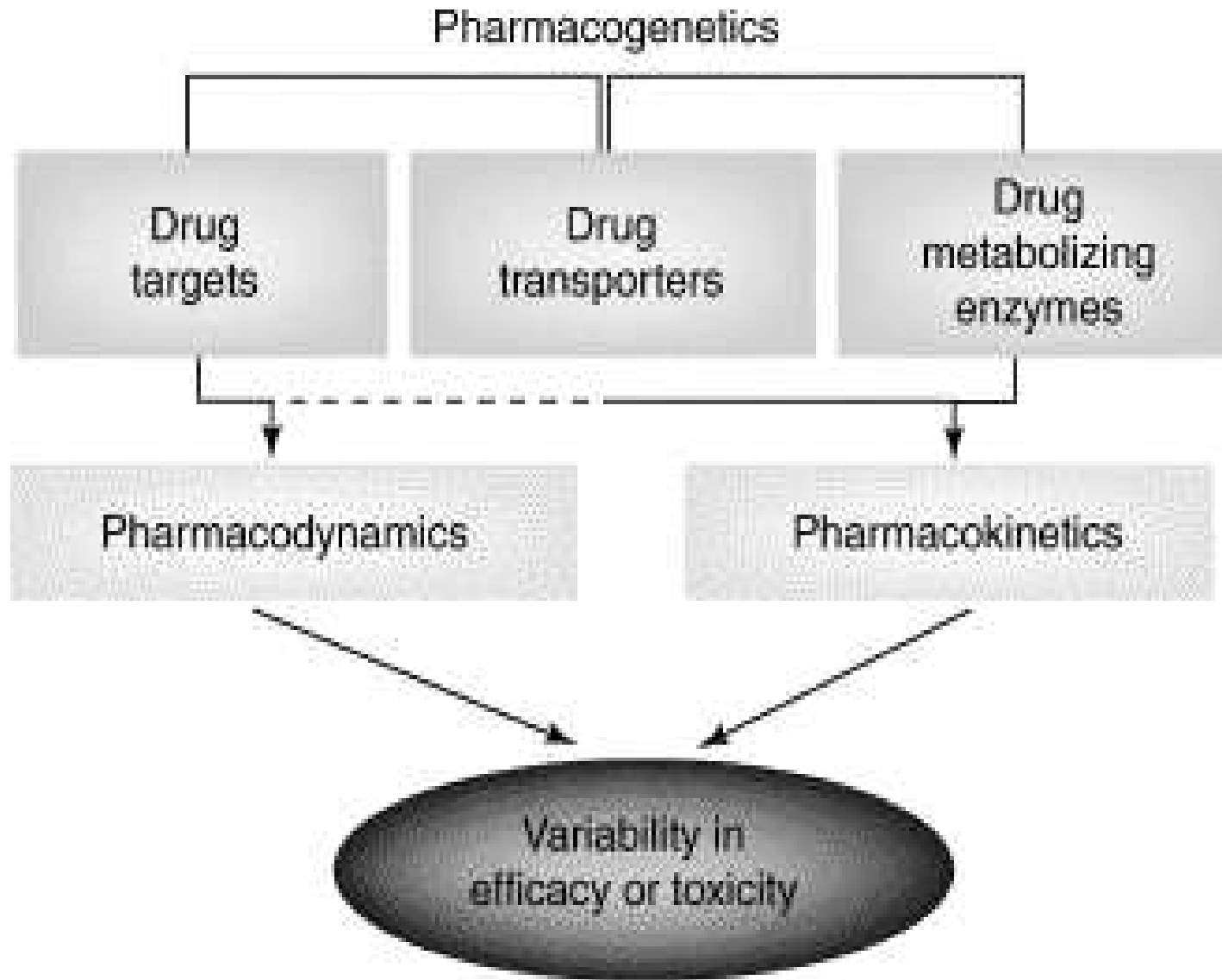
(lék → organismus)

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

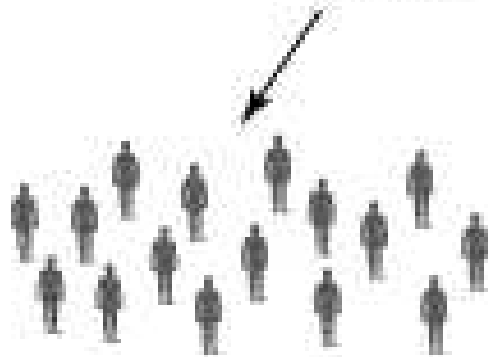
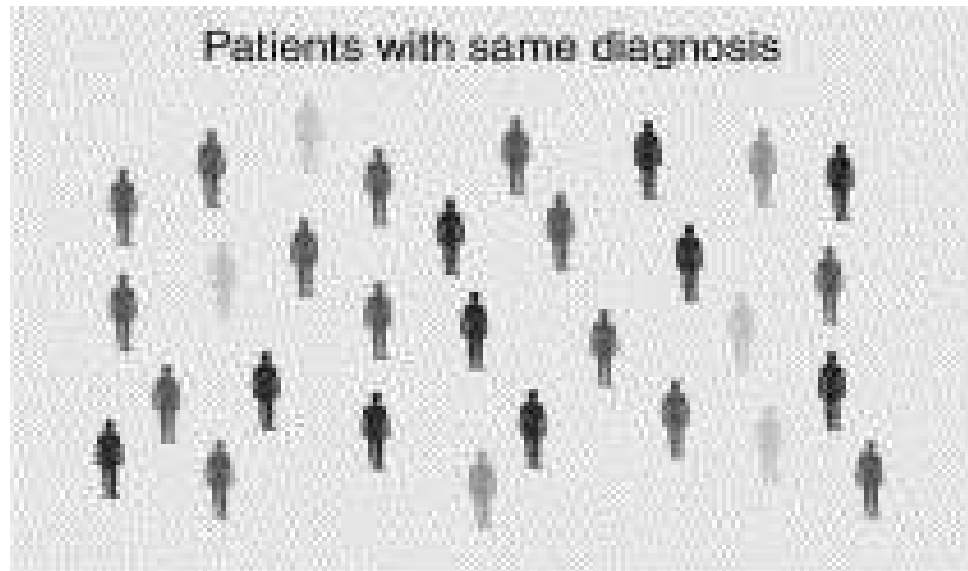
(organismus → lék)



