

M U N I
S C I

Farmakogenomika

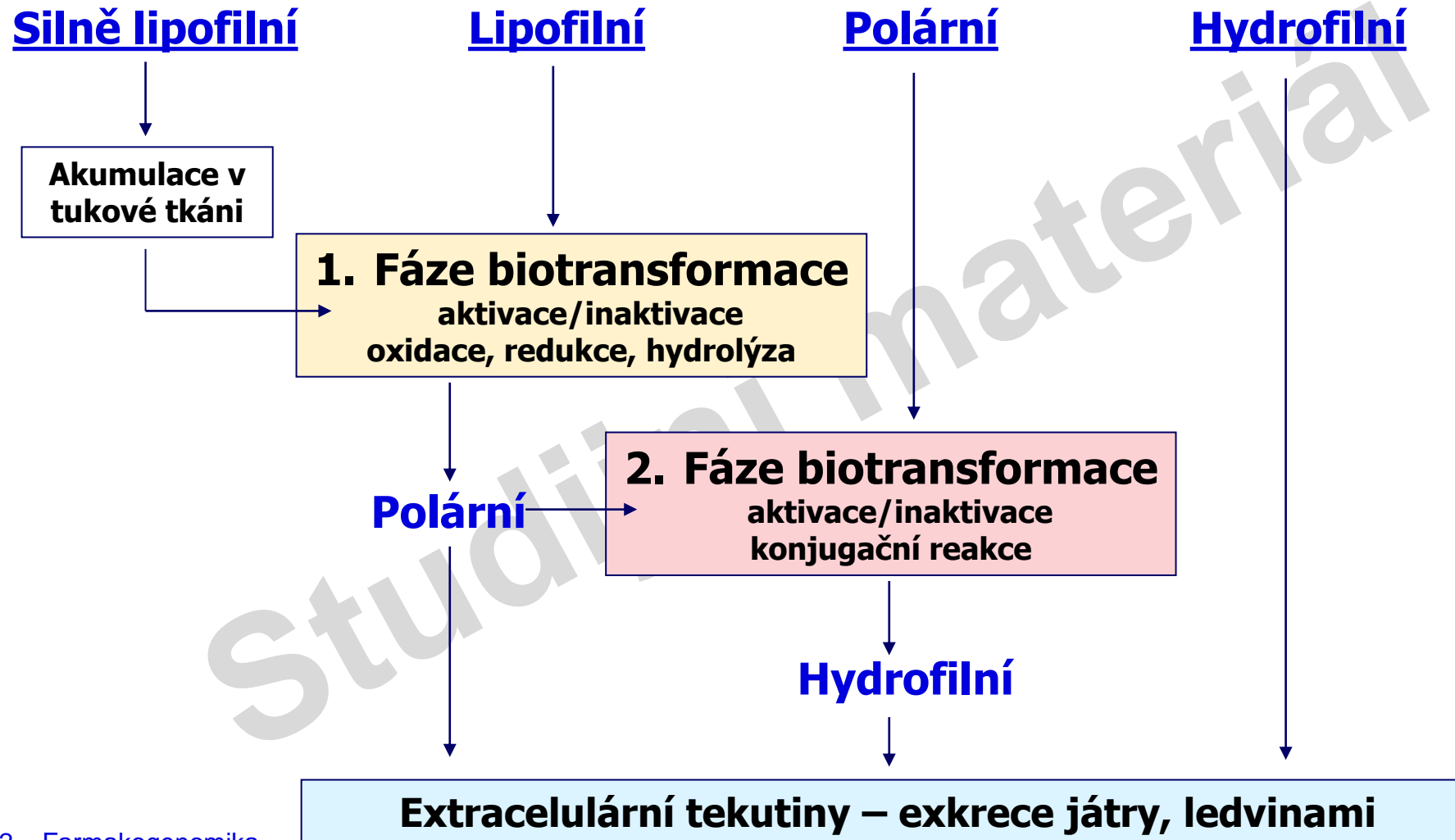
doc. Jan Lochman

Studijní materiál

Farmakogenetika a genomika

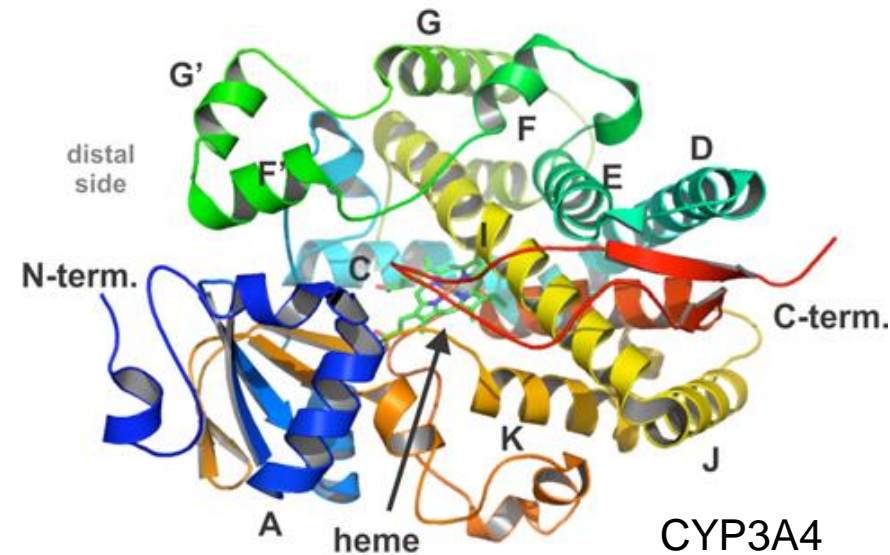
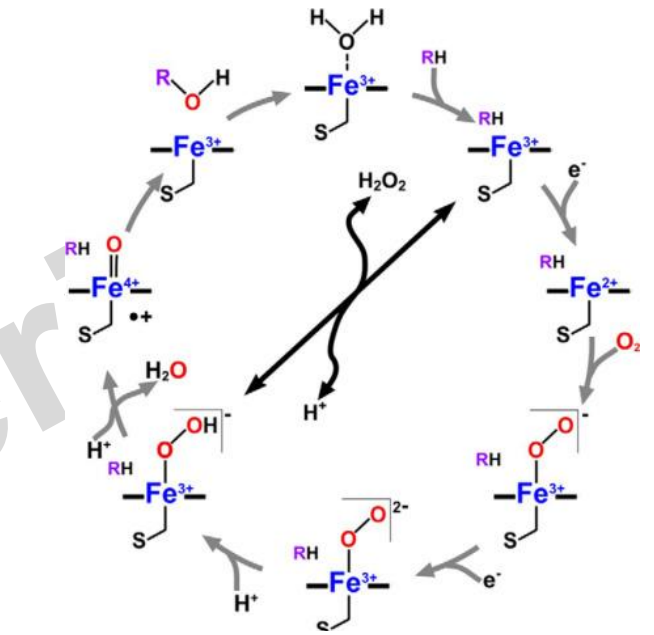
- Vývoj celé řady léčiv byl řízen omylem (penicilin, paralen, viagra, atd.)
- Velký problém při vývoji léčiv je ADR (adverse drug reaction) – přibližně u 7% lidí
- Farmakogenetika – studium dědičných rozdílů v metabolismu léků
- Farmakogenomika – studium všech genů ovlivňujících odpověď na léčivo
- Interindividuální variabilita metabolismu léčiv je hlavní příčinou nedostatečné účinnosti a nežádoucích účinků léčiv.
- Celá řada léčiv metabolizovaných v játrech je metabolizována enzymy cytochromu P450 (CYP) = CYP1, CYP2 a CYP3
- Geny kódující tyto enzymy jsou vysoce variabilní a v rámci populací vykazují značné rozdíly v jednotlivých alelách.

