

M U N I
M E D

Epigenetika a vliv životního prostředí

Farmakogenetika

Mgr. David Galuška

Historie

– 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**

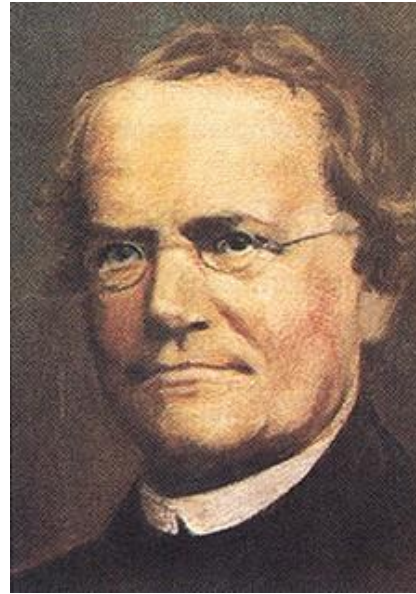
– Fenotypové zákony

○ **Zákon o uniformitě hybridů**

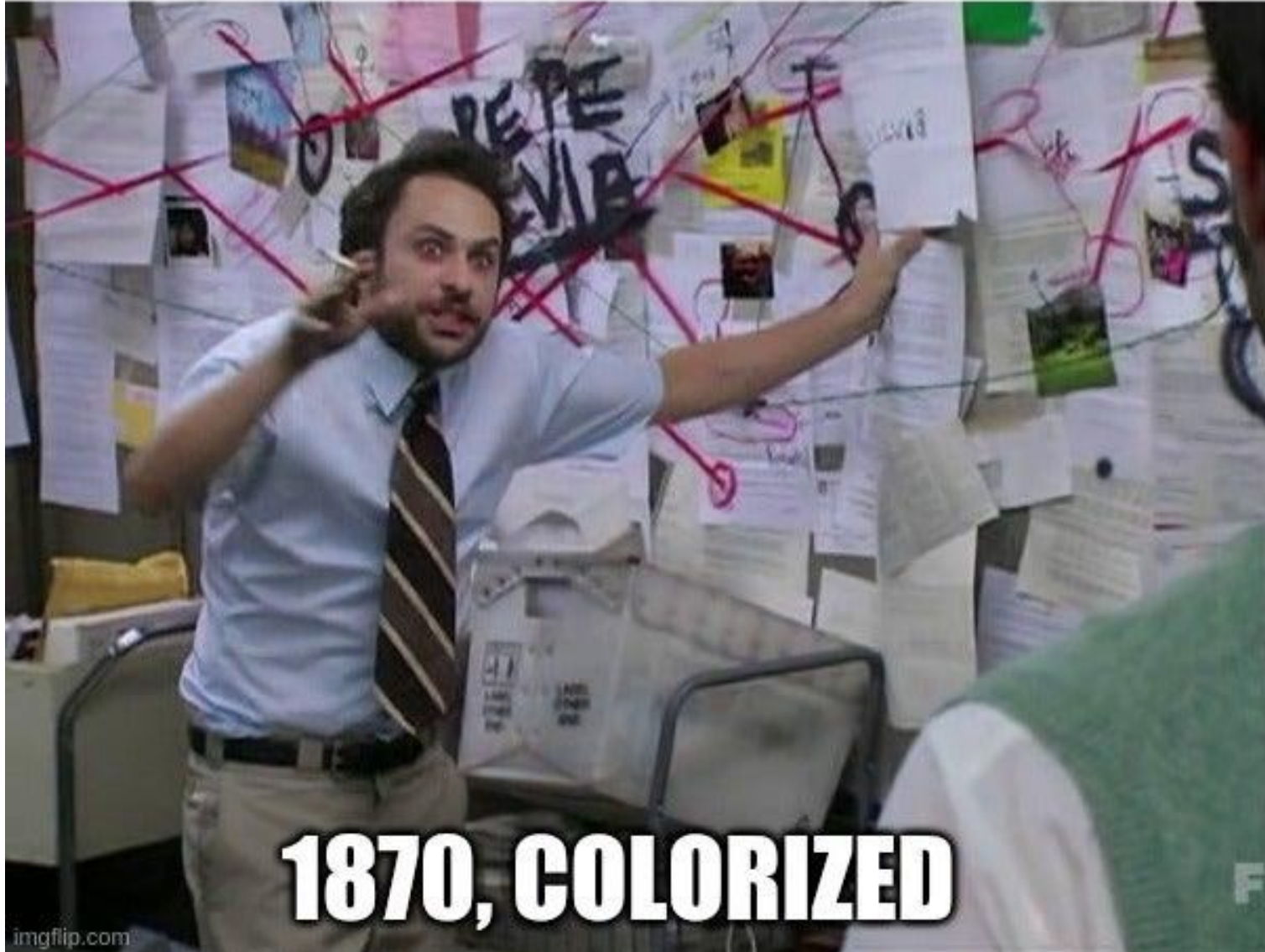
Křížíme-li dominantního homozygota s homozygotem recesivním, jsou jejich potomci F1 generace v sledovaném znaku všichni stejní. Reciproká křížení u jakýchkoliv jedinců F1 generace dávají shodné výsledky.

○ **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.



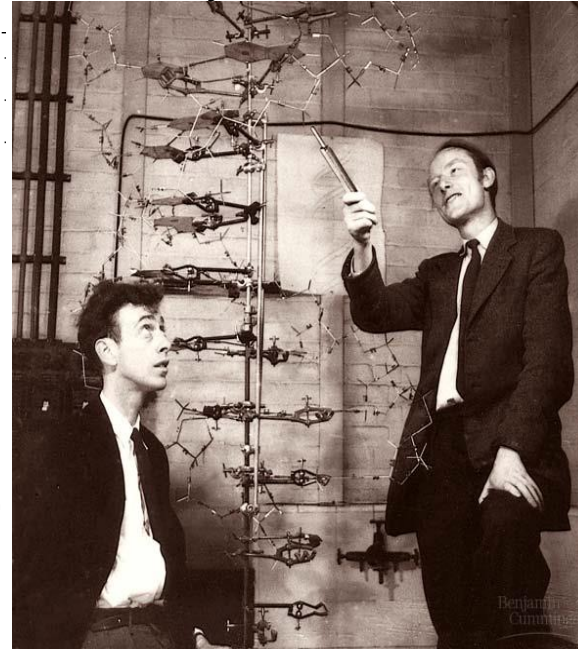
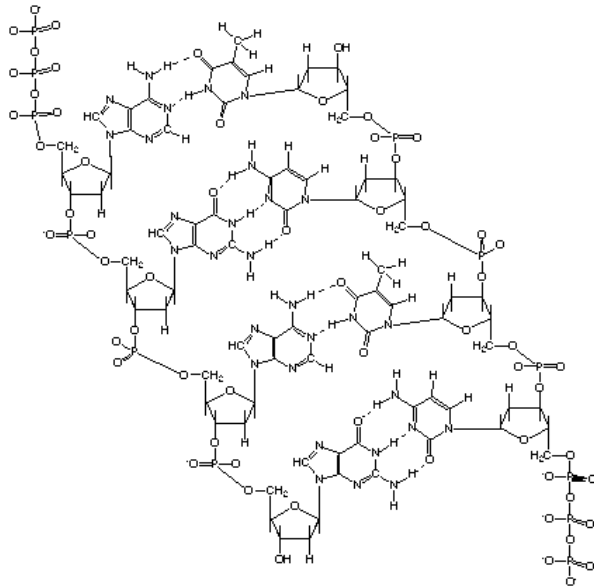
GREGOR MENDEL EXPLAINING HIS PEA STUFF TO MORAVIAN FARMERS



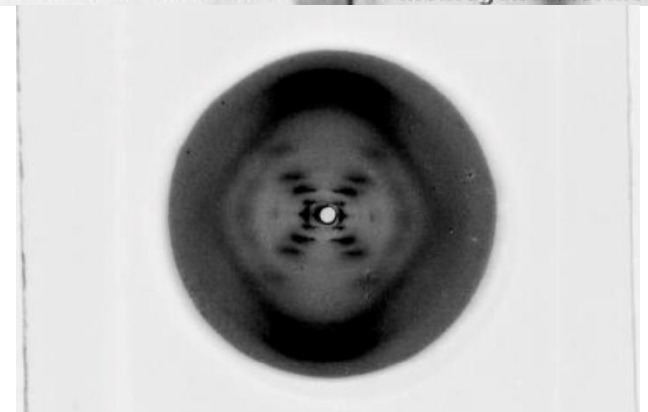
1870, COLORIZED

DNA

- molekula DNA jako taková byla objevena v roce 1869, kdy se švýcarskému lékaři Friedrich Miescherovi podařilo vyizolovat DNA z bílých krvinek



- 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.