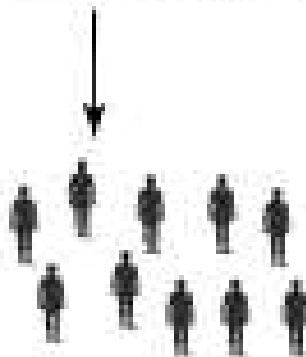
# Klíčové složky farmakogenetiky



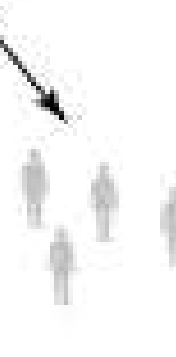
# Klinický potenciál farmakogenetiky



Predicted good  
response to  
tested drug

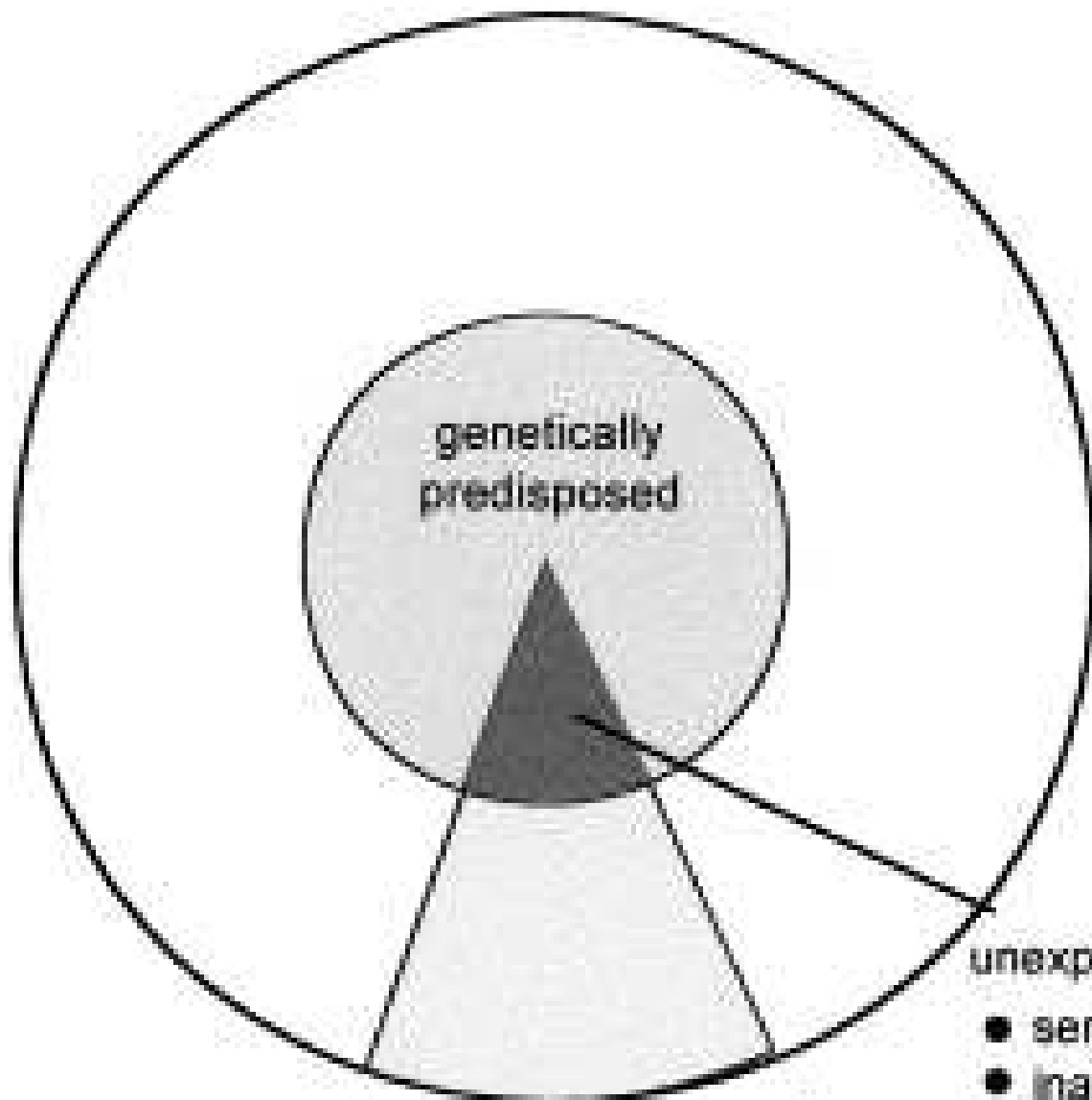


Predicted poor  
or non response  
**Use different drug**



Predicted increased  
toxicity risk  
**Decrease dose or  
use different drug**

*TRENDS in Genetics*



genetically predisposed

Patients under drug treatment

- unexpected outcome:
- serious side effects
  - inadequate response



# Farmakodynamika

## ■ Efekt kompetitivní

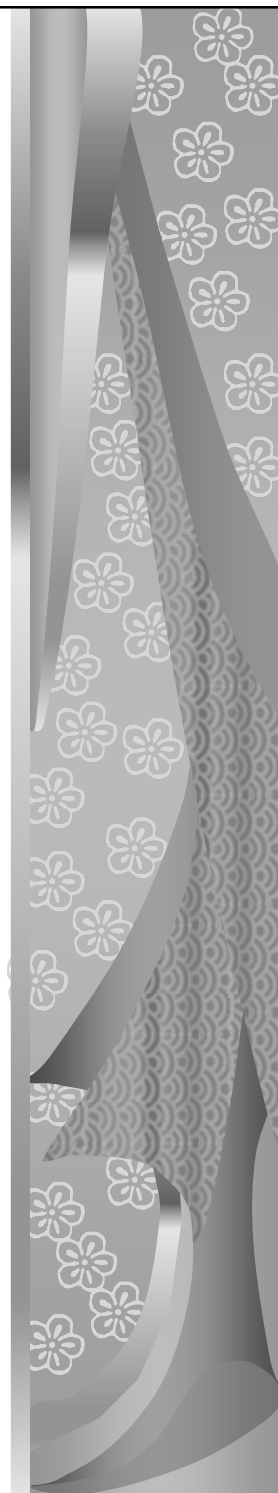
(guanetidin + efedrin)

## ■ Efekt aditivní

(IMAO a tricyklická antidepresiva)

## ■ Efekt antagonistický

(salbutamol + betablokátory)



# Farmokodynamika 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)



# Rizikovní pacienti z hlediska léčby

Astma

Kardiopathie

Diabetes

Epilepsie

Glaukom

Hepatopatie

Nefropatie

Digitalizace

Psychotropní látky v abúzu



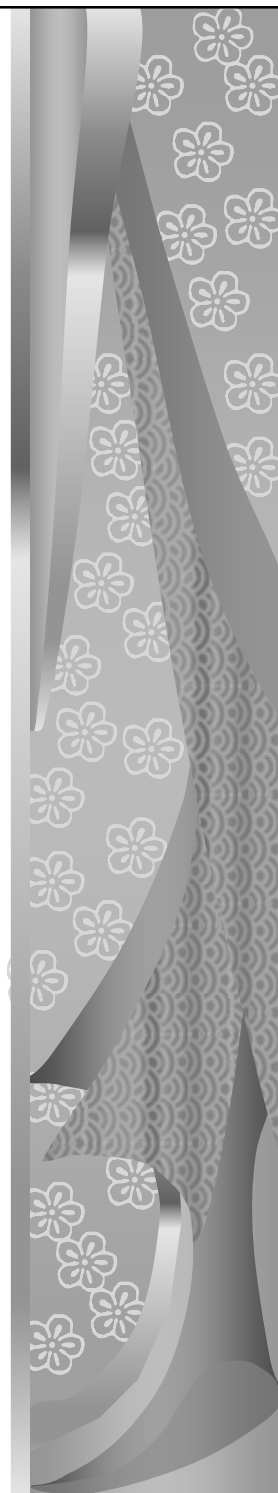
# Farmakogenetika a vývoj léků

- 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



# Příklady receptorů signálních molekul

## ■ *G-protein coupled receptors:*

■  $\beta$ -1 a  $\beta$ -2 adrenergní receptory

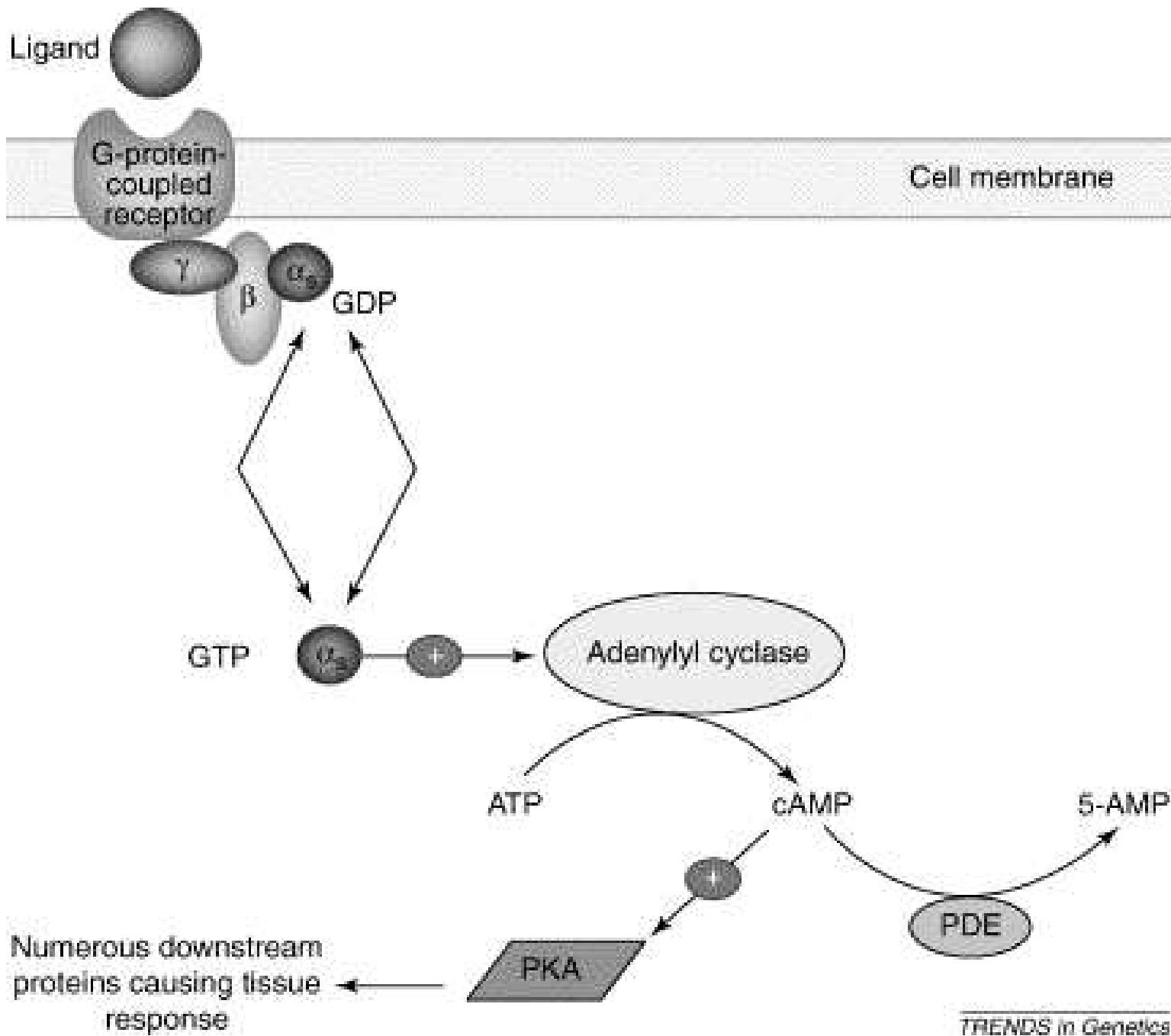
■ Receptor pro cholecystokinin 2 (CCK2)