Xenobiotikum (léčivo)



1. fáze biotransformace

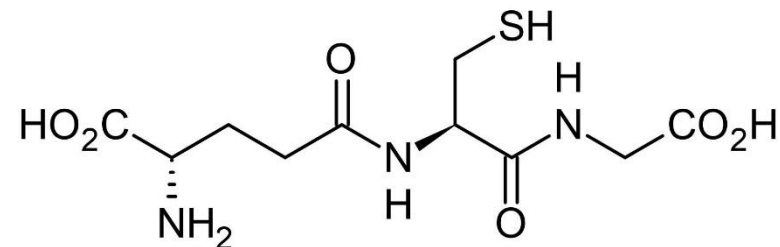
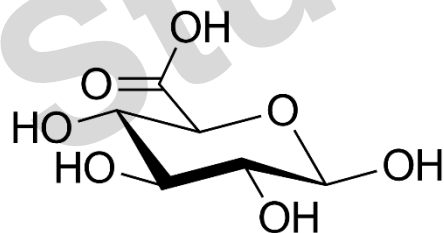
- zavedení polární funkční skupiny do molekuly lipofilní látky
 - OH, -NH₂, -SH, = CO, - COOH
- reakce 1. fáze biotransformace: oxidace, redukce, hydrolýza
- během 1. fáze biotransformace může docházet jak ke snížení tak ke zvýšení účinku (toxicity) léčiva
- Nejčastější reakce je oxidace katalyzovaná:
 - **cytochrom P – 450**
 - alkoholdehydrogenáza
 - monoaminoxidázy a diaminoxidázy

