

# Farmakogenetika

PřF

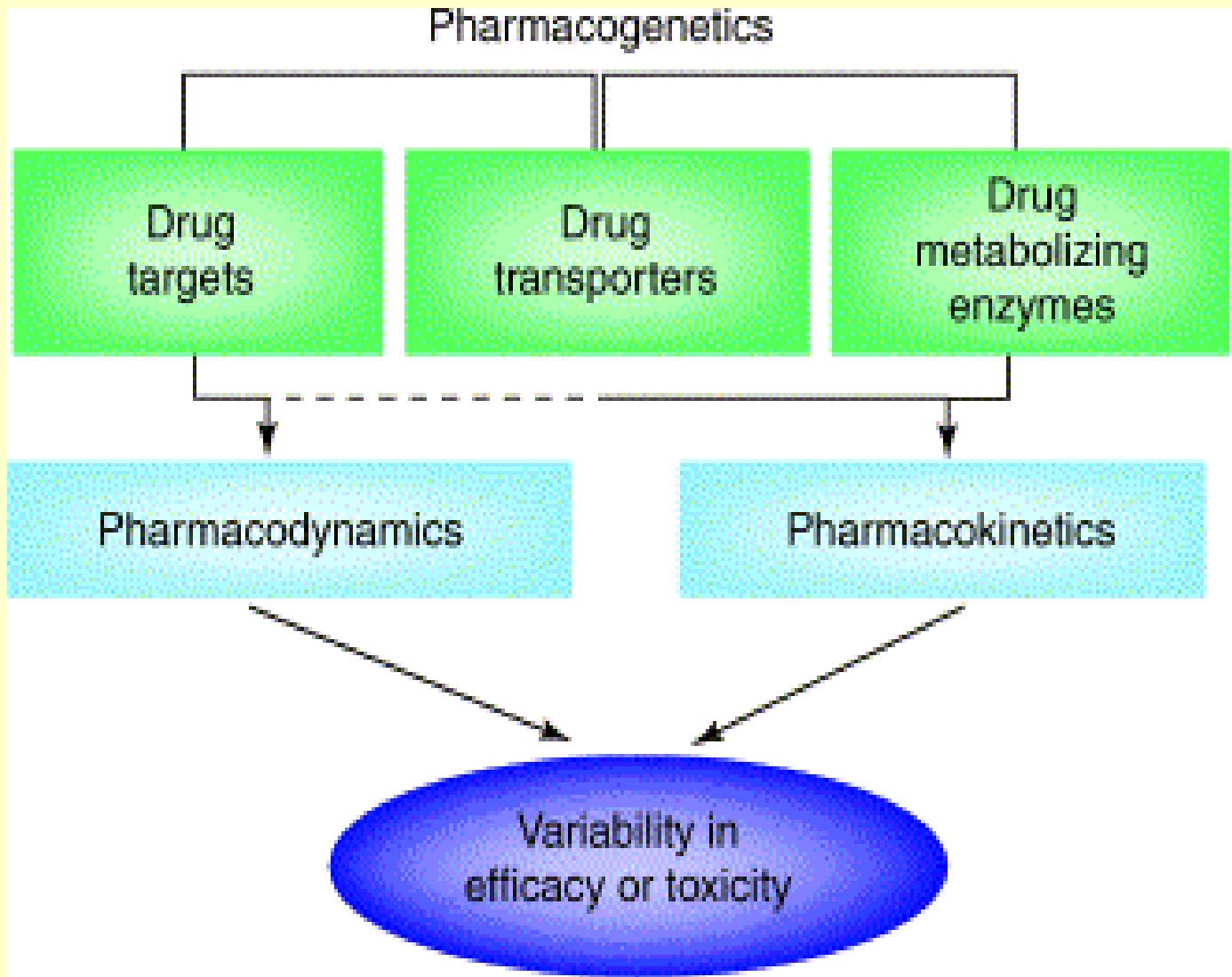
1.12.2006



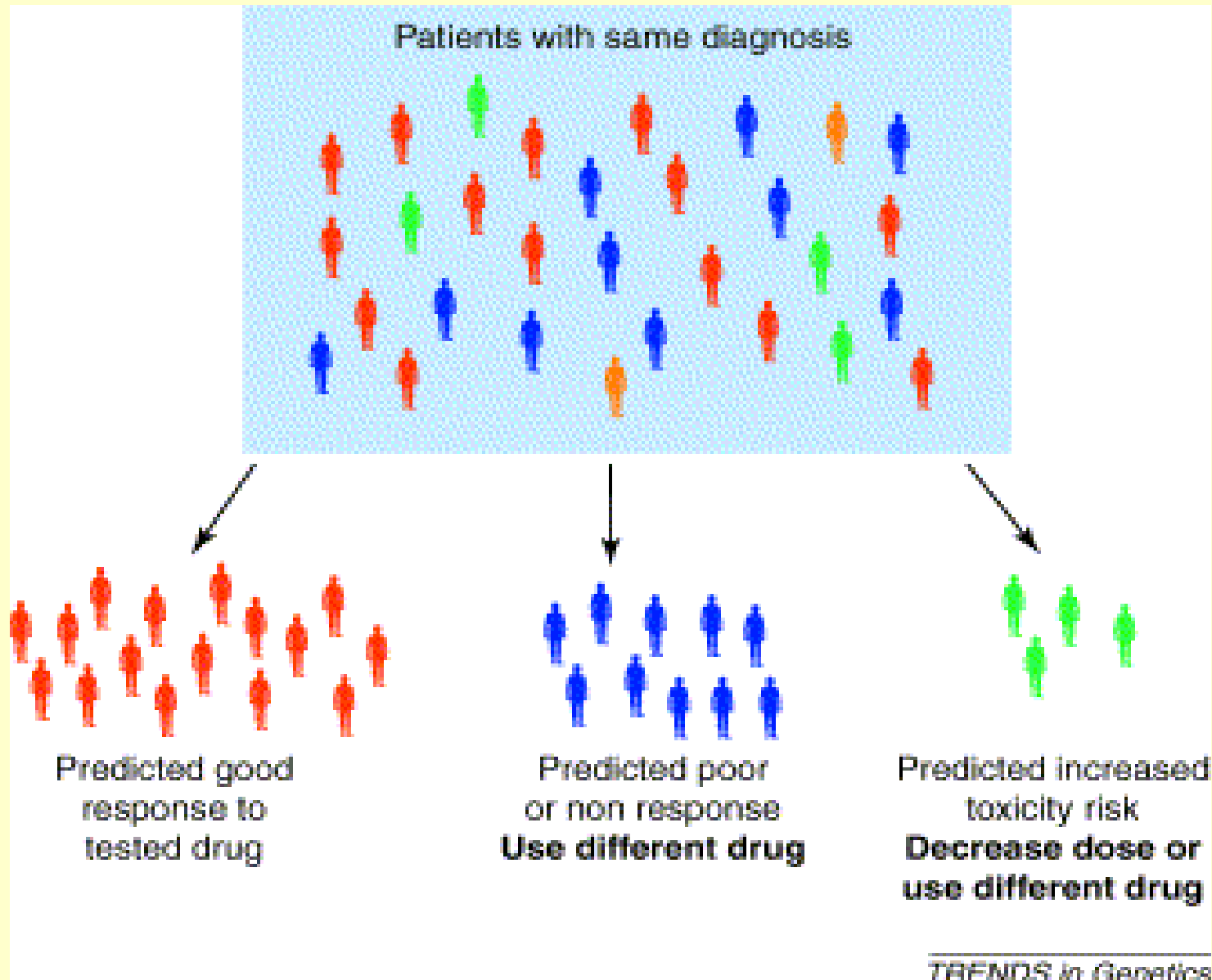
# Cíl

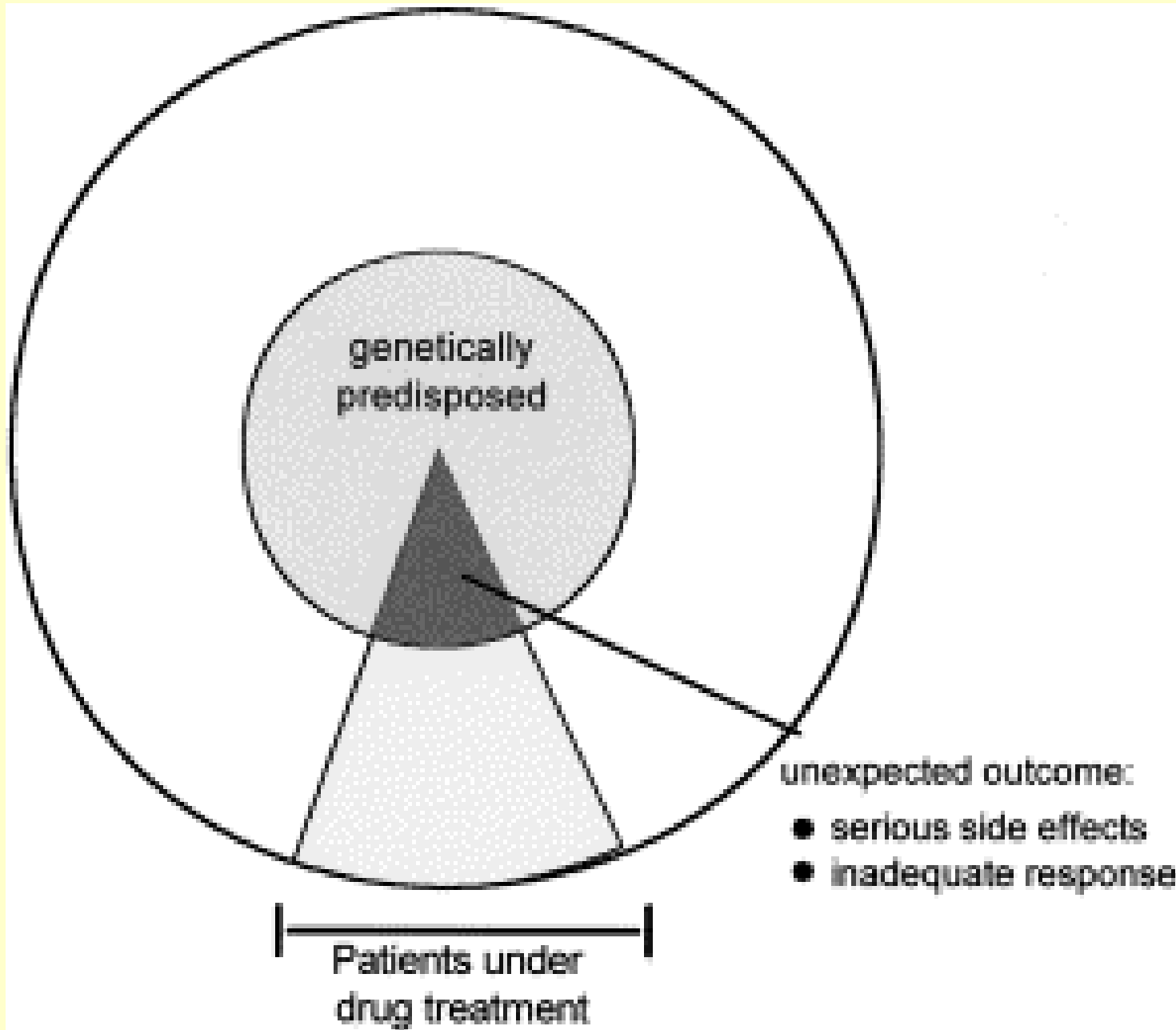
- Na základě interdisciplinárního integrace znalostí farmakologie a genetiky popsat vliv dědičnosti na odpověď organismu na různé léky.
- Farmakogenomika
- Farmakodynamika: popisuje žádoucí či nežádoucí účinky léků na organismus  
(lék → organismus)
- Farmakokinetika: se zabývá hladinami léků a jeho metabolitů v různých tkáních a vstřebáváním léků, jejich distribucí, metabolismem a eliminací  
(organismus → lék)