■ mí opioidní receptor

■ U těchto receptorů byly prokázány polymorfismy, které ovlivňují afinitu ligandu. Je tedy možno navrhovat podle potřeb takové ligandy, které respektují (individuální terapie) nebo naopak nerespektují (univerzální použití léku) tuto variabilitu.

■ Je také možno navrhovat takové ligandy, které se vážou pouze na mutované varianty genů a inaktivují je (genová terapie)





## Klinicky relevantní genetické polymorfismy ve vztahu k účinnosti léků

Disease	Treatment	Comment	Reference
M3 AML	all <i>trans</i> retinoic acid	Patients with PLZF/RARA fusion are not responsive to retinoids.	[4]
Glioma	carbamustine, BCNU	Only tumors with CpG methylation of the promoter of the O <sup>6</sup> -methylguanine-DNA-methyltransferase gene respond to treatment with alkylating substances.	[22]
Asthma	5-lipoxygenase inhibitors	ALOX5 promoter genotype influences response to treatment; individuals with two non-wild type alleles show no response to 5-LOH inhibitors.	[23]
	$\beta_2$ adrenergic agents	Gly16 allele of $\beta_2$ adrenergic receptor is associated with much stronger bronchodilator desensitisation than Arg16.	[24]
Depression	imipramine	Fast metabolisers do not reach therapeutic drug levels with normal dosage.	[19]

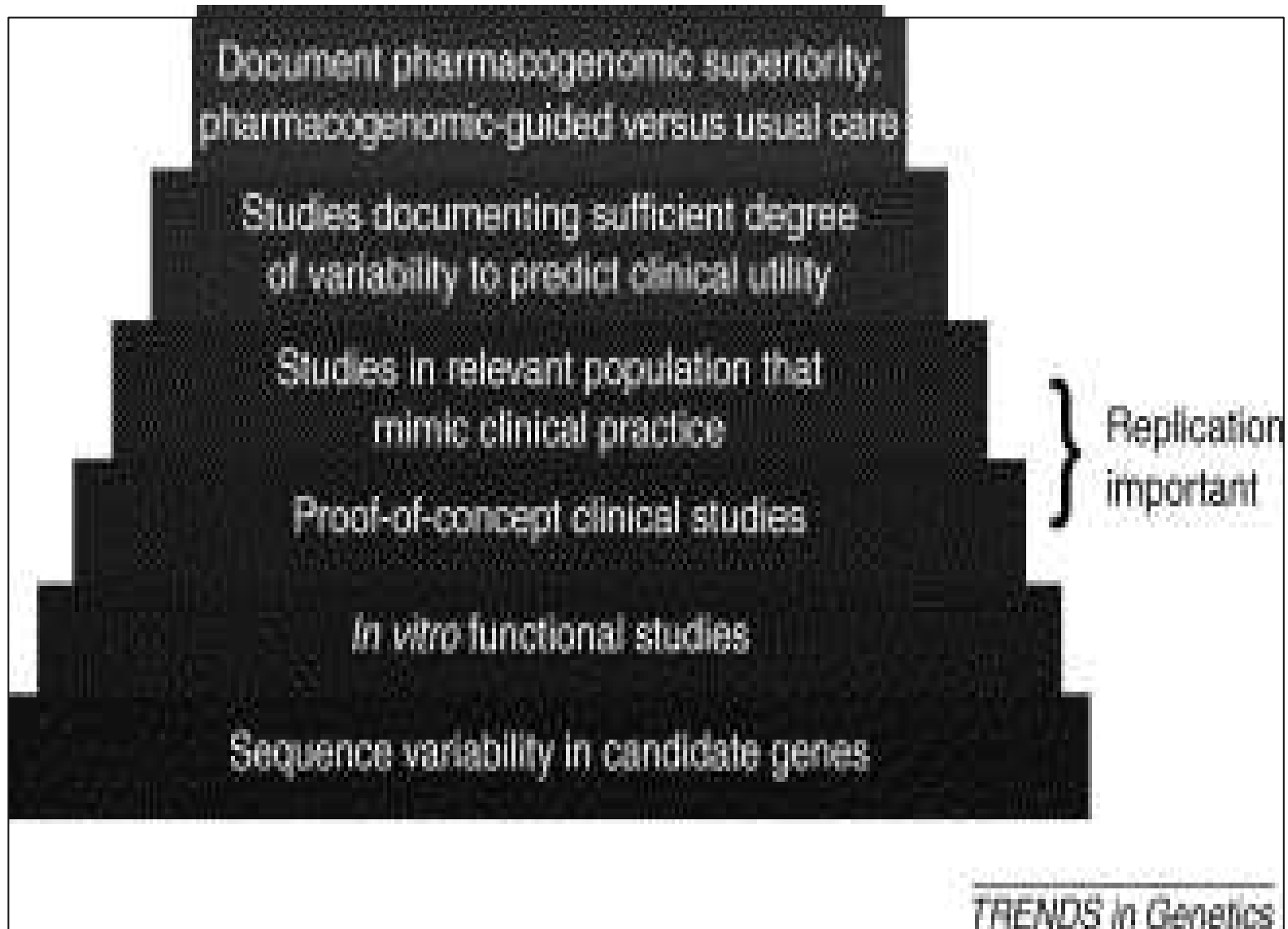
## Klinicky relevantní genetické polymorfismy ve vztahu k vedlejším účinkům léků

Gene <sup>a</sup>	Polymorphisms	Minor allele frequency <sup>b</sup>	Drug(s)	Genetic association	Refs
<b>Drug metabolizing enzymes</b>					
<i>TPMT</i>	Multiple	0.3% of Caucasian population carry two nonfunctional alleles	Thiopurines	Hematological toxicities	[19–22]
<i>CYP2D6</i>	Multiple	1–2% of Asians and African descent and 6–8% of Caucasians carry two nonfunctional alleles	Numerous cardiovascular drugs, antidepressants, antipsychotics, Codeine	Enhanced drug effect and increased toxicity	[19,23–25]
<i>CYP2C9</i>	*2 (Arg144Cys)	0.02–0.10	Warfarin	Decreased drug efficacy, Increased bleeding risk, decreased dose requirements	[26,27] [28–30]
	*3 (Ile359Leu)	0.02–0.08			
<b>Drug Transporter</b>					
<i>ABCB1</i>	3435C → T (Ile1145Ile)	0.10–0.50	Numerous, including anticonvulsants, protease inhibitors, digoxin and others	Differences in plasma drug concentration and efficacy	[3,31–34]
<b>Drug-targets or pharmacological response proteins</b>					
<i>ADRB1</i>	Ser49Gly	0.15–0.30	β-blockers	Blood pressure lowering by β-blockers	[35,36]
<i>ADRB2</i>	Arg389Gly Arg16Gly	0.25–0.47 0.41–0.54	β agonists	Bronchodilation and cardiovascular responses to β-agonists	[37,38]
<i>DRD3</i>	Gln27Gln Ser9Gly	0.07–0.35 0.30–0.70	Antipsychotics	Differential antipsychotic efficacy, antipsychotic-induced tardive dyskinesia and acute akathisia	[39–41]
<i>ADD1</i>	Gly460Trp	0.06–0.60	Diuretics	Differential antihypertensive response and differences in degree of reduction in risk for myocardial infarction and stroke in hypertensives	[42–44]
<i>GNB3</i>	C825T (creates splice variant)	0.32–0.76	Diuretics, antidepressants	Differential drug efficacy	[45,46]
<i>APOE</i>	ε2 Cys130 and Cys176 ε3 Cys130 and Arg176 ε4 Arg130 and Arg176	0.04–0.16 0.60–0.85 0.09–0.25	Tacrine, statins	Differential drug efficacy	[47–49]
<i>F5</i>	Arg506Gln (Factor V Leiden)	Absent to 0.04	Estrogen, oral contraceptives	Increased venous thromboembolism risk	[50,51]