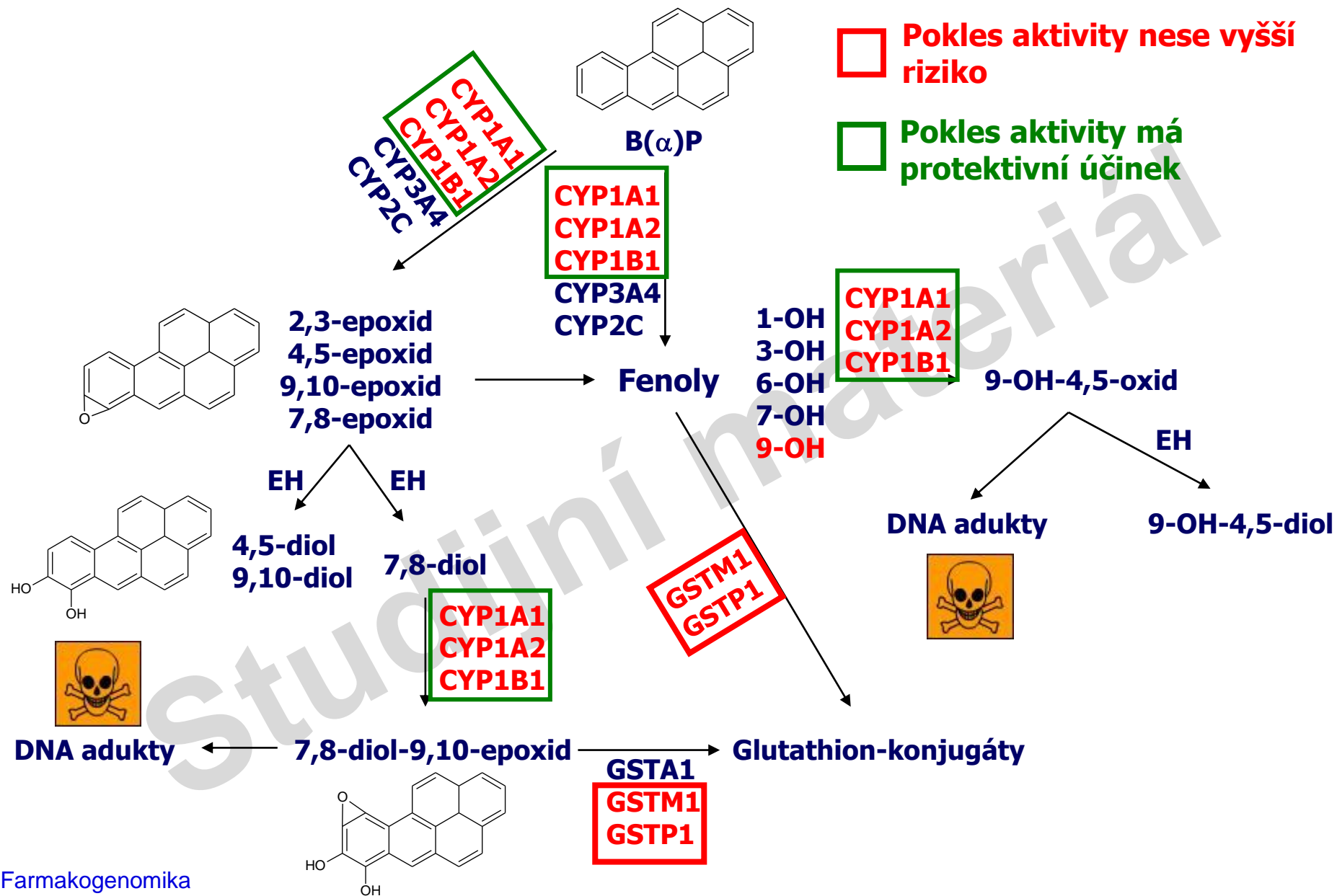


2. fáze biotransformace

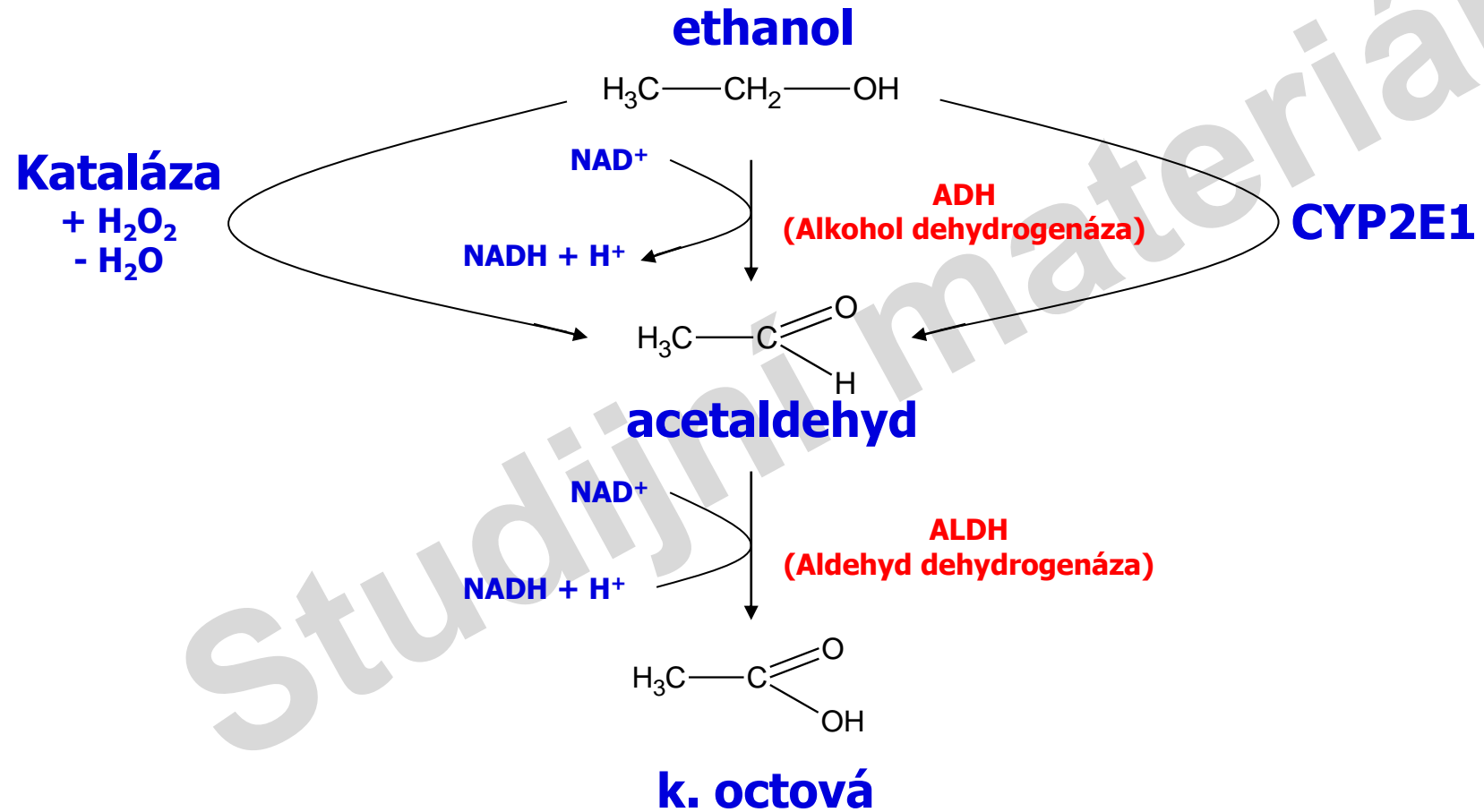
- Xenobiotikum (léčivo) se přes polární funkční skupinu navázanou v první fázi váže na vysokomolekulární endogenní konjugační činidlo
- Konjugát má obvykle menší biologickou aktivitu, vyšší rozpustnost ve vodě a vyšší molekulovou hmotnost než původní látka (metabolit z 1. fáze)
- Obvyklé konjugační reakce:

konjugace s k. glukuronovou, sulfátová konjugace, glycinová konjugace, acetylace (N-acetyltransferáza), metylace, **glutathionová konjugace** (glutathion-S-transferáza)