# Klíčové složky farmakogenetiky



# Klinický potenciál farmakogenetiky





# 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 + CYP2C19- 15 %
- CYP2D6, CYP2D9, CYP2C19 a CYP2A6 byly prokázány jako funkčně polymorfní

# Změny metabolické aktivity způsobené polymorfismy v CYP2D6 a CYP2C19 umožňují zařadit osoby

do 4 hlavních skupin:

Typ metabolismu	Metabolismus léku	Metabolismus prekurzoru léku
Extenzivně metabolizující	“Normální” metabolizace a optimální přínos standardních dávek léku	“Normální” metabolizace a optimální přínos standardních dávek léku
Středně metabolizující	Snížená metabolizace léku Možnost toxické akumulace a vedlejších účinků při standardních dávkách	Neadekvátní transformace prekurzorů léku do aktivních metabolitů. Redukce účinku standardní dávky
Špatně metabolizující	Omezená nebo žádná metabolizace léku, takže hladiny jsou často toxické. Vysoké riziko vedlejších účinků léku při standardních dávkách.	Neschopnost transformovat prekurzor léku na aktivní metabolit, takže terapeutický efekt je minimální nebo žádný.
Zvláště rychle metabolizující	Rychlá metabolizace, takže cirkulující hladiny léku rychle klesají pro terapeutickou úroveň, takže se nedostavuje adekvátní terapeutický efekt při standardních dávkách.	Rychlá konverze prekurzoru léku. Toxické hladiny a vedlejší účinky při standardních dávkách léku.





# CYP2D6 a CYP2C19

- CYP2D6- Metabolizující enzym (dealkylace, hydroxylace) -psychiatrie, kardiologie
- 160 variant (Ch22)
- CYP2C19- protikřečové léky, inhibitory protonových pump, benzodiazepiny, antimalarika
- 20 variant (Ch10) s funkční nedostatečností (CYP2C19\*2 a CYP2C19\*3-splice site defekty, stop kodony)



# AmpliChipCYP450 test CYP2D6 a CYP2C19

Fenotyp	Alely
EM	Nejméně jedna a ne více než 2 normální funkční alely
SM	Jedna alela s redukovanou aktivitou a jedna nulová alela
ŠM	Dvě nulové alely
ZRM	Mnohočetné kopie funkčních alel



# Receptory signálních molekul účastnících se v patofyziologii nemoci

- **G-protein coupled receptors:**
- **$\beta$ -1 a  $\beta$ -2 adrenergní receptory**
- **Receptor pro cholecystokinin 2 (CCK2)**
- **Mu 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 <i>O</i> <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>	Polymorphism	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	0.25–0.47	β-agonists	Bronchodilation and cardiovascular responses to β-agonists	[37,38]
	Arg16Gly	0.41–0.54			
<i>DRD3</i>	Gln27Glu	0.07–0.35	Antipsychotics	Differential antipsychotic efficacy, antipsychotic-induced tardive dyskinesia and acute akathisia	[39–41]
	Ser9Gly	0.30–0.70			
<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	0.04–0.16	Tacrine, statins	Differential drug efficacy	[47–49]
	ε3 Cys130 and Arg176	0.60–0.85			
	ε4 Arg130 and Arg176	0.09–0.25			
<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

- Farmakogenomická vs. obvyklá péče
- Studie dokládající dostatečný stupeň variability k predikci klinické užitečnosti
- Studie na vhodných populacích, které odpovídají klinickým případům
- Vylepšení koncepce klinických studií
- Funkční studie *in vitro*
- Sekvenční variabilita kandidátních genů