# Pohyb farmakogenetiky směrem ke klinické praxi

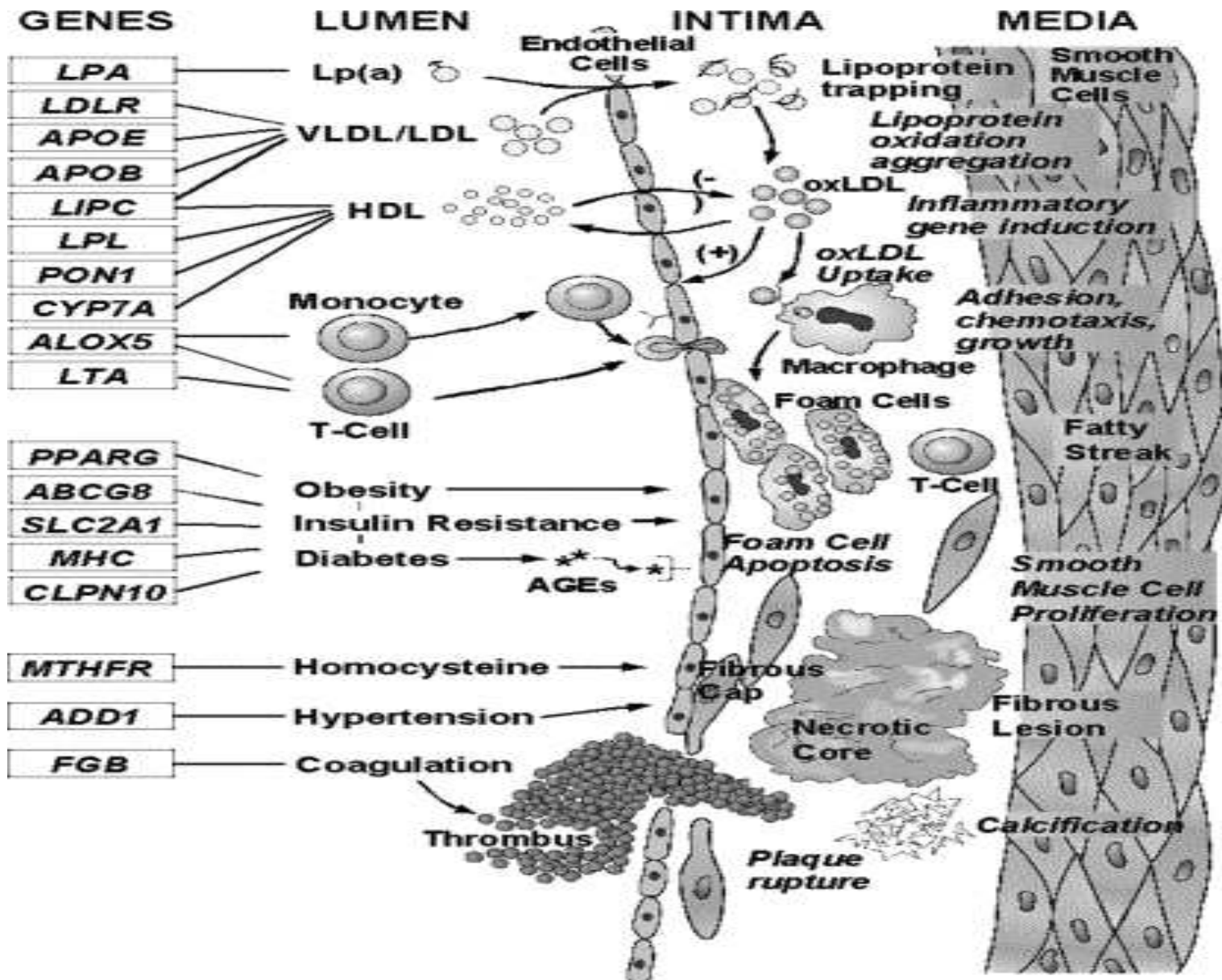


## Hodnocení významu genetických faktorů u multigenních nemocí- 10 otázek

- Jak důležité jsou genetické vlivy i nejčastějších forem multigenních nemocí?
- Jaký je vliv prostředí na vznik nemoci?
- Které jsou nejslibnější přístupy k determinaci genetických faktorů pro nemoc?
- Které geny již byly vybrány jako vnímavé?
- Které cesty přispívají ke genetické vnímavosti pro danou nemoc?
- Jak mnoho genů se podílí na vnímavosti k nemoci?
- Jsou nejčastější formy multigenní nemoci asociovány s častou nebo vzácnou genetickou variabilitou v populaci? (hypotéza častá variace/častá nemoc vs. genetický heterogenní model)
- Proč alely, které jsou asociovány s nemocí, nebyly z populace eliminovány?
- Jako důležité jsou pro danou nemoc interakce geny-prostředí a geny-geny?
- Jaké jsou důsledky pro farmakogenetiku?



# Geny přispívající k vnímavosti ke kardiovaskulárním nemocem



## Genetické a environmentální rizikové faktory pro nemoc koronárních tepen

---

Risk factors with a significant genetic component (heritability<sup>2</sup>)

Myocardial infarction (25%–60%)

Total cholesterol (40%–60%)

High-density lipoprotein cholesterol (45%–75%)

Total triglycerides (40%–80%)

Body mass index (25%–60%)

Systolic blood pressure (50%–70%)

Diastolic blood pressure (50%–65%)

Lipoprotein [a] levels (90%)

Homocysteine levels (45%)

Type 2 diabetes (40%–80%)

Fibrinogen (20%–50%)

C-reactive protein

Gender

Age

Environmental risk factors

Smoking

Diet

Exercise

Infection

Fetal environment

---



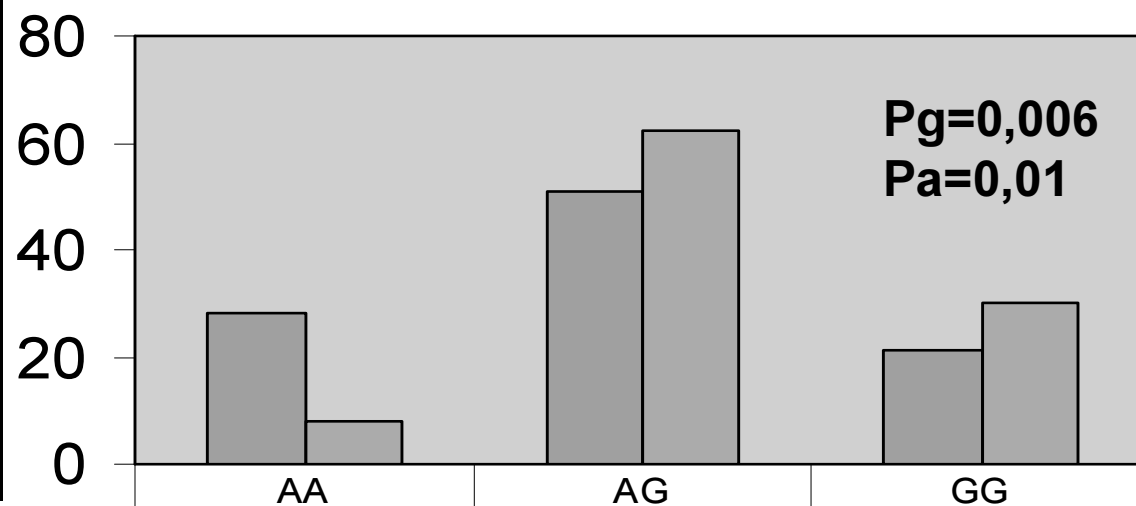
# Kandidátní geny - asociace

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



# Zdraví čeští dobrovolníci středního věku (41-50 let) Polymorfismus -596 A/G v genu pro IL-6

## Srdeční frekvence



Osoby s HR < 78/min (99)