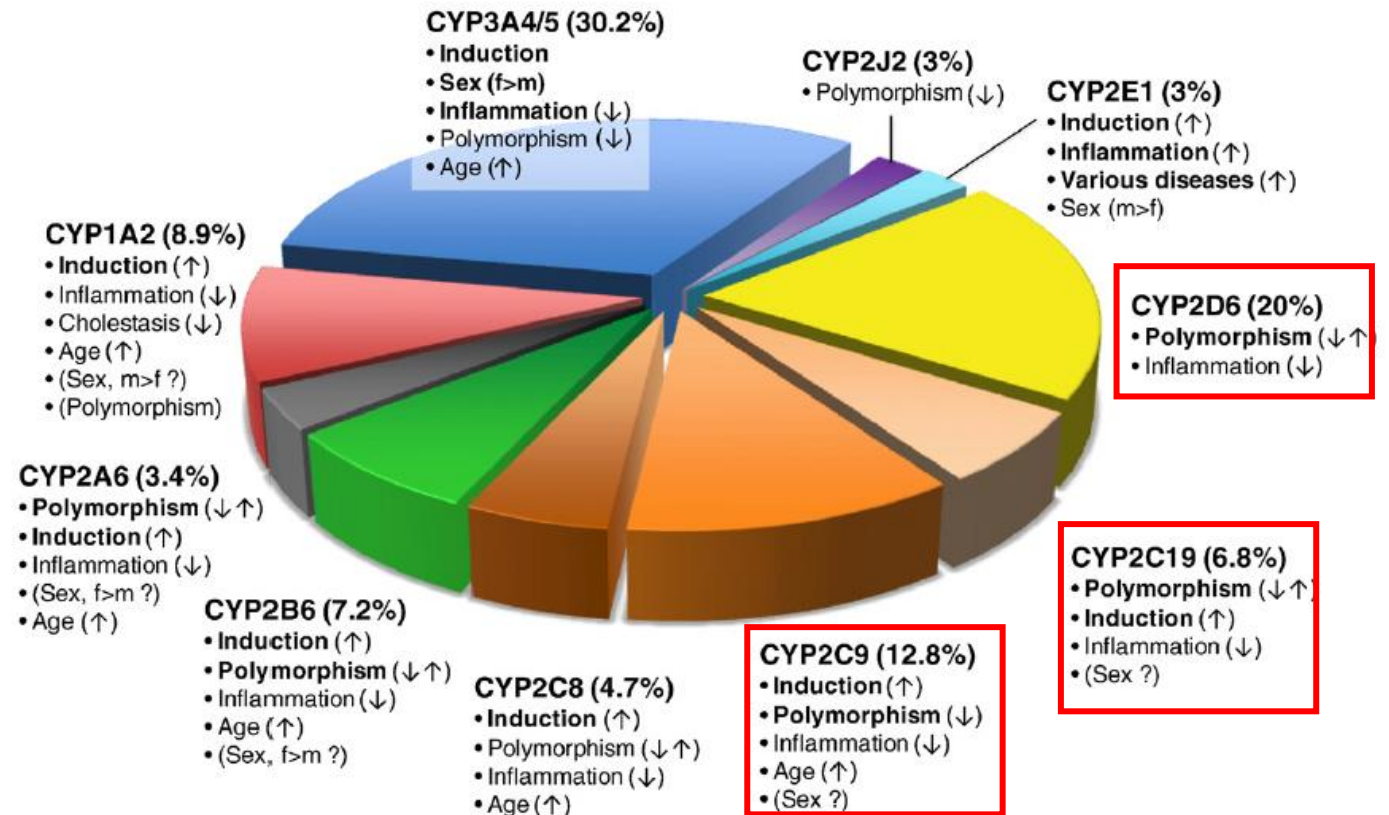


Oxidace alkoholu



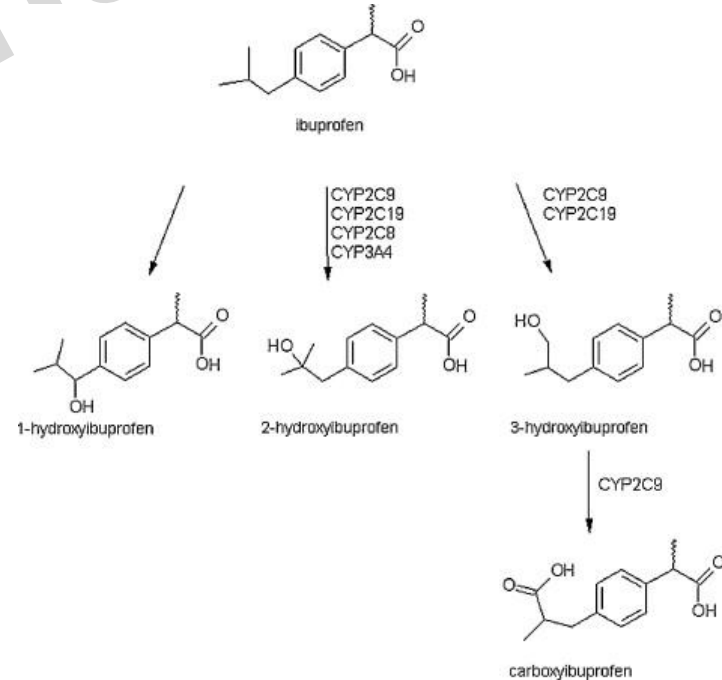
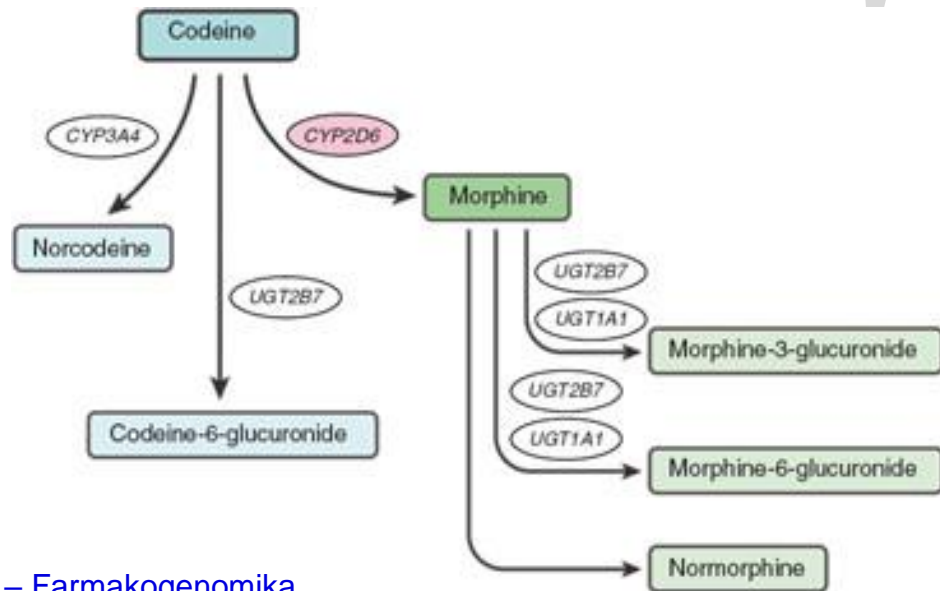
Důležité CYP450 pro metabolismus léčiv

- Mezi nejdůležitější patří CYP2D6, CYP2C19 a CYP2C9
- Jejich genetická variabilita vysvětluje velkou část variability v enzymatické aktivitě
- Podle enzymatické aktivity dělíme jedince na ultrarychlé, normální, střední a pomalé metabolizéry