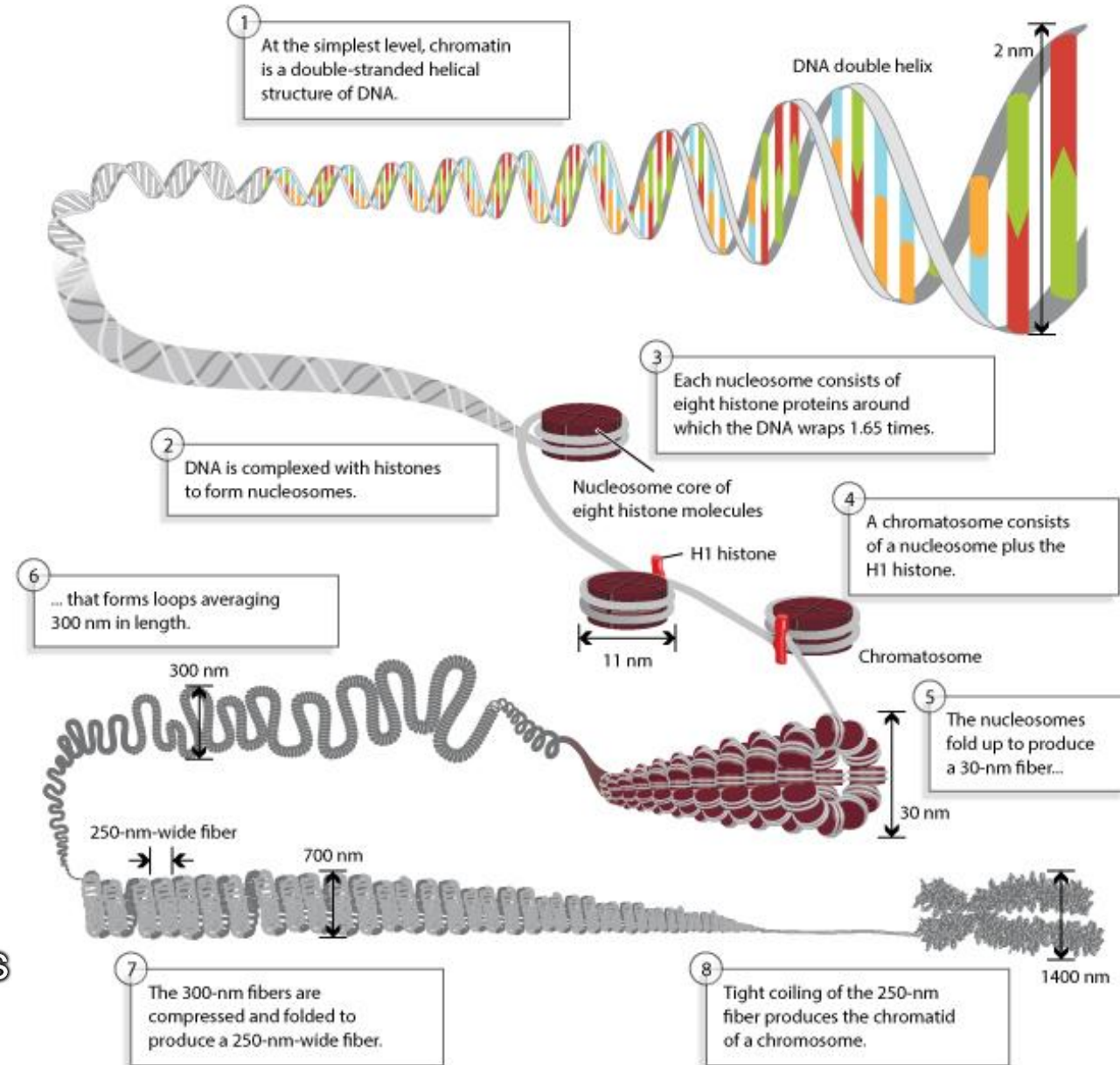
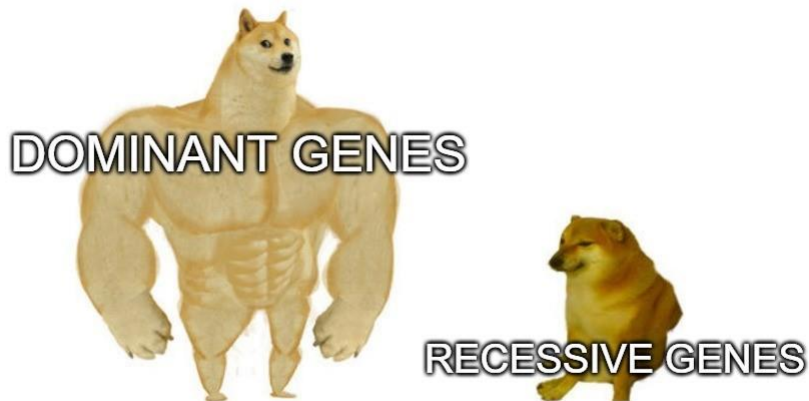
Základní genetické pojmy

gen, alela, genom, chromozom

lokus
alely
- dominantní
- recesivní

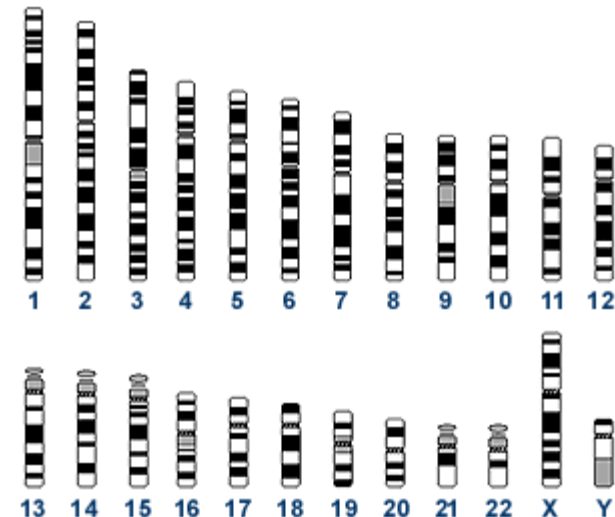
homozygot
heterozygot

genotyp
fenotyp

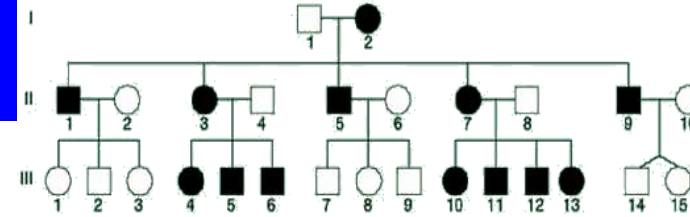


Karyotyp člověka

- každý biologický druh má svou charakteristickou chrom. výbavu (počet a morfologii) = **karyotyp**
- u člověka mají somatické **diploidní** - 46 chromozomů
 - 22 párů homologních autozomů
 - 1 pár gonozomů (44XX nebo 44XY)
- gamety (vajíčko, spermie) 23 – **haploidní**
- standardní klasifikace číslováním podle velikosti
- zpracování vzorku buněk pro karyotyp
- nejlépe hodnotitelné jsou kondenzované chromozomy v metafázi nebo prometáfázi mitózy
 - lymfocyty perif. krve nutno uvést do mitózy mitogenem a zastavit v metafázi např. colchicinem
- barvením chromozomů (např. Giems) se dosáhne charakteristického pruhování a tím rozlišení jednotlivých chromozomů
- hodnocení karyotypu
- manuální – obarvený chromozomový “rozptyl” (nejč. mitotické lymfocyty) se po obarvení vyfotí, vystřihnou a seřadí do párů
- automatizované (mikroskop + software)



Mimojaderná DNA



mitochondriální DNA

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

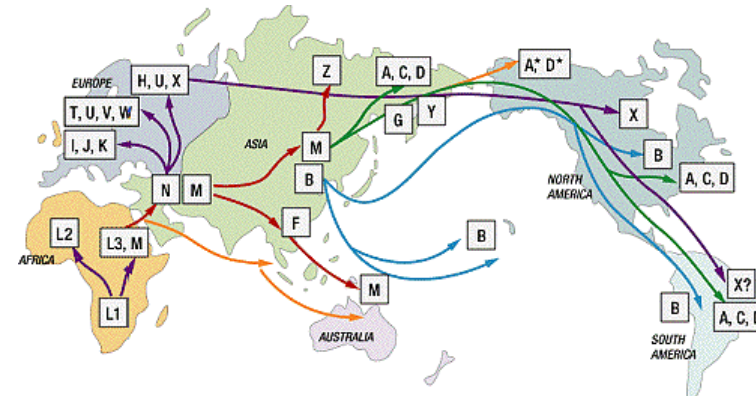
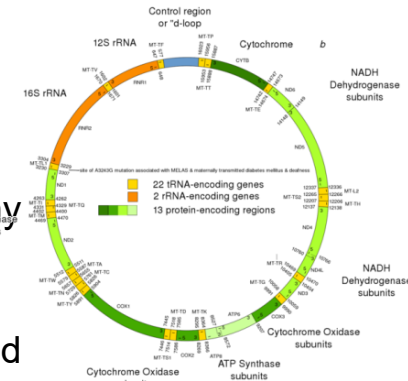
kóduje 37 genů

○ 24 genů pro různou nekódující RNA

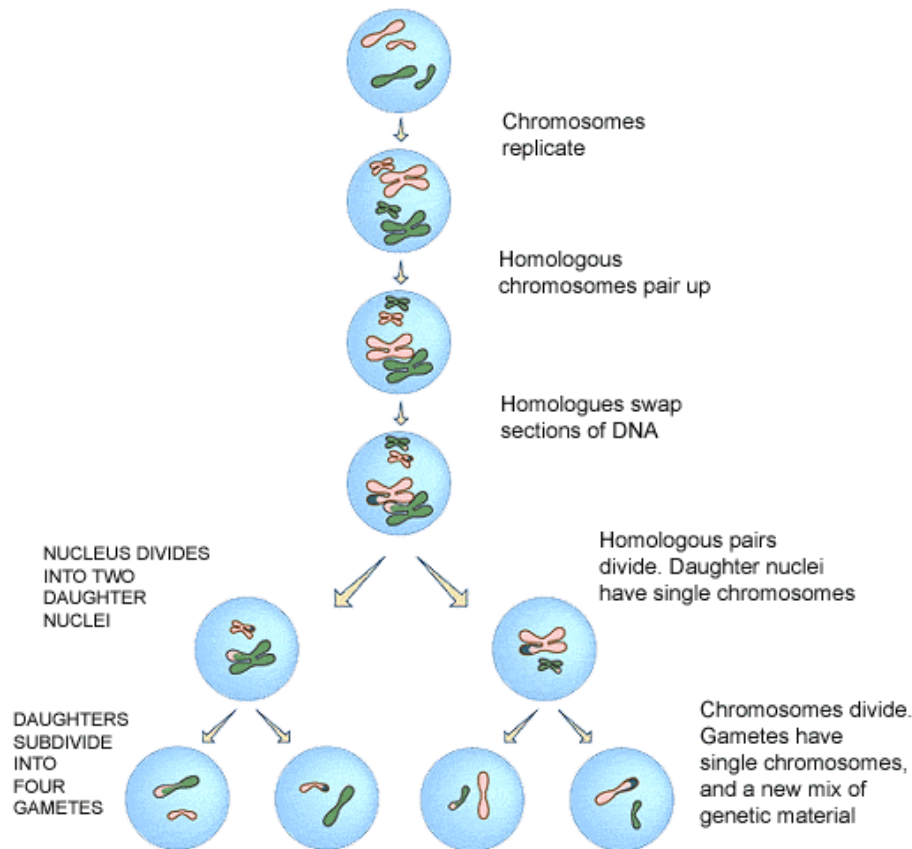
○ 13 genů kóduje vlastní mitochondriální polypeptidy zapojené v mitochondriálních procesech (využívány během oxidativní fosforylace)

maternální dědičnost

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



Genetická variabilita (~0.1%)