AA

AG

GG

Subjekty s HR > 78/min (71)

8

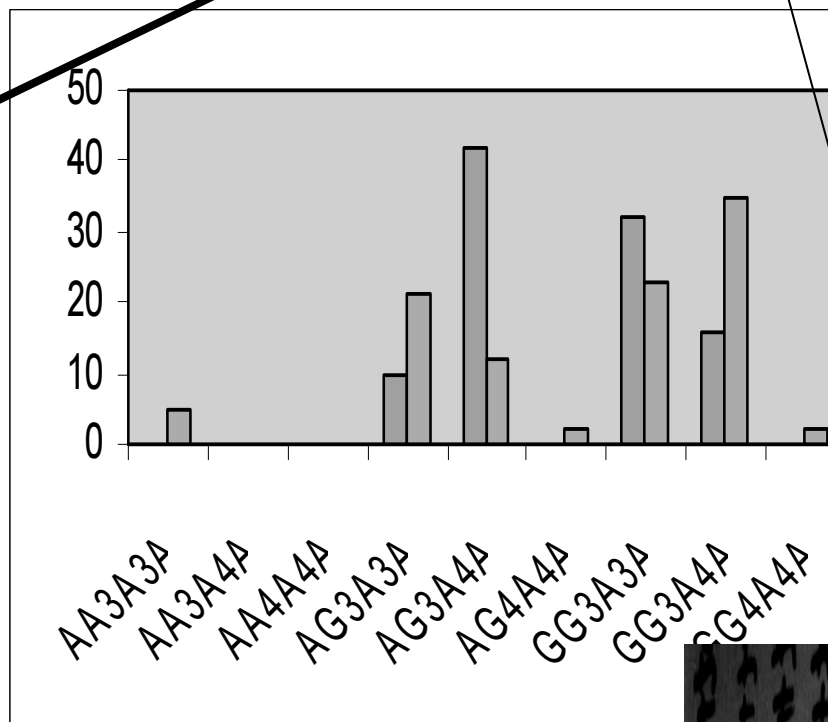
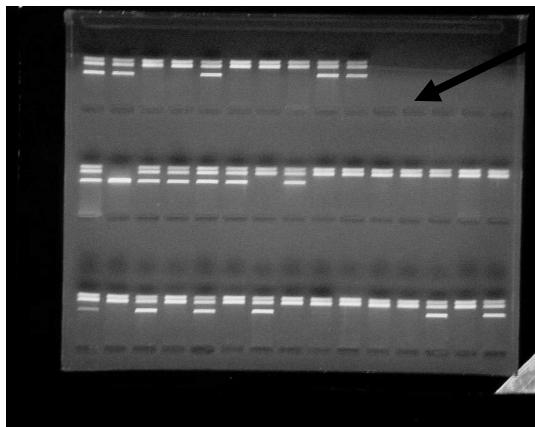
62

30

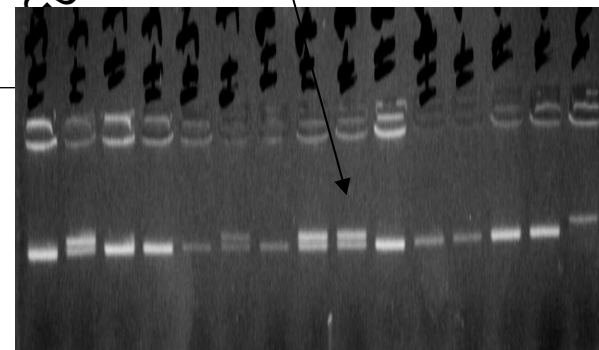
■ Osoby s HR < 78/min (99) ■ Subjekty s HR > 78/min (71)

**Genotypy AG+GG uvedeného polymorfismu jsou častější u jedinců s vyšší srdeční frekvencí (OR=4,27, 95% KI 1,66-10,98, P=0,0009).**  
*Vašků A et al. Physiol Res 2003*

# Chronické srdeční selhání Asociovaný genotyp 8002 G/A a -3A/-4A EDN-1 Big endotelin



■ Big endotelin < 0,7 pmol/L (19)  
■ Big endotelin > 0,7 pmol/L (84)



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

**OR = 5,38;**

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

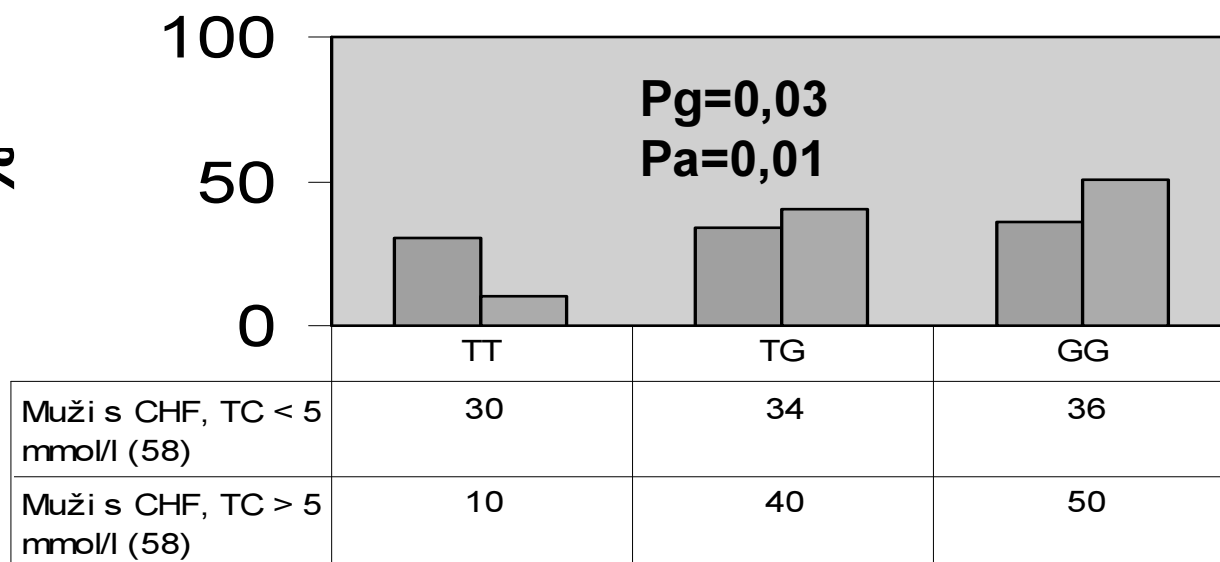
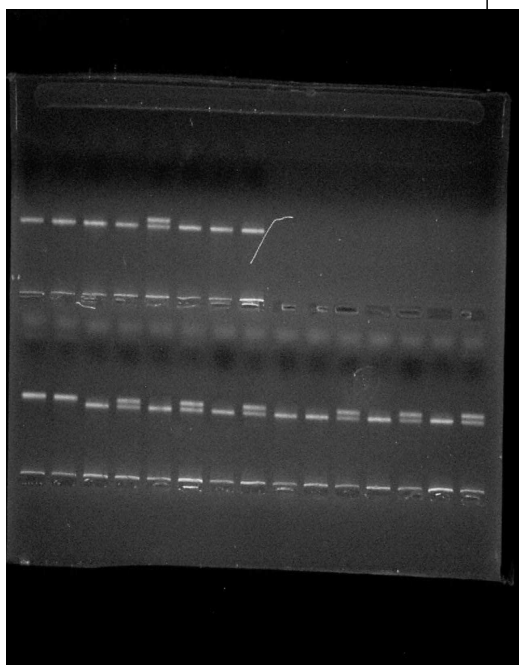
**P= 0,005**

**Vašků A et al. Experimental and Molecular Pathology 73: 230-233, 2002**

# Chronické srdeční selhání

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

### Celkový cholesterol



- Muži s CHF, TC < 5 mmol/l (58)
- Muži s CHF, TC > 5 mmol/l (58)