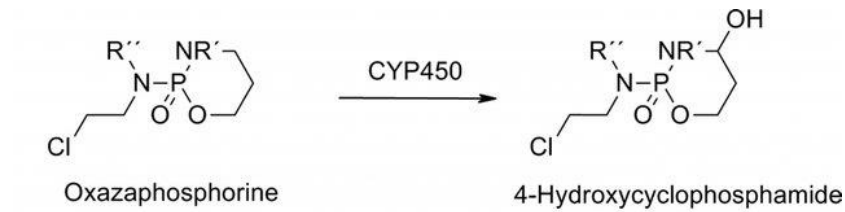


Důležitost CYP450 pro metabolisms léčiv

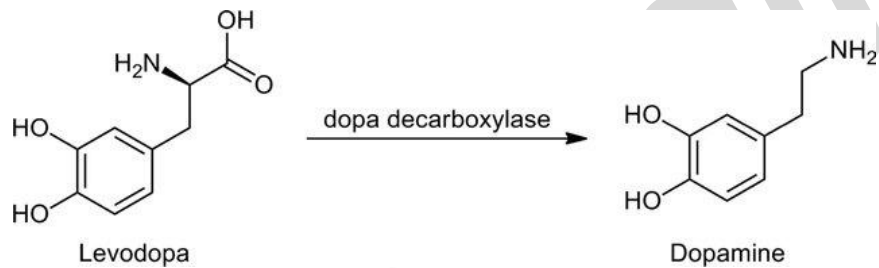
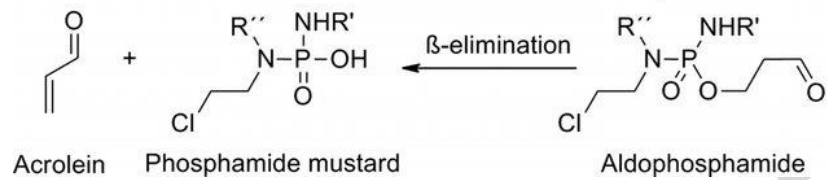
CYP2C9	10q23.33	++	Acenocoumarol, diclofenac, fluvastatin, glimepiride, glipizide, ibuprofen, losartan, phenytoin , S-warfarin
CYP2C19	10q23.33	++	Amitriptyline (and other tertiary amine tricyclic antidepressants), clopidogrel , (es)citalopram, omeprazole, pantoprazole, sertraline , voriconazole
CYP2D6	22q13.2	++	Amitriptyline (and other tricyclic antidepressants), aripiprazole, atomoxetine, codeine , dextromethorphan, fluvoxamine , metoprolol, mianserine, MDMA, ondansetron , paroxetine , propafenone, risperidone, tamoxifen , thioridazine, timolol, tramadol, tropisetron , venlafaxine



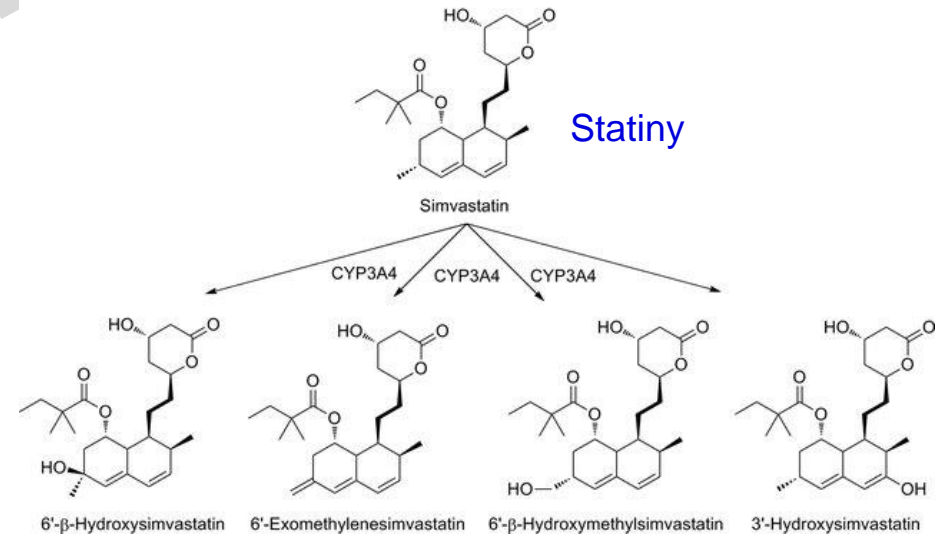
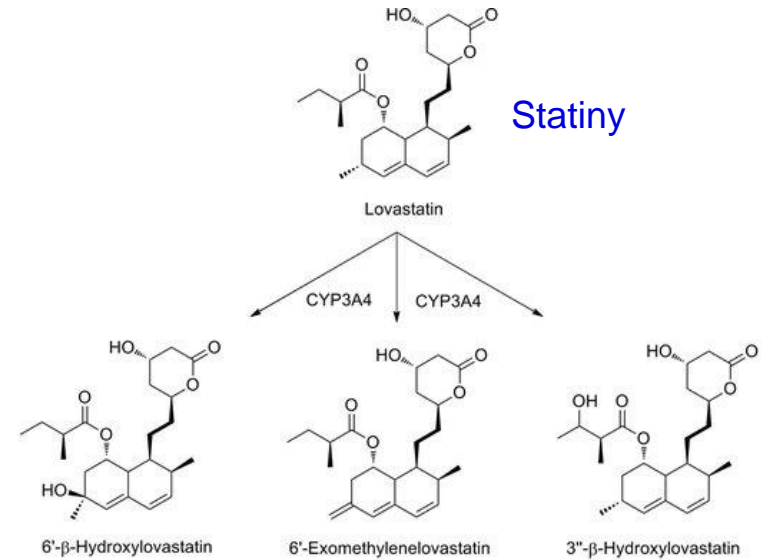
Důležitost CYP450 pro metabolisms léčiv