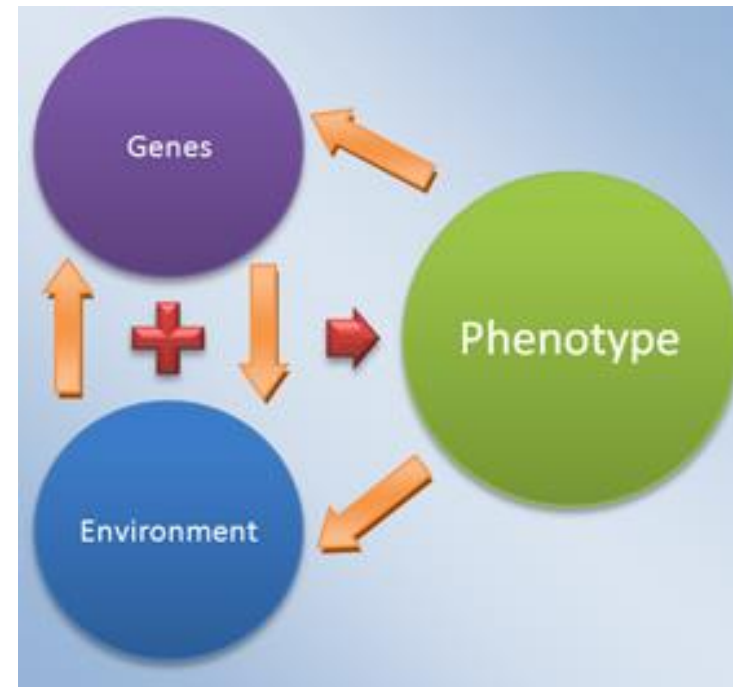
DNA sekvenční kódujících i nekódujících úseků genomu je variabilní
v populaci pro daný gen vyskytuje vícero variant (= alel) s různou populační frekvencí = **genetická variabilita**, která je výsledkem několika procesů

- 1) sexuální reprodukce
- 2) nezávislé meiotické segregace
23 párů ch. → 2^{23} kombinací = 8,388,608 různých gamet
- 3) rekombinace (meiotický crossing-over)
>> kombinací než 8 miliónů
- 4) mutagenese *de novo*
chyba při DNA replikaci
proof-reading DNA polymerázy ani mismatch DNA repair není 100%
působení externích mutagenů
- 5) genetický drift
- 6) přirozená selekce

Vliv prostředí na lidský genom

Genetická výbava jedince je sice osudově zadána v okamžiku zplodění, ale není pro další život konečná, protože v průběhu života se může měnit jak pod vlivem četných faktorů **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·)



Klasifikace geneticky podmíněných nemocí

prakticky každá nemoc (tj. její vznik a progres) je u daného jedince modifikována genetickou výbavou, avšak s různým podílem na finálním fenotypu

snad s výjimkou úrazů, závažných intoxikací a vysoce virulentních infekcí, kde individuální genetická konstituce nehraje prakticky žádnou roli

monogenní nemoci

jedna kritická “chyba” (tj. alela) konkrétního genu je sama o sobě nebo v homozygotní kombinaci téměř výhradně zodpovědná za rozvoj nemoci (fenotypu) nebo přenašečství a tedy zvýšenému riziku pro potomky

chromozomální poruchy

nejedná se o konkrétní chybu ale o nadbytek/nedostatek genů obsažených v celých chromozomech nebo jejich segmentech (“gene dosage” efekt)

komplexní (poly-, multigenní) nemoci

genetická dispozice podmíněná kombinací alel několika genů je výrazně manifestována prostředím a komorbiditami

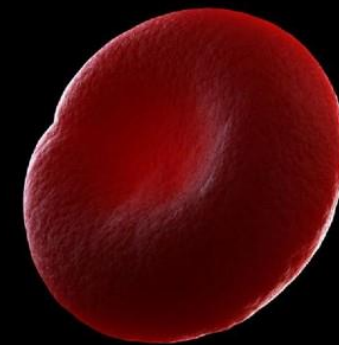
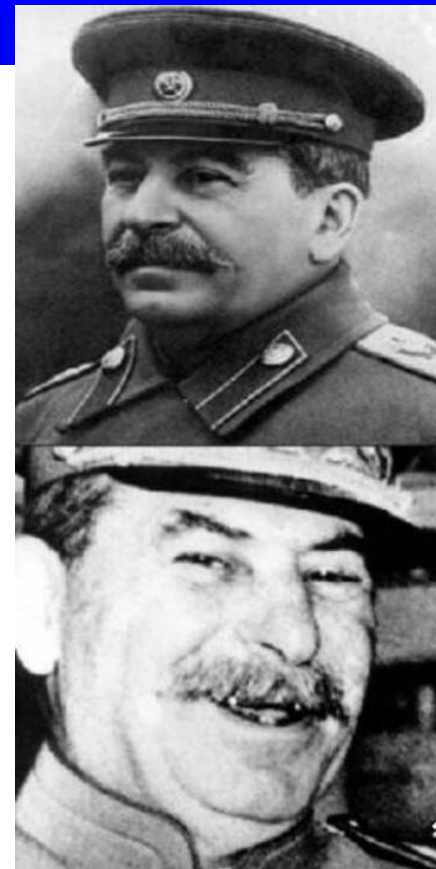
Genové mutace



Srpkovitá anemie

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

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



Normal Blood Cell



Sickle Cell

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

Hemofilie A

= nedostatek srážecího faktoru VIII
inzerce 3000 bp – snížení tvorby proteinu
gonozomálně recesivní – vazba na X chromozom
žena je přenašečka

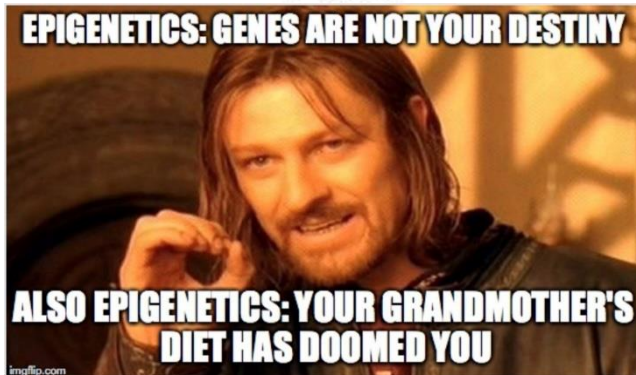
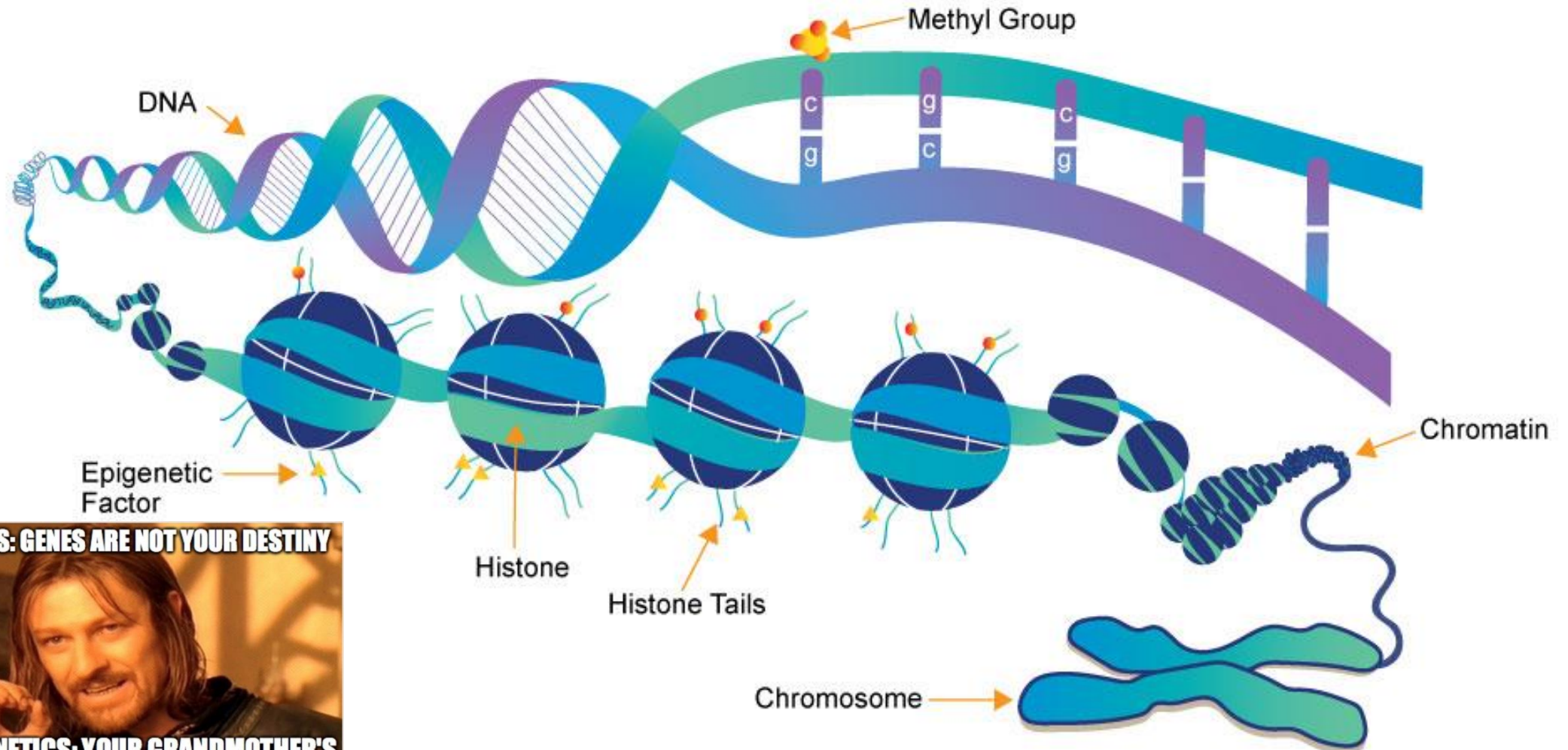


Member of European Royalty-
Alas! My baby has hemophilia!