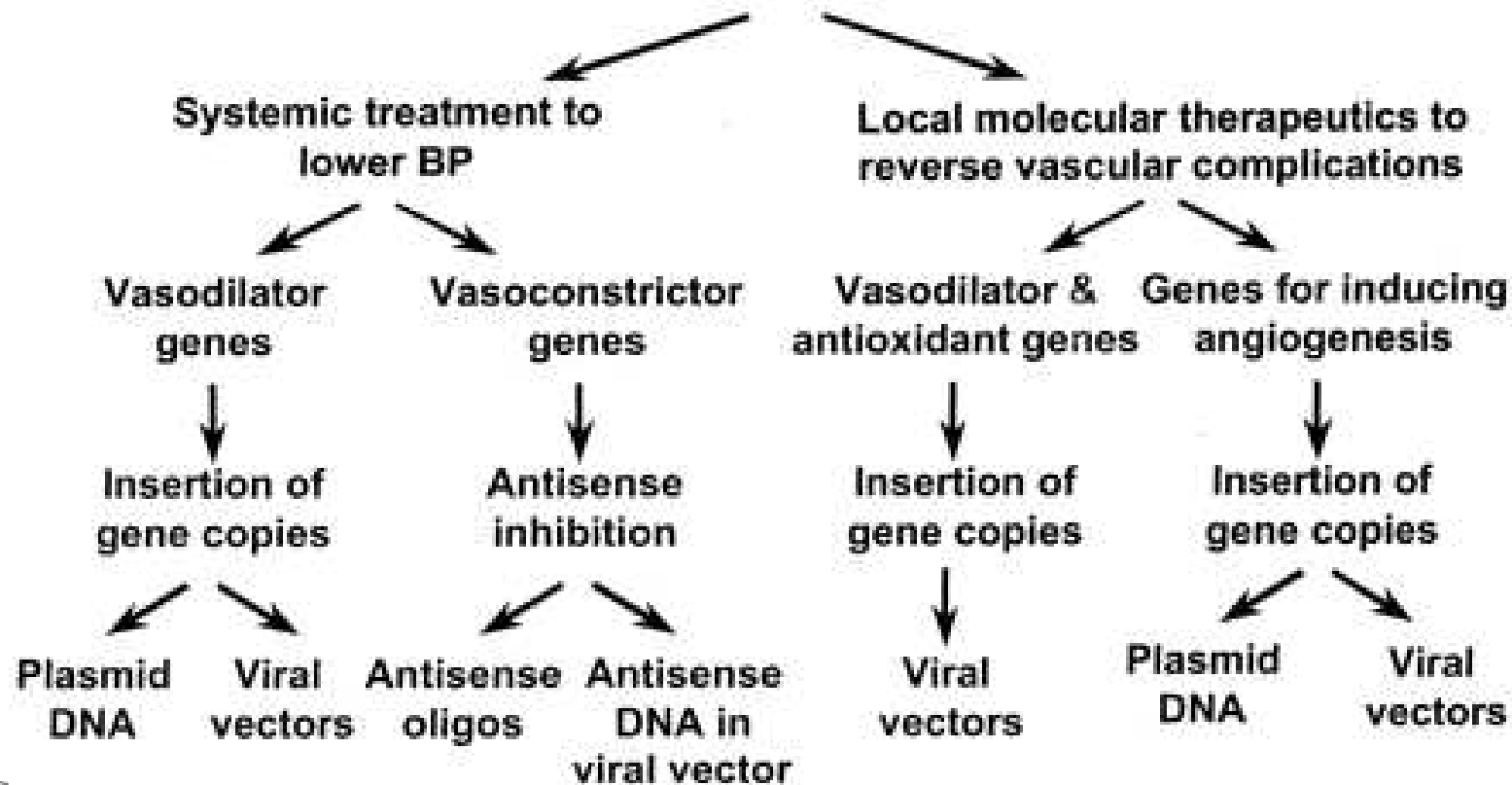
**Genotypy TG + GG přinášejí 3,59x vyšší OR pro muže s CHF a vyšší hladinou celkového cholesterolu: OR=3,59; 95% KI 1,30-9,93; P=0,009**

***Vašků A et al. Clin Chem Lab Med 41:1299-1304, 2003***



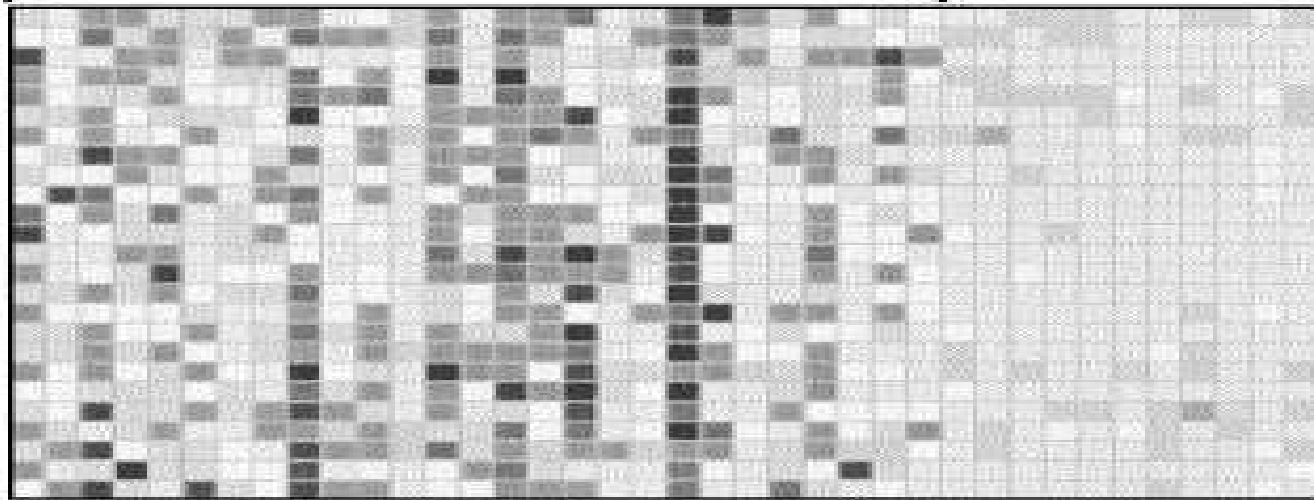
# GENOVÁ TERAPIE U KARDIOVASKULÁRNÍCH CHOROBY

## GENE THERAPY FOR HYPERTENSION AND ITS VASCULAR COMPLICATIONS

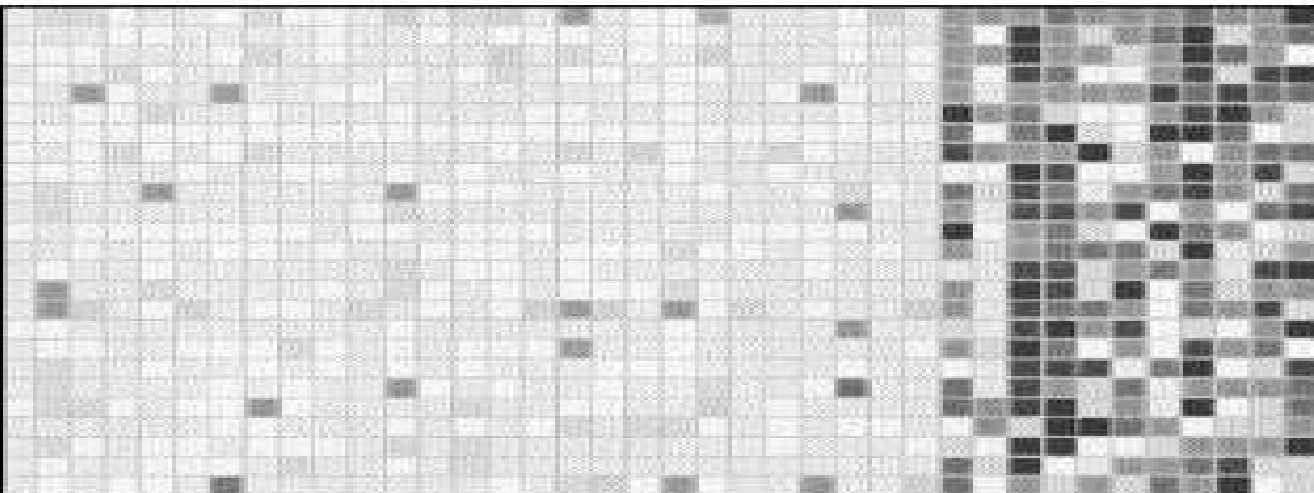


# Geny odlišující ALL od AML

**B** ALL AML



- C-myc (U22376)
- Proteasome Iota (X59417)
- MB-1 (U05239)
- Cyclin D3 (M692287)
- Myosin light chain (M31211)
- RhAp48 (X74262)
- SNF2 (D26156)
- Hkr1-1 (S50223)
- E2A (M31523)
- Inducible protein 1 (L47738)
- Dynein light chain (U32944)
- Topoisomerase II  $\beta$  (Z15115)
- IRF2 (X15949)
- TFF1 $\beta$  (X63469)
- Acyl-Coenzyme A dehydrogenase (M91432)
- SNF2 (U29175)
- (Ca<sup>2+</sup>)-ATPase (Z69881)
- SRP9 (U20998)
- MCM3 (D38073)
- Deoxyhypusine synthase (U26266)
- Cp 18 (M31305)
- Rabaptin-5 (Y08612)
- Heterochromatin protein p25 (U35451)
- IL-7 receptor (M29696)
- Adenosine deaminase (M13792)