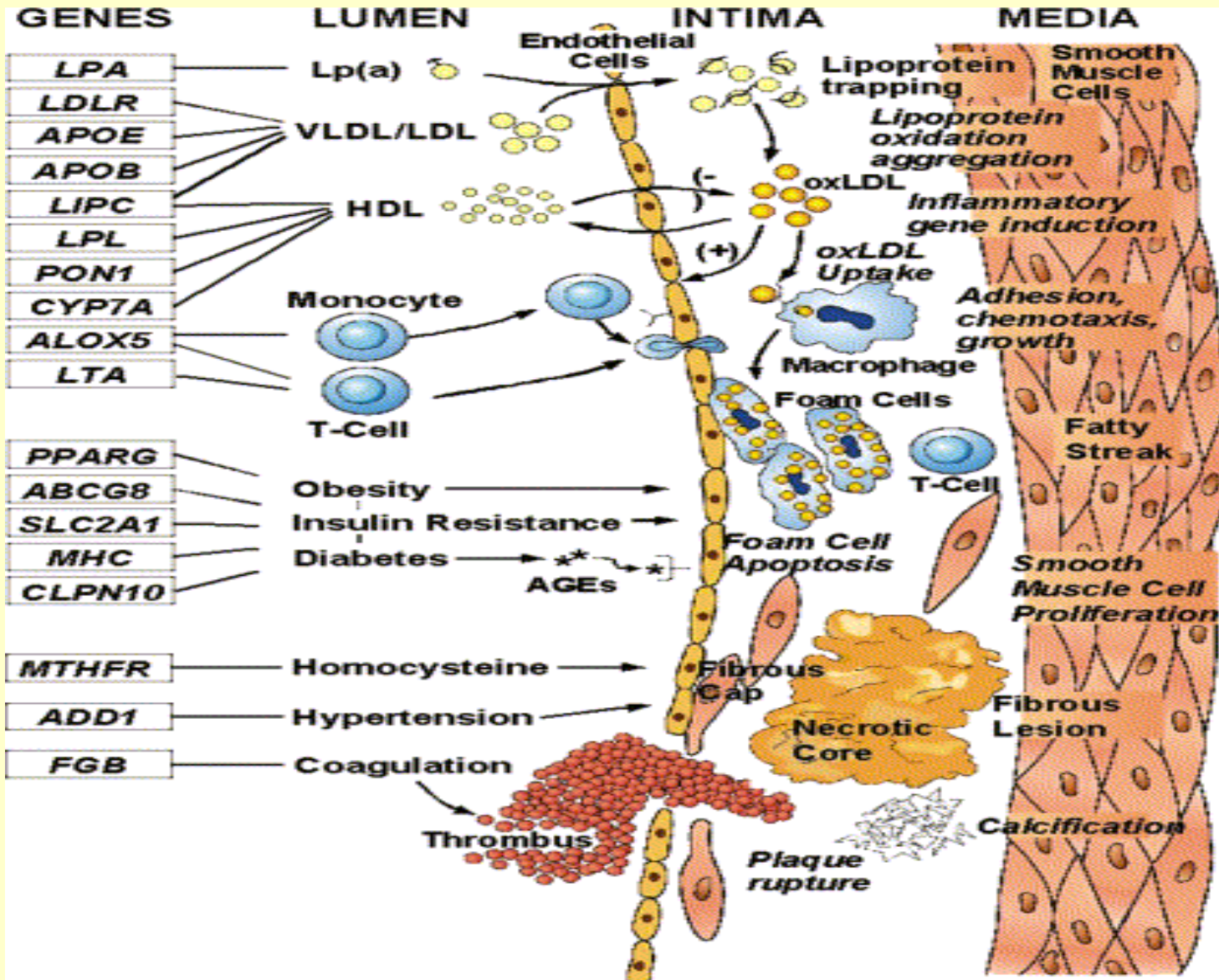


# Hodnocení významu genetických faktorů u multigenních nemocí- 10 otázek

- 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 účastní?
- 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>a</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