Queen Victoria-



Epigenetické faktory



Kojení a obezita

- Mléko aktivuje Peroxisome proliferator-activated receptor α
 - PPAR α
- Ten způsobuje demetylaci genů potřebných pro β -oxidaci MK v játrech
- Lepší utilizace MK v průběhu života

ARTICLE

DOI: [10.1038/s41467-018-03038-w](https://doi.org/10.1038/s41467-018-03038-w) OPEN

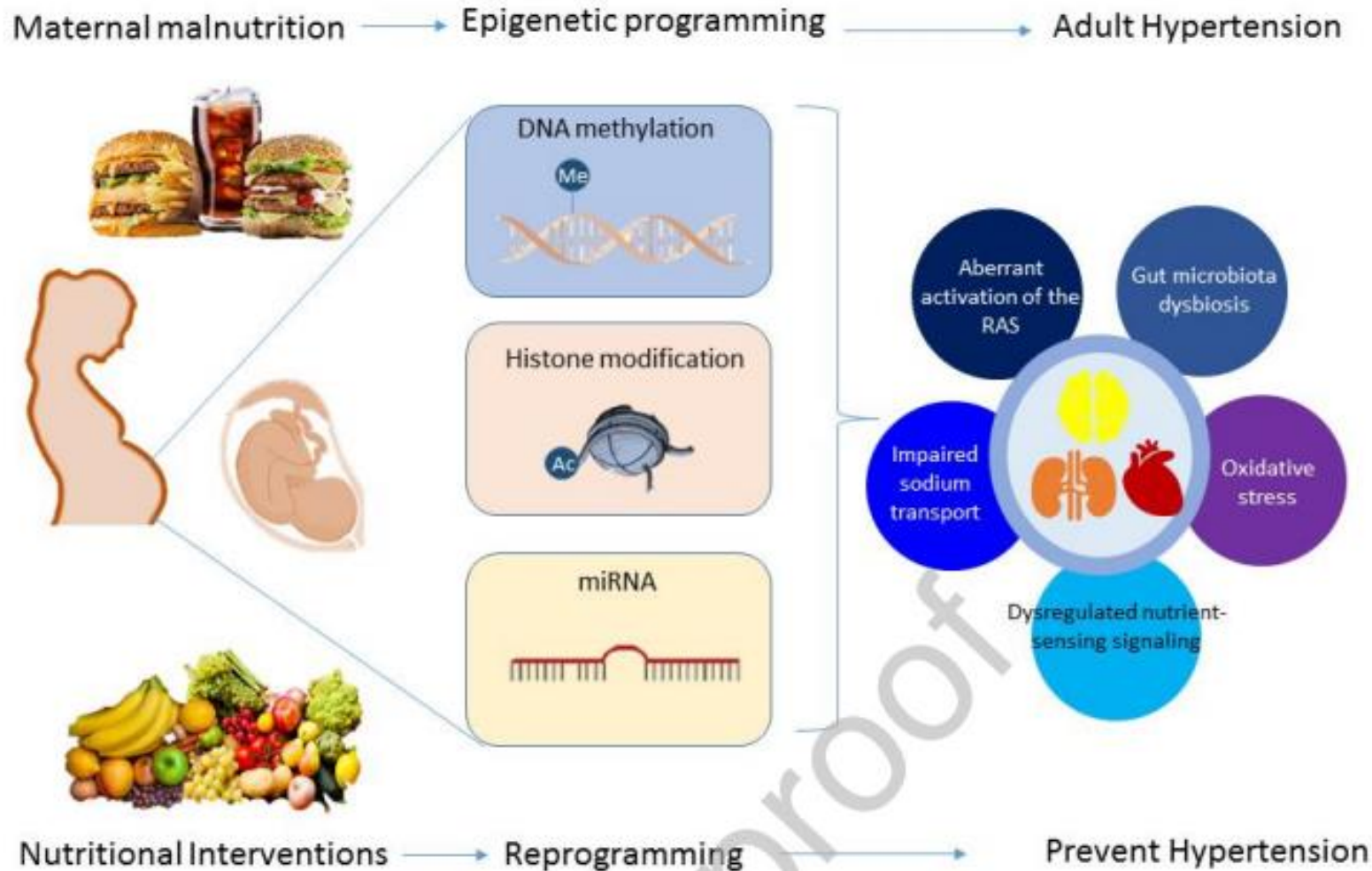
Epigenetic modulation of *Fgf21* in the perinatal mouse liver ameliorates diet-induced obesity in adulthood

Xunmei Yuan^{1,14}, Kazutaka Tsujimoto¹, Koshi Hashimoto², Kenichi Kawahori¹, Nozomi Hanzawa¹, Miho Hamaguchi^{1,14}, Takami Seki¹, Makiko Nawa³, Tatsuya Ehara^{1,4}, Yohei Kitamura⁴, Izuho Hatada⁵, Morichika Konishi⁶, Nobuyuki Itoh⁷, Yoshimi Nakagawa^{8,9}, Hitoshi Shimano^{8,9}, Takako Takai-Igarashi¹⁰, Yasutomi Kamei¹¹ & Yoshihiro Ogawa^{1,12,13,14}

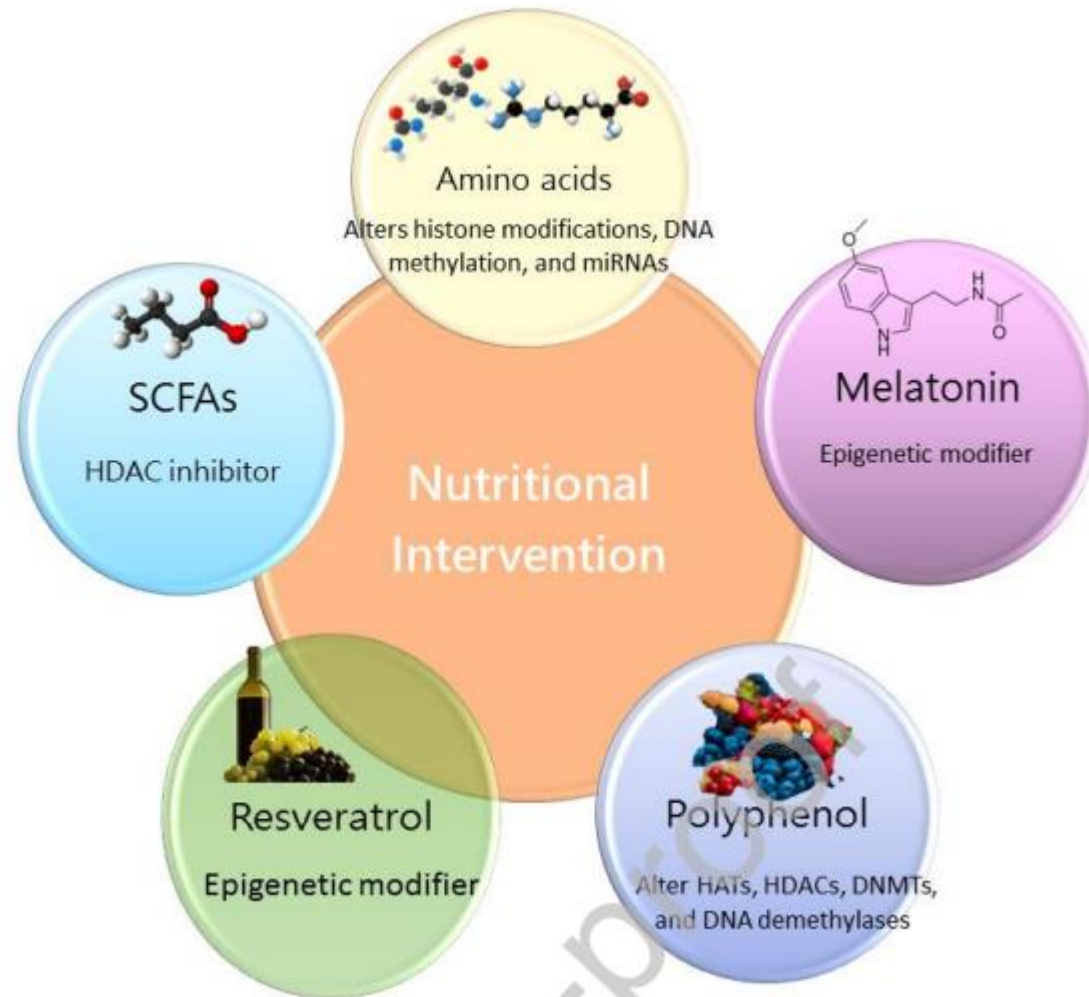
Interplay between Maternal Nutrition and Epigenetic Programming on Offspring Hypertension

You-Lin Tain , Chien-Ning Hsu

PII: S0955-2863(24)00037-8
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2024.109604>
Reference: JNB 109604