Chemoterapeutikum

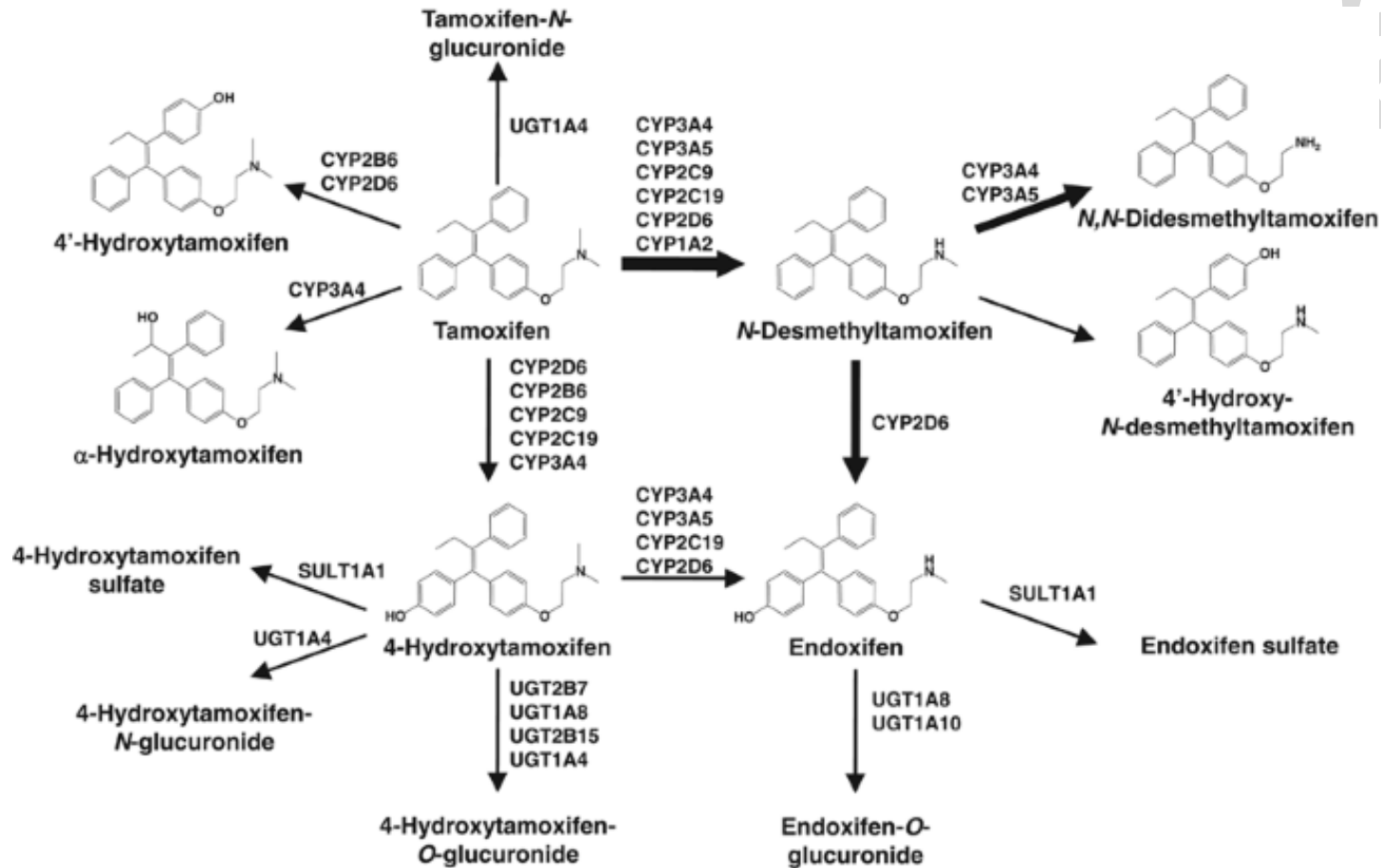


Prekursor dopaminu



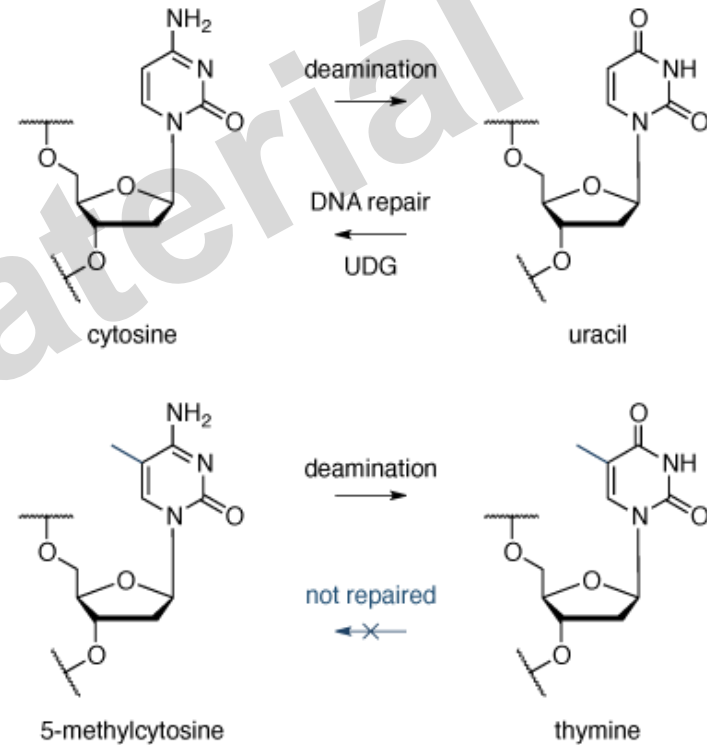
Metabolismus tamoxifenu

Modulátor estrogenových receptorů používaný k prevenci rakoviny prsu u žen



Typy mutací

Tranzice	GA <u>A</u> CGT → GA <u>G</u> CGT
Transverze	GA <u>A</u> CGT → GA <u>T</u> CGT
Missense mutace	GA <u>A</u> CGT → GA <u>T</u> CGT Glu Arg Asp Arg
Konzervativní substituce	<u>A</u> CTCGT → <u>T</u> CTCGT Thr Arg Ser Arg
Radikální nahrazení	<u>G</u> AATCGT → <u>C</u> AATCGT Asp Arg Ala Arg
Nonsense mutace	<u>G</u> AACGT → <u>T</u> AACGT Asp Arg STOP
Inzerce	GAACGT → GAA <u>A</u> CGT
Delece	GAACGT → GACGT



SNPs – jednobodové polymorfismy v rámci genomové DNA

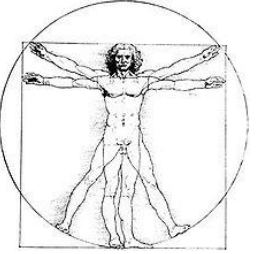
AmpliChip P450



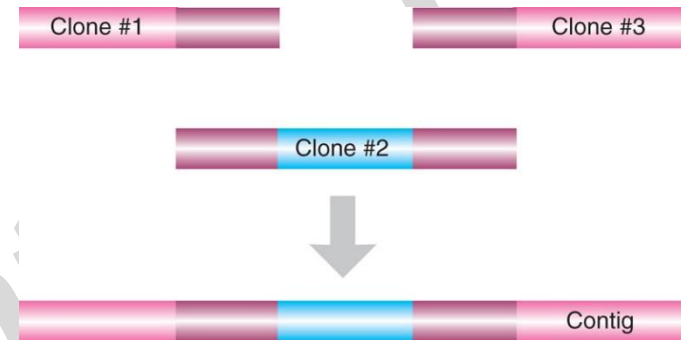
- Roche Diagnostics' 2D6/2C19 – první diagnostická analýza SNPs spojených s metabolismem léčiv pomocí DNA čipu
- FDA schváleno, 2004