---



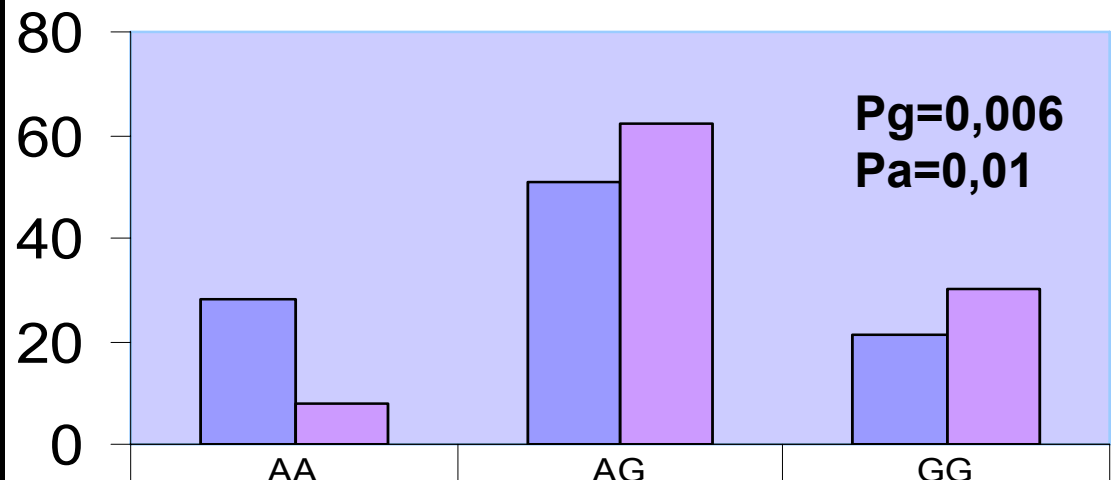
# Kandidátní geny - asociace

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

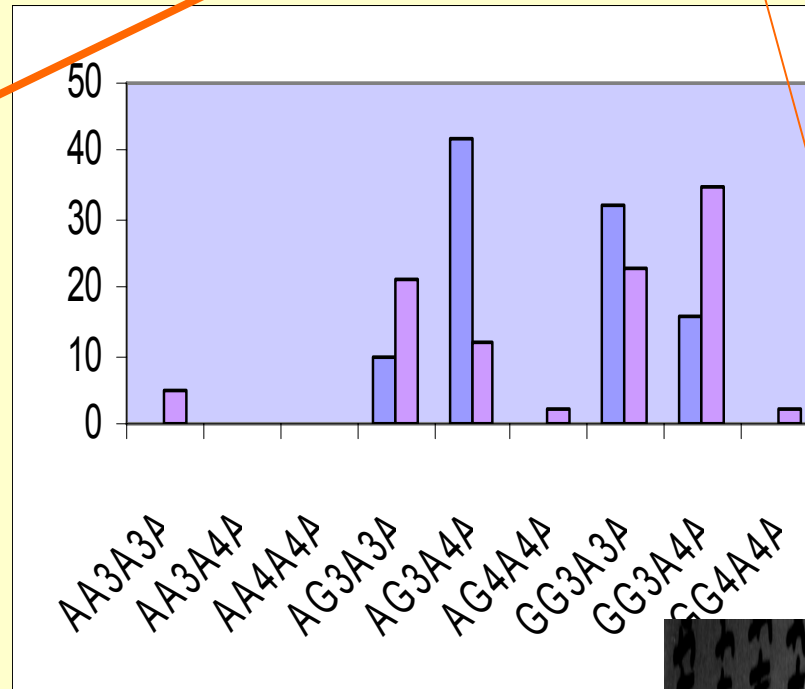
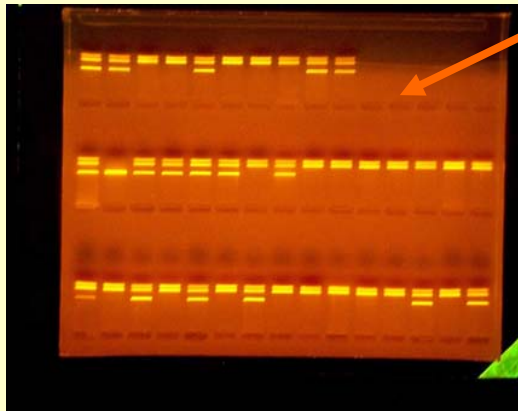
30