Intervence



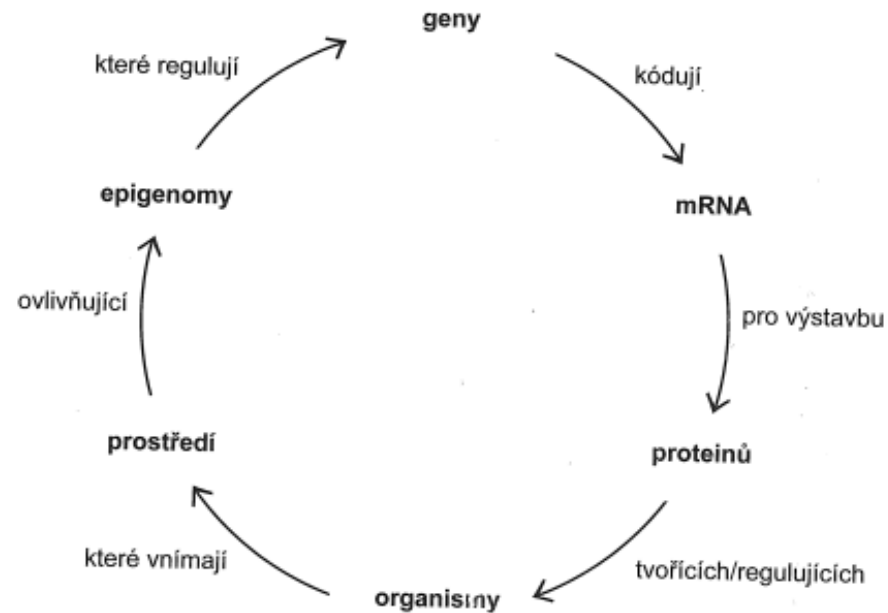
Epigenetické faktory

Proč nejsou dvojčata stejná?

John Gurdon (1958, Filadelfie) – klonování žab -> Dolly

Shinya Yamanaka (~2000) klonování myší

Odstranění epigenetických značek za pomoci proteinů a RNA přítomných ve vajíčku (použil 4 geny, *c-myc*)



Komplexní nemoci

multifaktoriální, multigenní, polygenní

roli hrají kombinace určitých genů a určitých faktorů zevního prostředí

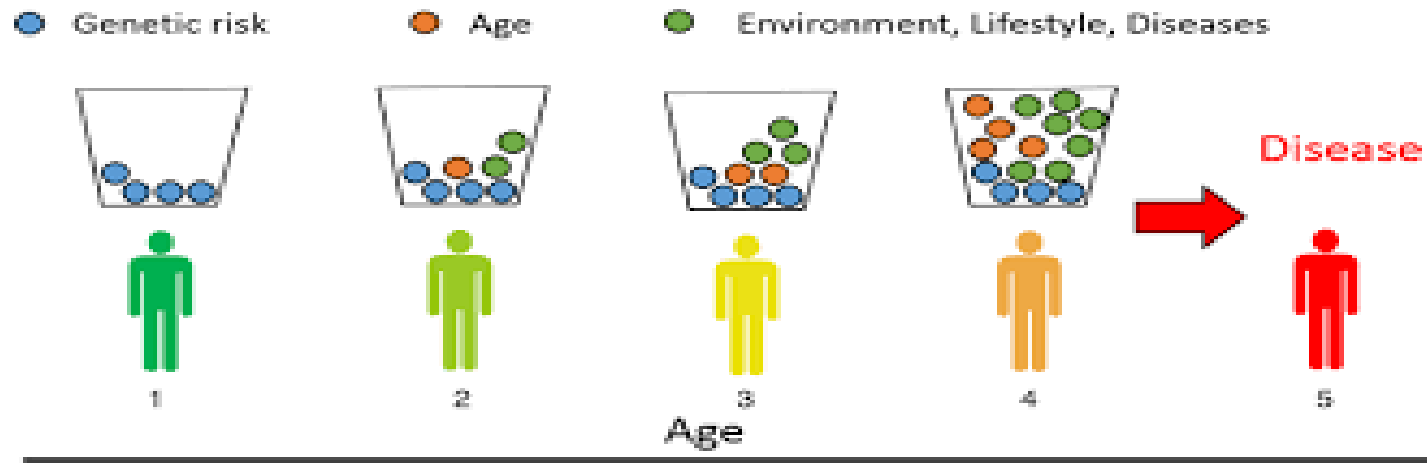
Na odhalení nejobecnějších principů genetiky multifaktoriálních nemocí se na rozdíl od genetiky nemocí mendelistických v současné době stále ještě čeká.

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.



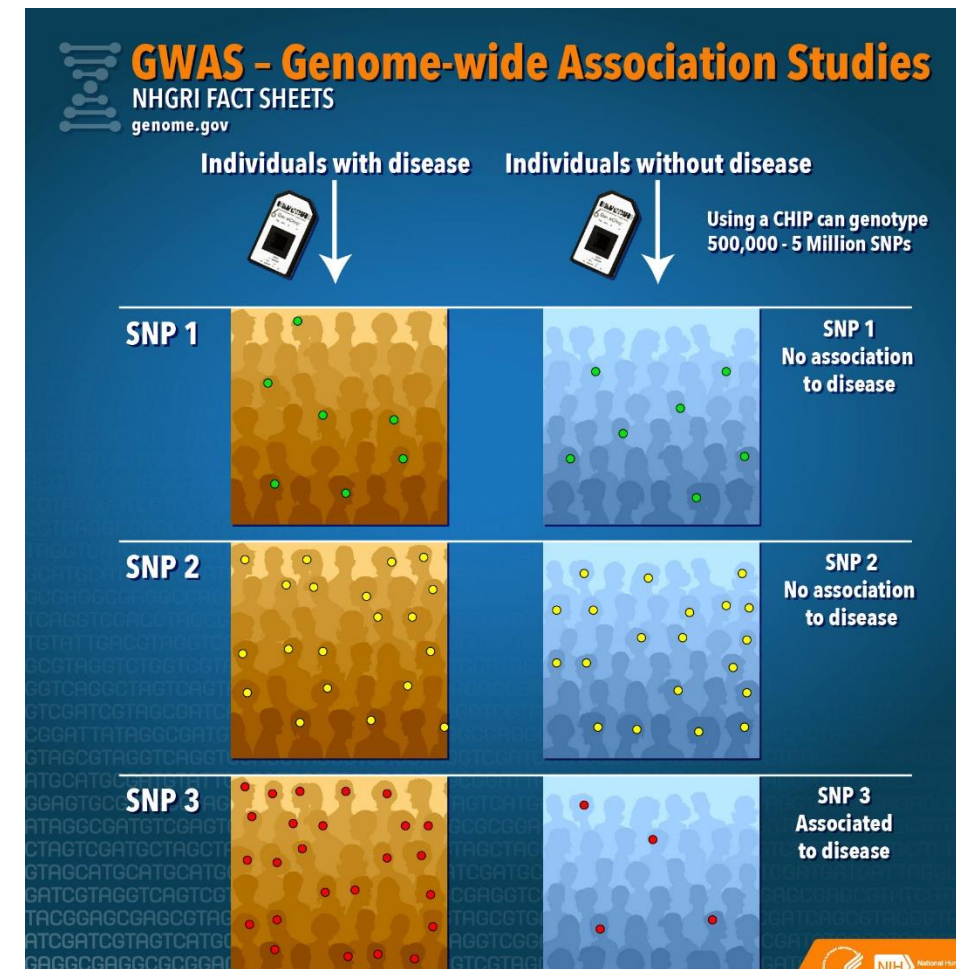
Genetické studie

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.



M U N I
M E D

Farmakogenetika

Na základě interdisciplinárního integrace znalostí farmakologie a genetiky popsat vliv dědičnosti na odpověď organismu na různé léky.

➤ **Farmakogenomika**

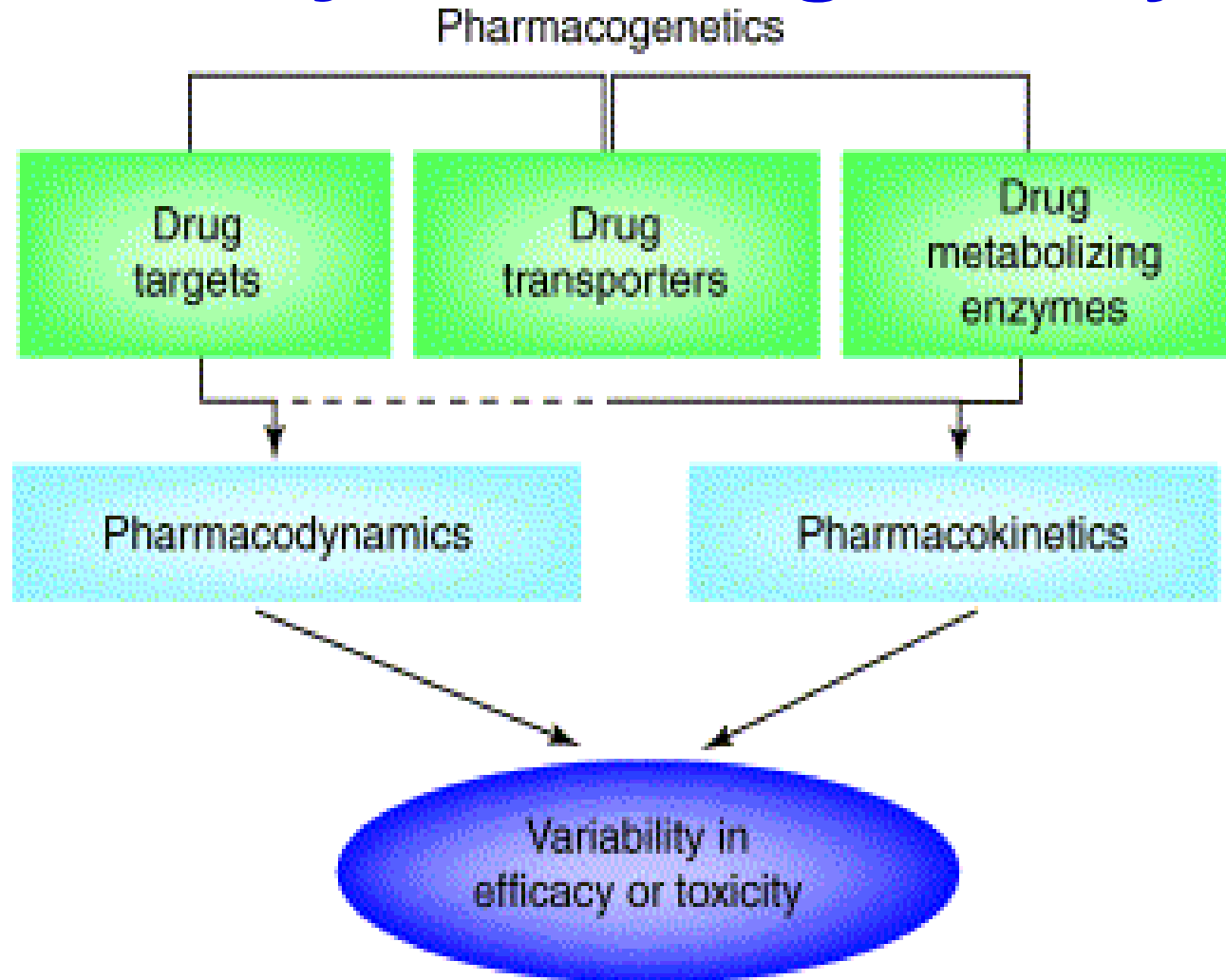
✓ **Farmakodynamika:** popisuje žádoucí či nežádoucí účinky léků na organismus