- Fumarylacetoacetate (M35150)
- Zyxin (X95735)
- LTC4 synthase (U50136)
- LYN (M16058)
- HoxA9 (U82789)
- CD33 (M23197)
- Adipon (M84526)
- Leptin receptor (Y12670)
- Cystatin C (M27891)
- Proteoglycan 1 (X17042)
- IL-8 precursor (Y00787)
- Azurocidin (M96326)
- p62 (U46751)
- Cyp5 (M80254)
- MCL1 (L08246)
- ATPase (M62762)
- IL-8 (M28130)
- Cathepsin D (M63138)
- Lectin (M57710)
- MAD-3 (M69043)
- CD11c (M81698)
- Ebp72 (X85116)
- Lysozyme (M19045)
- Propertin (M83652)
- Catalase (X04085)



## Metody k analýze farmakologicky relevantních znaků

Pharmacologic	Pharmacokinetic studies	True assessment of drug and/or metabolite concentration; not feasible in routine clinical setting.
	Clinical studies	Overall assessment of efficacy and toxicity; usually necessary to evaluate relevance of genetic polymorphisms; not suited for individual patients.
Biochemical	Enzyme activity, receptor function, or transporter function determinations	Direct assessment of function of the gene product.
Genetic	SNP analysis	Fast and simple analysis; interpretation requires knowledge of the functional effects of SNP; may miss mutations with effect on gene function (i.e. potentially low sensitivity).
	Sequence analysis	Provides information on the complete exonic sequence and splice junctions; time consuming; may detect irrelevant polymorphisms (i.e. low specificity).
	Expression profiling	Potentially provides information on genetic predispositions; currently no data base available; probably most relevant for target genes and subsequent signal cascades; may permit a direct assessment of drug effects.



## Validita enzymové aktivity ve srovnání s genetickým vyšetřením

	Enzyme activity	Gene test (detection of the most common mutations)
Advantages	Potentially detects all defects (i.e. 100% sensitivity).	Fast and simple.
Disadvantages	Time-consuming (RBC preparation, enzyme reaction, product detection); currently not automated; requires experience; false negative result after blood transfusion.	Sensitivity-limited (approximately 75%); analysis of the complete gene is time consuming and expensive.



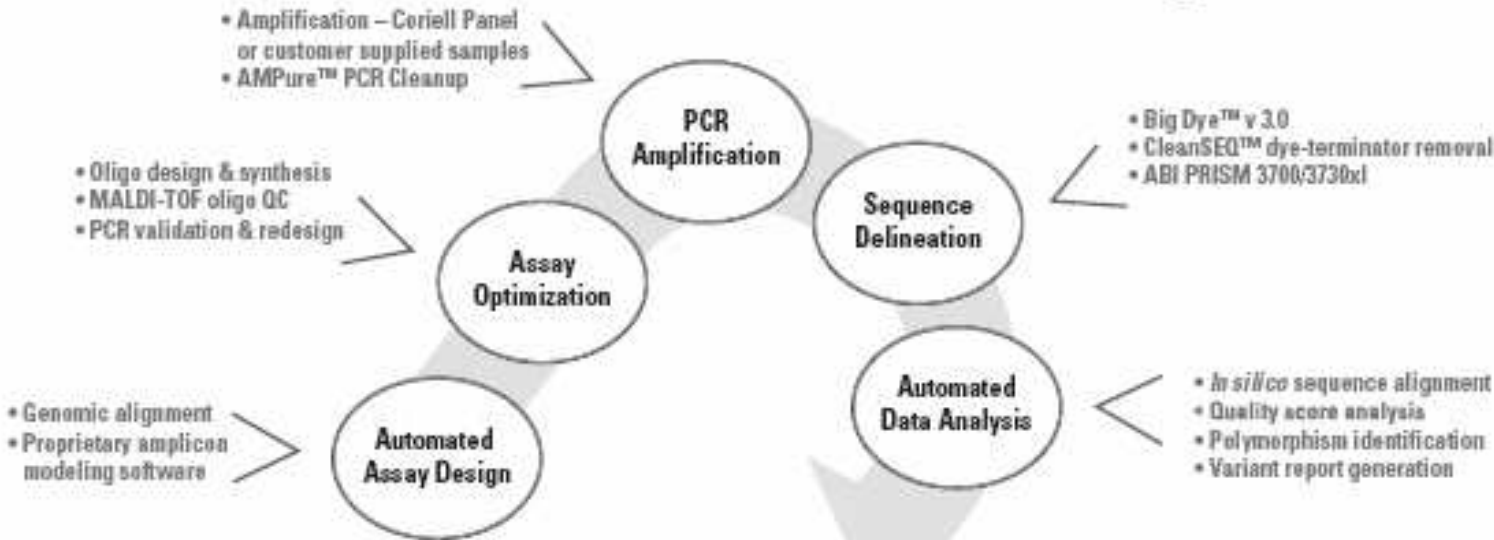
# Analýza SNP

 Hmotnostní  
spektrometrie

 Fluorescenční metody



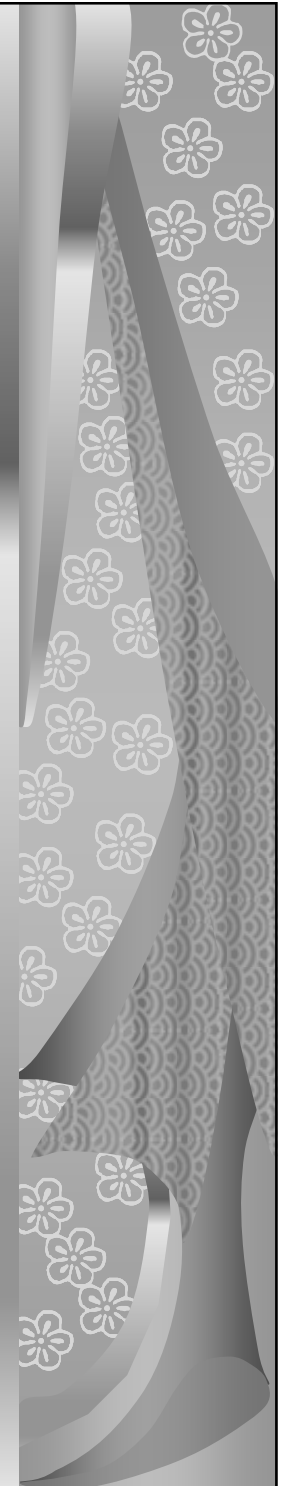
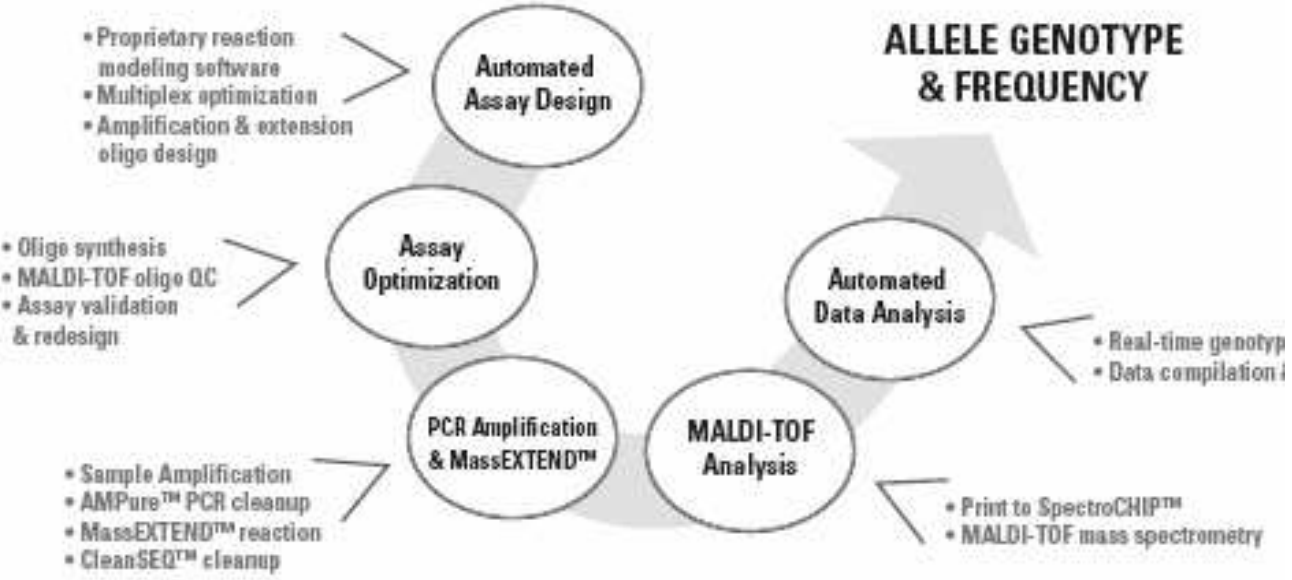
# SeeSNP Discovery