■ 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, v tisku

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

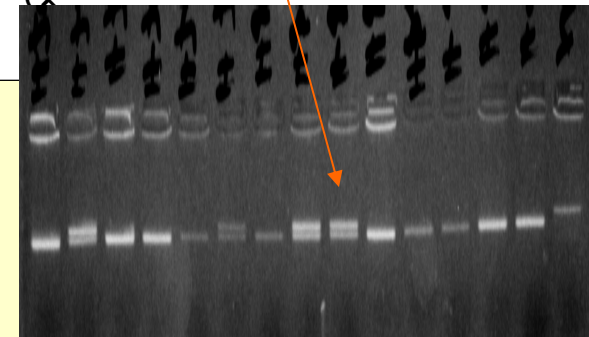


Asociovaný genotyp AG3A4A nese 5x vyšší OR pro chronické srdeční selhání ve skupině s nízkou hladinou big endothelinu oproti skupině pacientů s vysokou hladinou:

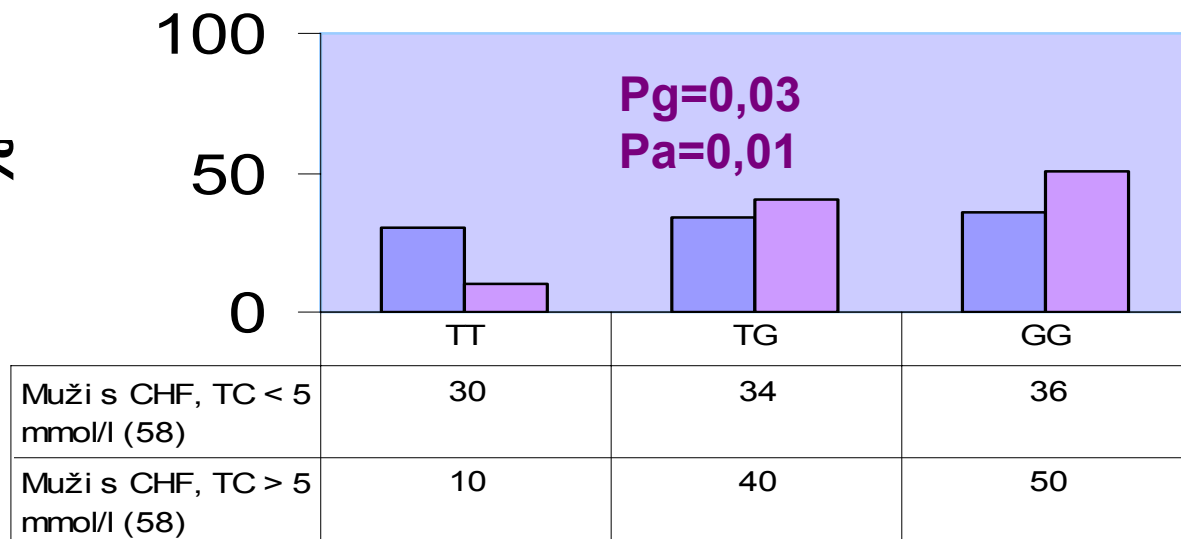
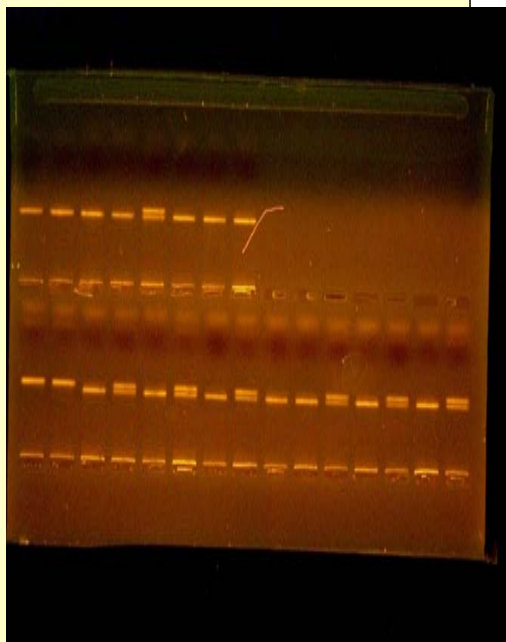
**OR = 5,38;**