(lék → organismus)

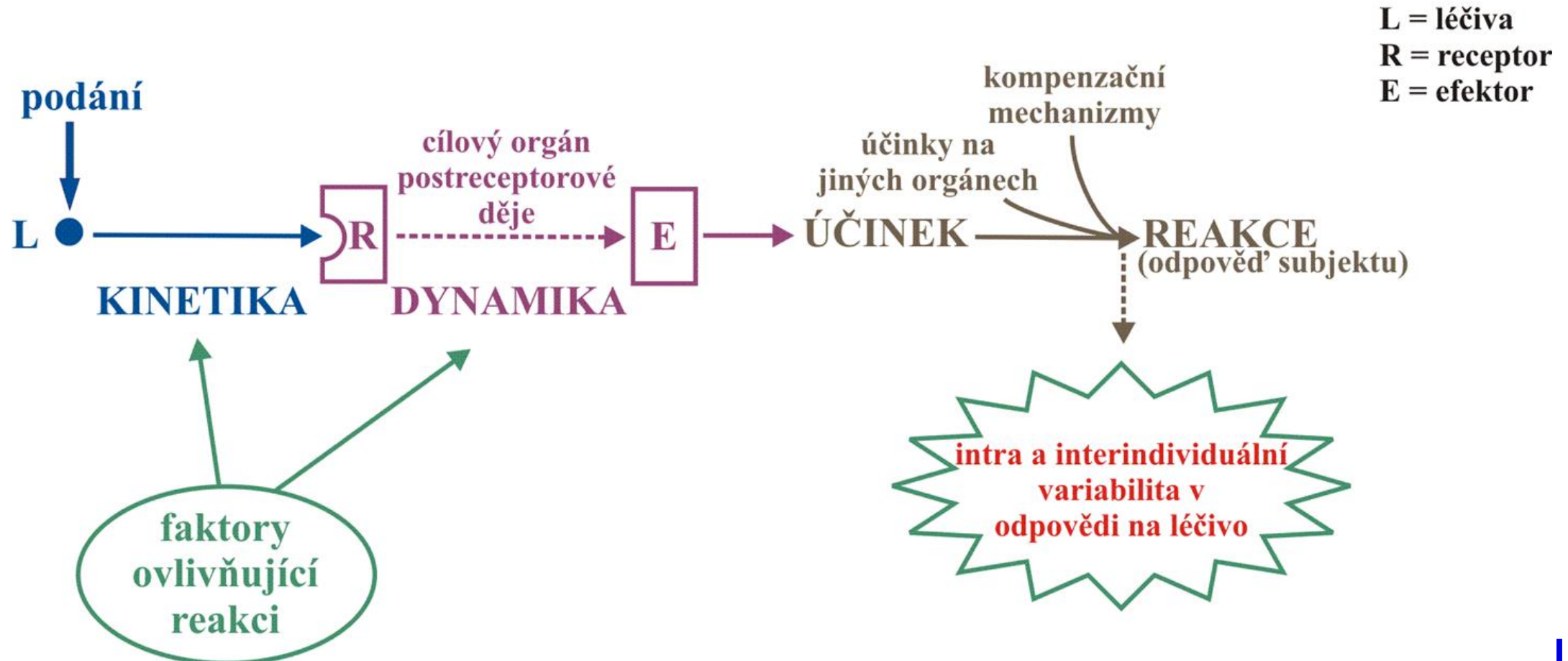
✓ **Farmakokinetika:** se zabývá hladinami léků a jeho metabolitů v různých tkáních a vstřebáváním léků, jejich distribucí, metabolismem a eliminací

(organismus → lék)

Klíčové složky farmakogenetiky



Fáze a faktory rozhodující o reakci subjektu na léčivo



Vztah ke genům

Téměř každá dráha metabolismu léku, jeho transportu nebo aktivace je ovlivněna genetickou variabilitou.