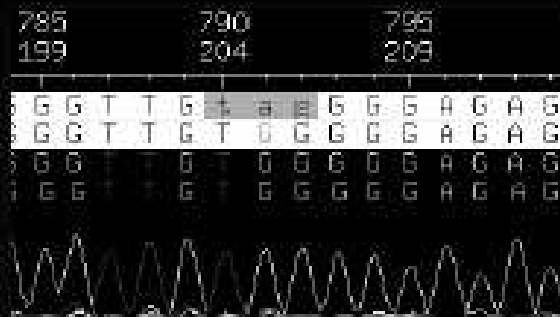
## GENES OF INTEREST

## IDENTIFIED SNP LOCI

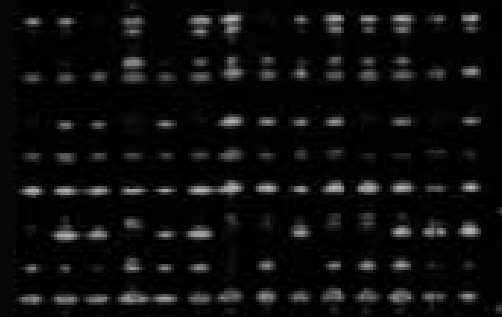
## ALLELE GENOTYPE & FREQUENCY



# High-throughput tools for studying gene variation in human populations



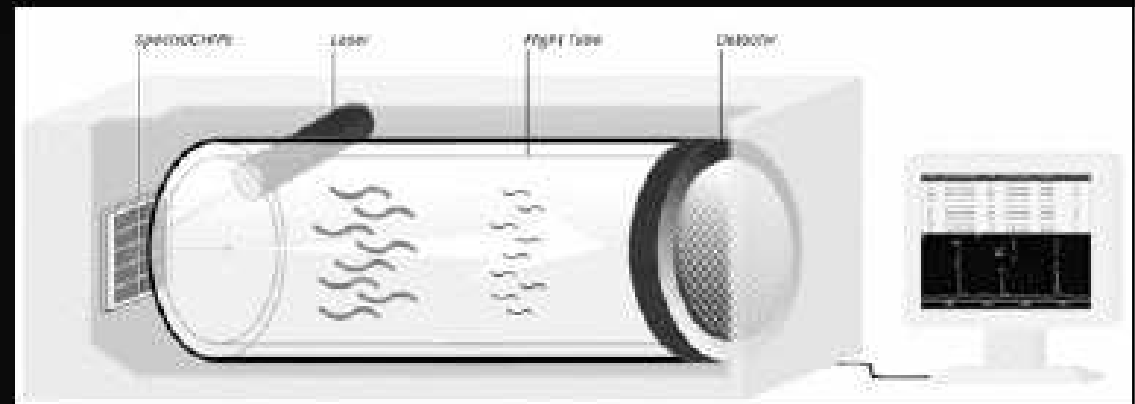
Automated capillary  
DNA sequencers



Multiplex SBE



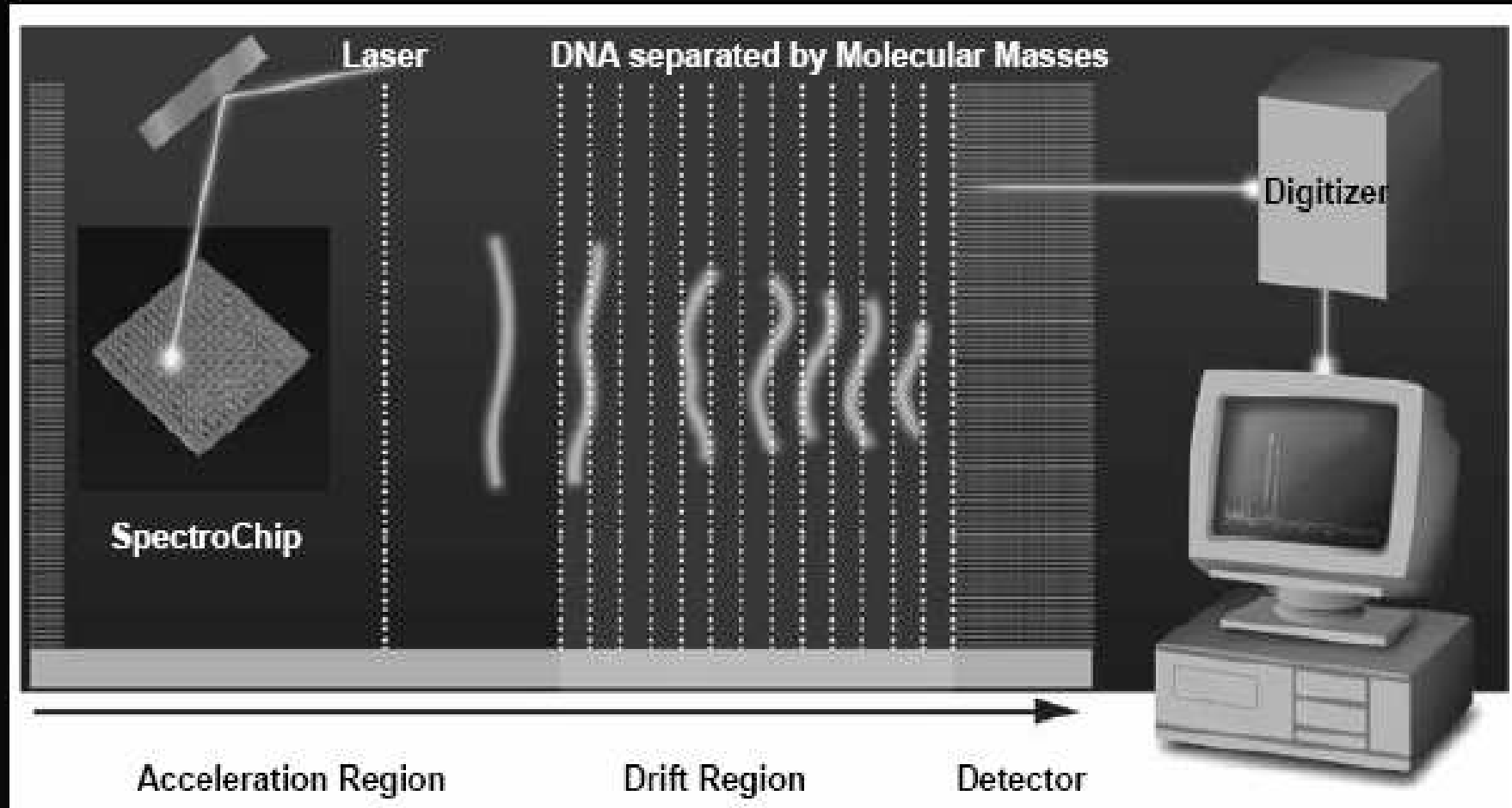
DNA chips



MALDI-TOF Mass Spectrometry

# MALDI-TOF MS

(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry)





# Děkuji za pozornost

■ [Vasku.Julie@seznam.cz](mailto:Vasku.Julie@seznam.cz)

■ [Avasku@med.muni.cz](mailto:Avasku@med.muni.cz)