Determined Genotype	MORE COPIES	OR	OR	OR
Predicted Phenotype	Ultrarapid Metabolizers: Too rapid drug Metabolism, no Drug response	Extensive Metabolizers: Expected drug response	Intermediate Metabolizers: Slow Metabolism, higher drug levels Than expected	Poor Metabolizers: Very slow or No metabolism, High levels of drug, High risk of ADR
An Example of Population ratio	1	6	3	1
An Example of Drug Dosage	High	Medium	Low	Very Low
An Example of Pro-Drug Dosage	Low	Medium	High	Very High

Sekvenace lidského genomu



- v době počátku (rok 1990) monumentální úkol
- započat v roce 1990 za účasti DOE and NIH
- sekvenace prováděna pomocí kontigových map a BACs
- prvotní plán počítal s dobou trvání 15 let
- nakonec sekvenace pomocí Sangerovy metody téměř dokončena již v roce 2000
- výsledná sekvenční mapa publikována 14. dubna 2003, 99.99% přesnost (National Human Genome Research Institute)
- celkové náklady projektu 3 miliardy dolarů
- v roce 2000 prezident Bill Clinton ujistil o nepatentovatelnosti lidské DNA



<https://www.genome.gov/25019885/online-education-kit-how-to-sequence-a-human-genome//>



Sekvenace dle Sanger – I. generace



Throughput/Performance by Run Module

XLRseq: 768 samples per day (690 Kbases)

LongSeq: 1152 samples/day (980 Kbases)

StdSeq: 2304 samples/day (1550 Kbases)

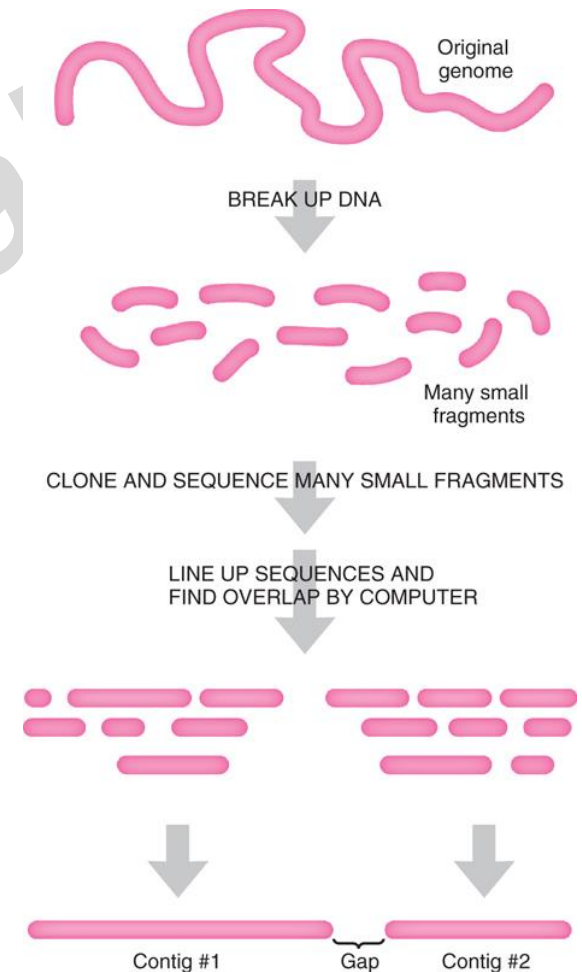
FastSeq: 2304 samples/day (1600 Kbases)

RapidSeq: 3840 samples per day (2100 Kbases)

Celera Genomics Project



- založena vědcem Craig Venterem a v roce 1998 započala sekvenační projekt
- celkové náklady 300 mil. dolarů byly hrazeny plně s privátních zdrojů
- poprvé použita metoda „whole genome shotgun sequencing“
- k analýze sekvenačních dat použit přístup vyvinutý Gene Myersem
- tento přístup však vyžadoval extrémní výpočtové požadavky
- finální výpočet prováděn na 7000 procesorech k získání 1000-násobné rychlosti oproti Pentium počítačům
- tento inovativní přístup dovolil dokončit sekvenaci již za 9 měsíců



Silná role diplomacie

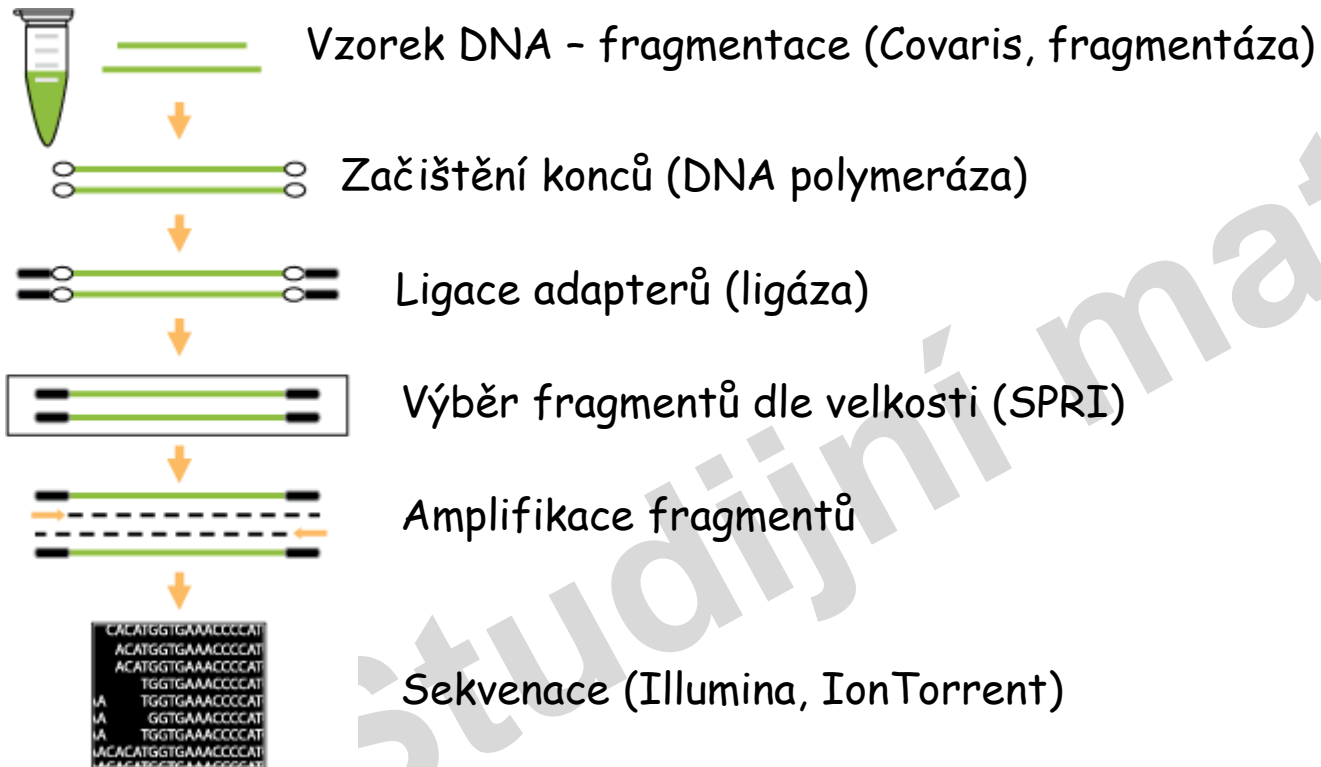
It is hard to imagine today's politicians reminding scientists that cooperation has as much value as competition.