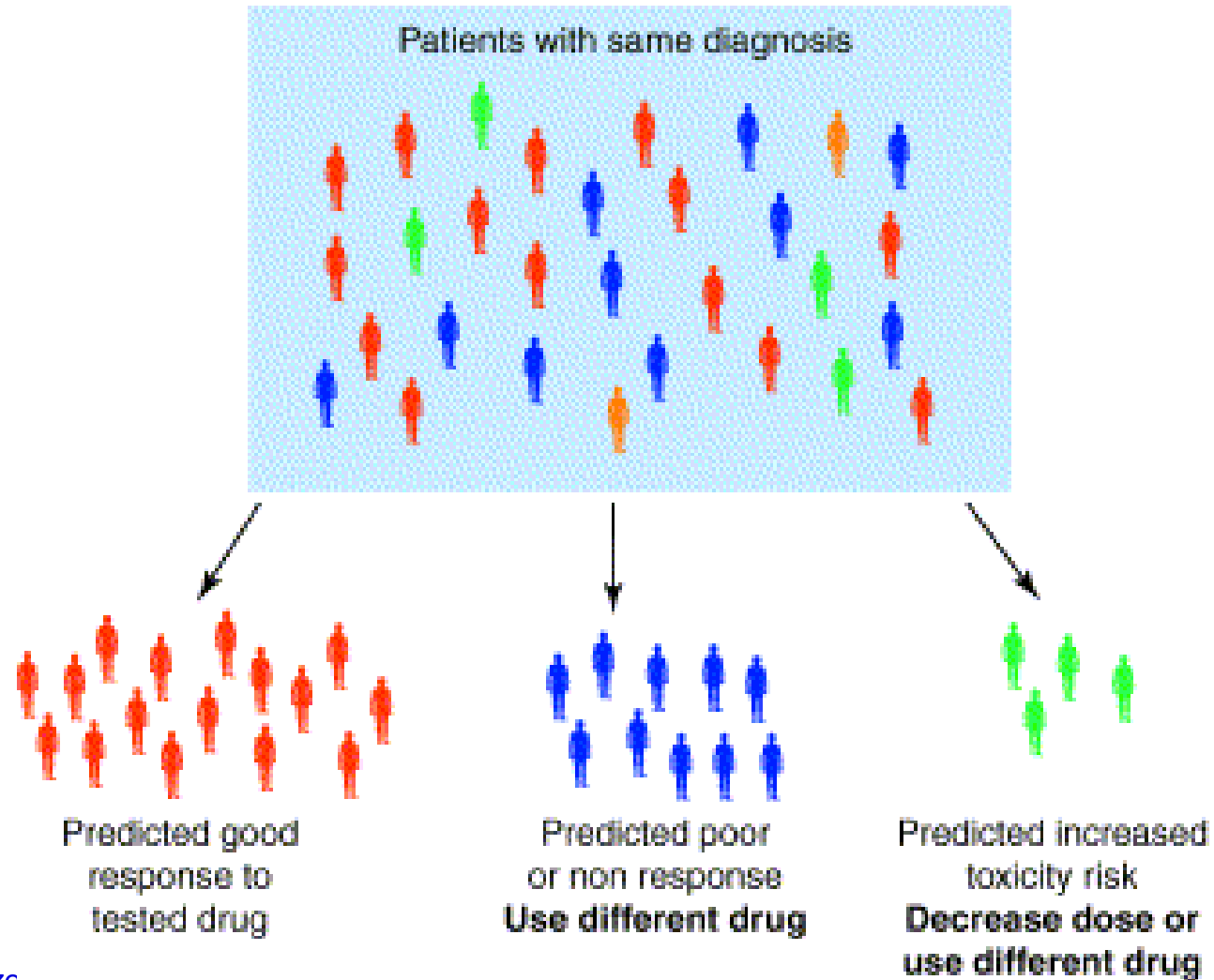
Klinická variabilita v odpovědi

Riziko vedlejších účinků

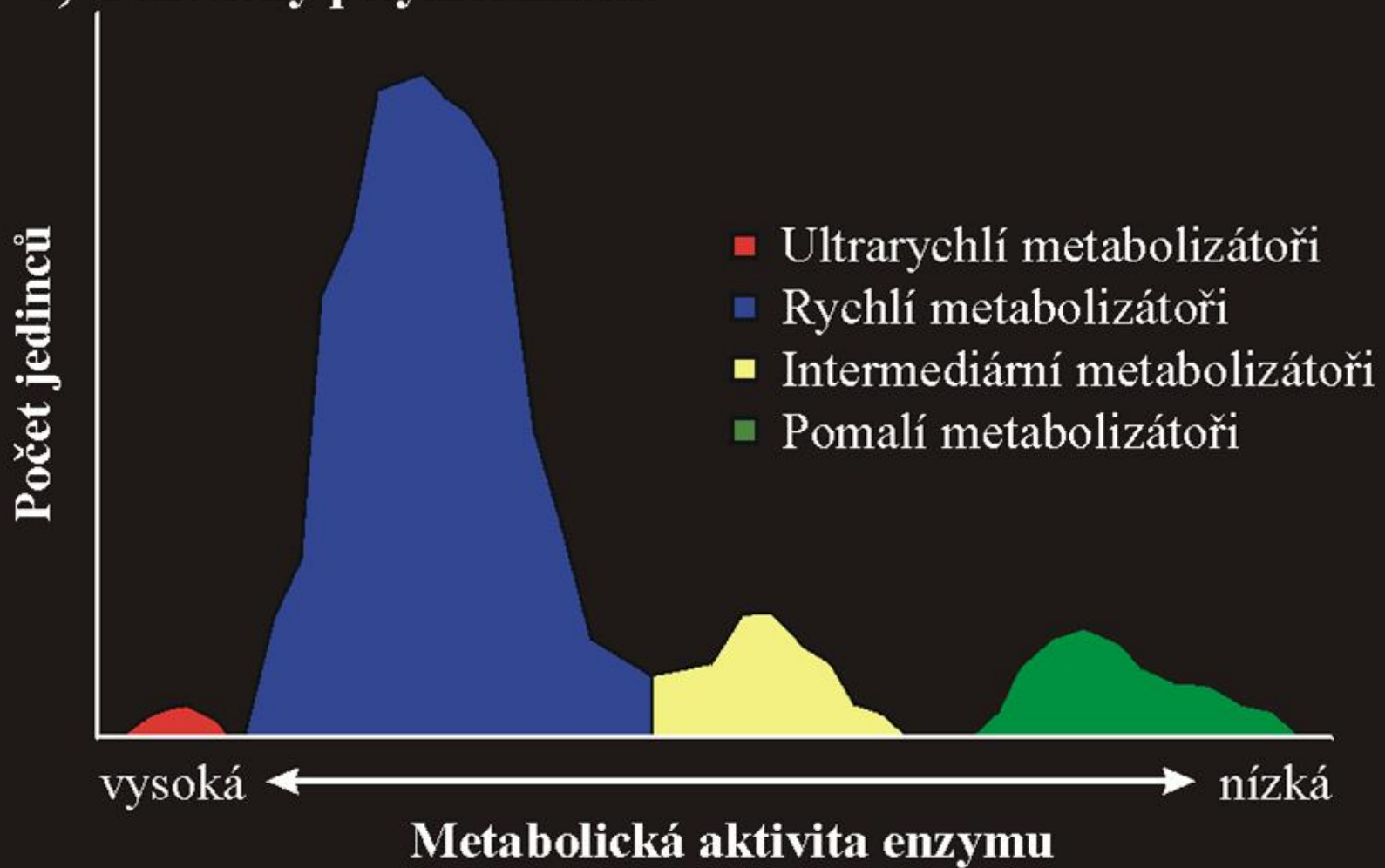
Genotypově specifické dávkování

Polymorfni cíle léku

Klinický potenciál farmakogenetiky



b) Genetický polymorfismus



Výhody klinické genetiky

- Odhalení onemocnění v raném stádiu, kdy je snadnější účinně léčit;
- Usnadnění výběru optimální léčby a omezení léčbu pokus-chyba;
- Snížení výskytu nežádoucích účinků;
- Zvýšení odpovědávosti pacienta na léčbou
- Zlepšení výběru cílů ve vývoji léků a snížit čas, náklady a selhání klinických zkoušek;
- Důraz na prevenci;
- Snížení celkových nákladů na zdravotní péči

Kolik lidských genů představuje cíle současných léků?

- 1) ~500 (5% celkového genomu)
- 2) ~1,000 (10%)
- 3) ~5,000 (25%)
- 4) ~10,000 (50%)
- 5) ~ 15,000 (75%)
- 6) ~20,000 (100%)

Metabolizace xenobiotik

CYP3A4 – 50% metabolizovaných léků

CYP2D6 – 20%

CYP2C9 + CYP2C19- 15 %

CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 a CYP2A6 byly prokázány jako funkčně polymorfní

Např. ovlivňuje metabolismus warfarinu, acenocoumarolu a dalších léků (phenytoin, tolbutamid, glipizide a další perorální antidiabetika typu sulfonylurey).

Cytochrom P₄₅₀2C9 (CYP2C9)

- dvě alelické varianty genu CYP2C9^{1, 2}
- CYP2C9*2
 - záměna C⁴³⁰T v exonu 3 vede k substituci Arg¹⁴⁴Cys
- CYP2C9*3
 - záměna A¹⁰⁷⁵C v exonu 7 vede k substituci Ile³⁵⁹Leu
- in vitro má CYP2C9*1 normální, zatímco varianta CYP2C9*2 vykazuje menší a CYP2C9*3 podstatně menší enzymatickou aktivitu^{3, 4}
- fenotypickým projevem je snížení clearance léků závislých na CYP2C9

1. Stubbins MJ et al: Pharmacogenetics 1996; 6:429-329

2. Veronese ME et al: Biochem J 1993; 289:533-8

3. Rettie AE et al: Pharmacogenetics 1994; 4:39-42

4. Haining RL et al: Arch Biochem Biophys 1996; 333:447-58

CYP2C9 ACTIVITA

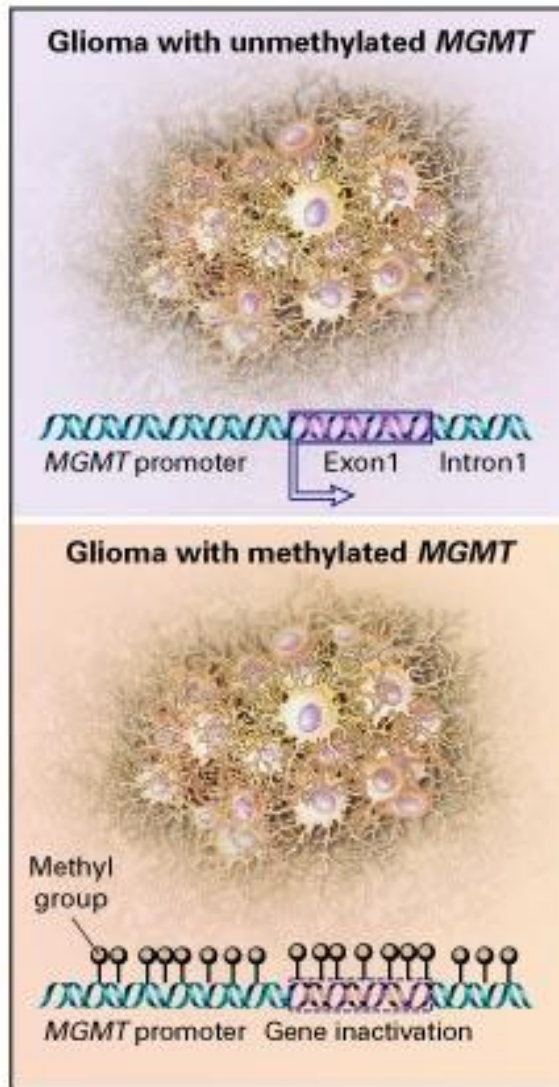
<u>Warfarin Dose*</u>	<u>Genotype</u>
5.63 (2.56)	*1/*1
4.88 (2.57)	*1/*2
3.32 (0.94)	*1/*3
4.07 (1.48)	*2/*2
2.34 (0.35)	*2/*3
1.60 (0.81)	*3/*3

From: Higashi MK, et al. Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA* 287:1690-1698, 2002.

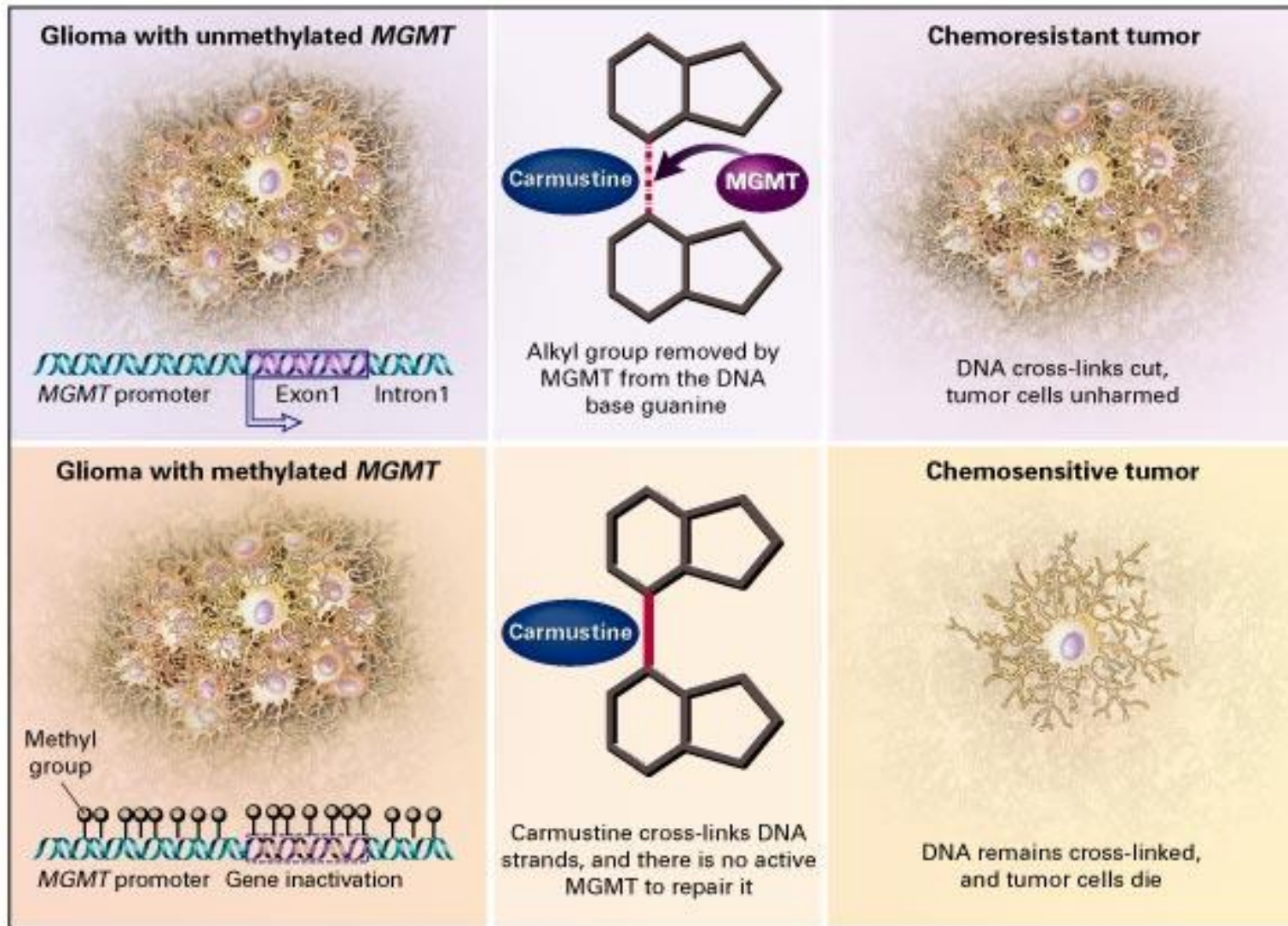
Epigenetika

MGMT – methylguanine-DNA
methyltransferase

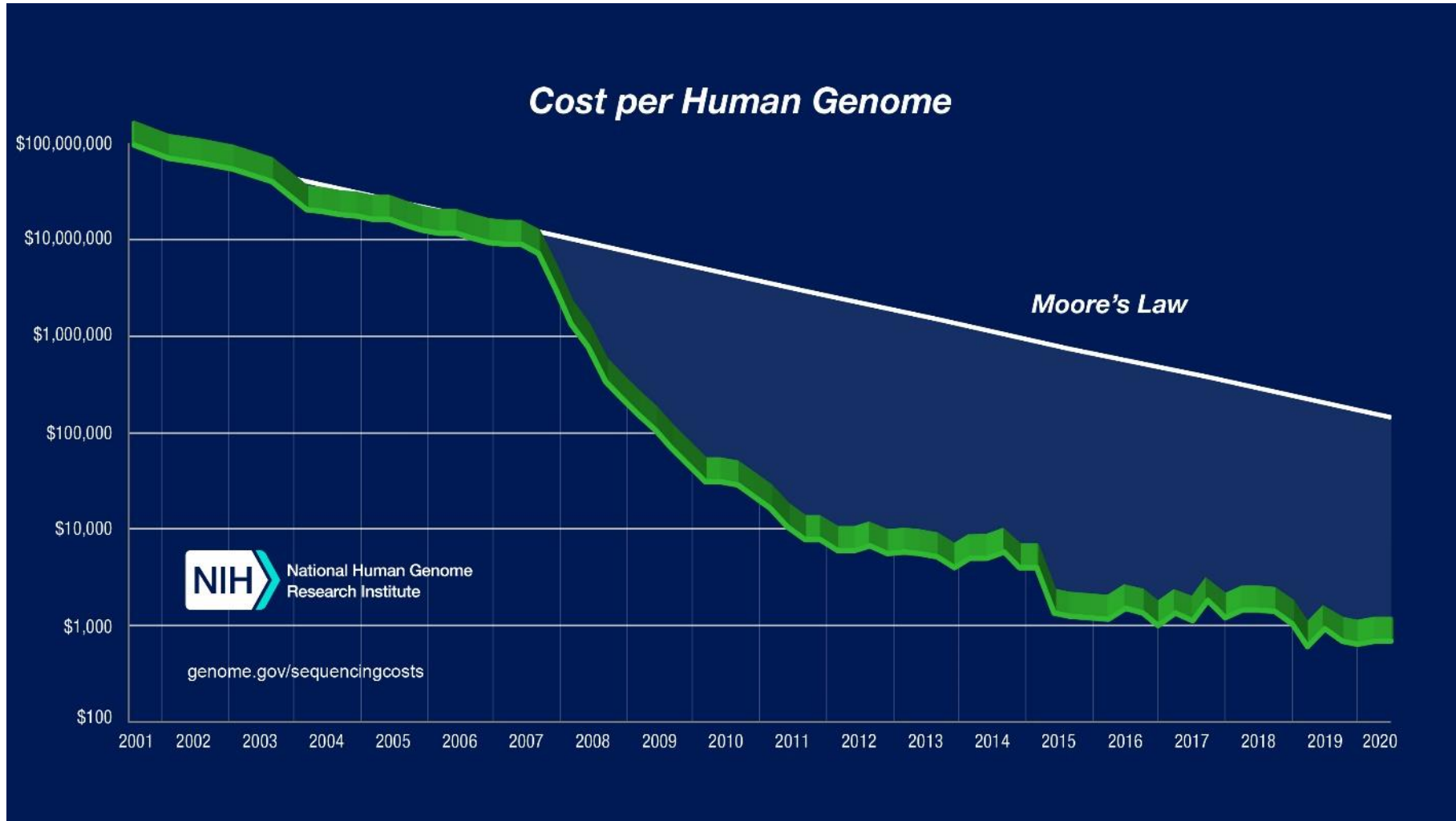
Metylatilace promotoru MGMT
silencing genu



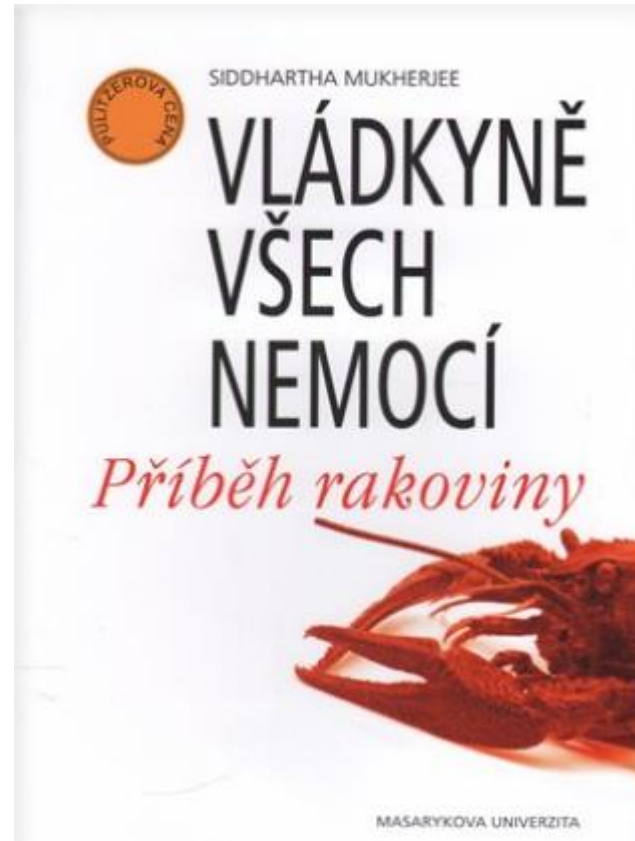
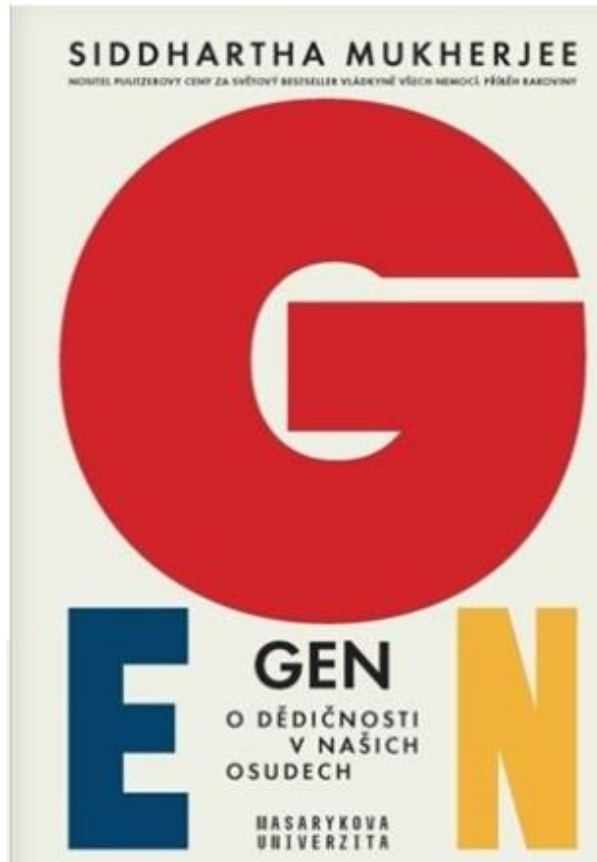
From: Esteller M, et al. Inactivation of the DNA-repair gene *MGMT* and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *NEJM* 243:1350-1354, 2000.



From: Esteller M, et al. Inactivation of the DNA-repair gene *MGMT* and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *NEJM* 243:1350-1354, 2000.



Doporučená literatura



Příběhy vědy: rakovina

Bi0001

Příběhy vědy: gen

CORE001

<https://www.ceskatelevize.cz/porady/10441294653-hyde-park-civilizace/220411058090919/>