In 26 June 2000, US President Bill Clinton and UK Prime Minister Tony Blair presided over a carefully choreographed piece of scientific theatre. Through a video link connecting Washington DC and London, they announced to the world that scientists had completed a rough first draft of the human genome sequence.



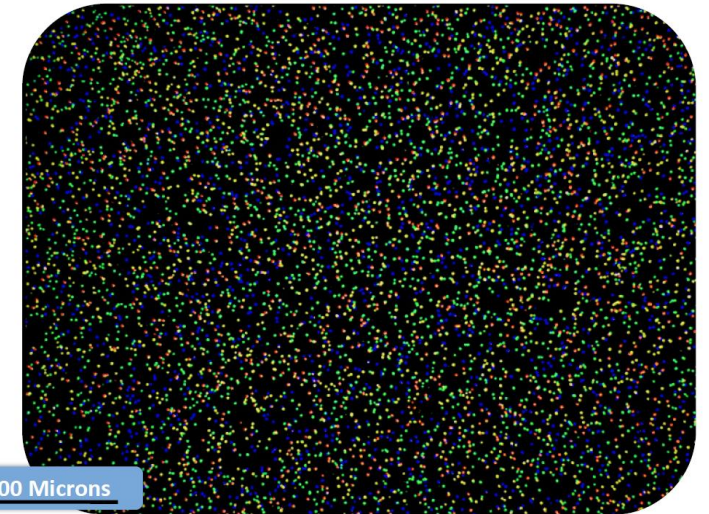
Craig Venter (vlevo), Francis Collins (uprostřed), Bill Clinton (vpravo)

Sekvenátory II generace



illumina®

Clusters



Sekvenátory II generace (Illumina)

Miniseq



MiniSeq System

- MAX OUTPUT
8 Gb
- MAX READ NUMBER
25 million
- MAX READ LENGTH
2x150 bp



Novaseq



NextSeq System

- MAX OUTPUT
120 Gb
- MAX READ NUMBER
400 million
- MAX READ LENGTH
2x150 bp

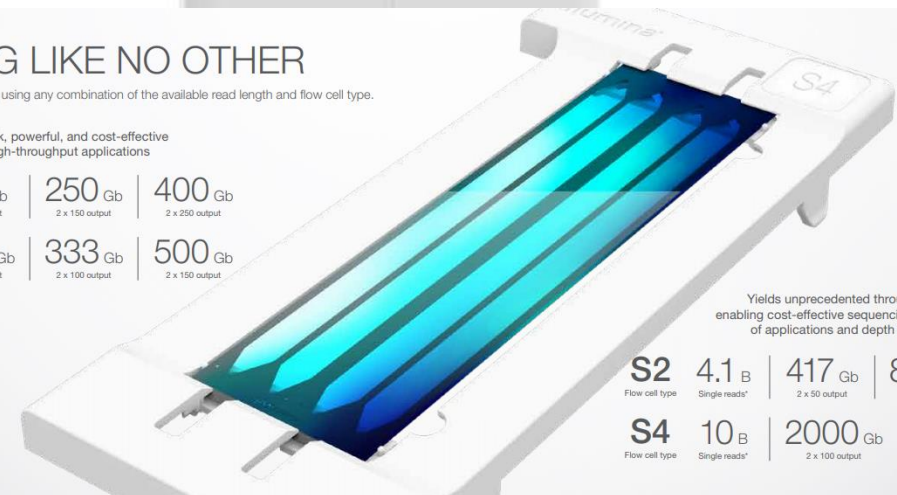
SEQUENCING LIKE NO OTHER

Users can run 1 or 2 flow cells at a time, using any combination of the available read length and flow cell type.

Provides a quick, powerful, and cost-effective option for high-throughput applications

SP	0.8 _B	80 Gb	250 Gb	400 Gb
Flow cell type	Single reads*	2 x 50 output	2 x 150 output	2 x 250 output
S1	1.6 _B	167 Gb	333 Gb	500 Gb
Flow cell type	Single reads*	2 x 50 output	2 x 100 output	2 x 150 output

*Clusters passing filter



Yields unprecedented throughput while enabling cost-effective sequencing across a range of applications and depth of coverage

S2	4.1 _B	417 Gb	833 Gb	1250 Gb
Flow cell type	Single reads*	2 x 50 output	2 x 100 output	2 x 150 output
S4	10 _B	2000 Gb	3000 Gb	
Flow cell type	Single reads*	2 x 100 output	2 x 150 output	

Sekvenátory III generace

- Základem technologie jsou nanopóry
- Na začátku sekvenace je NK navázána na nanopór tvořený proteinem
- Poté je rozpletena a prochází přes nanopór, což generuje změnu proudu
- Na základě pozorované změny jsou odečítány v reálném čase jednotlivé báze
- Umožňuje sekvenaci velmi dlouhých úseků (desítky až stovky kilobází)
- Nevýhodou je vyšší chybovost, správnost >95%



Minion