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

**P = 0,005**



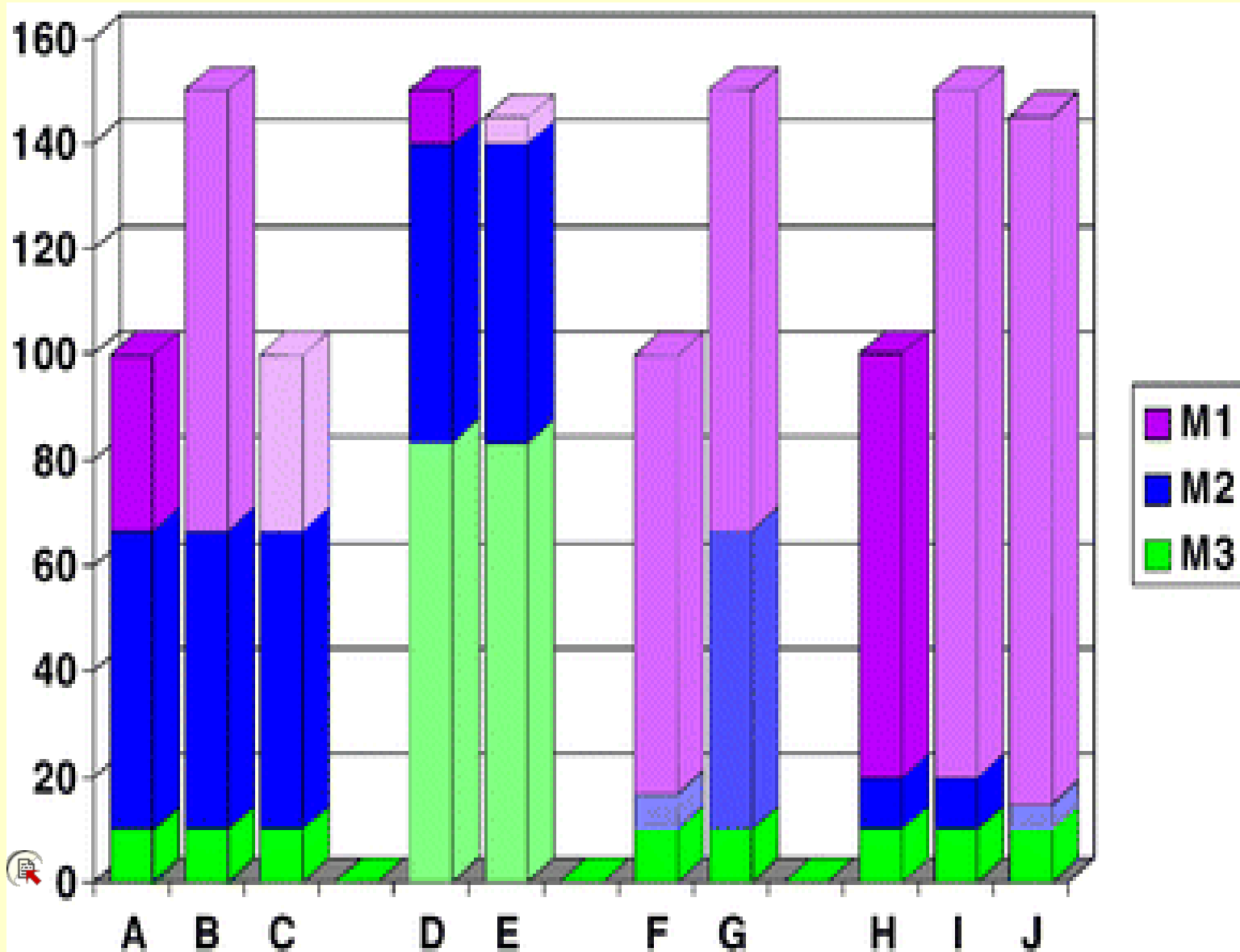
# Chronické srdeční selhání Polymorfismus -790T/G v genu pro MMP-2 Celkový cholesterol



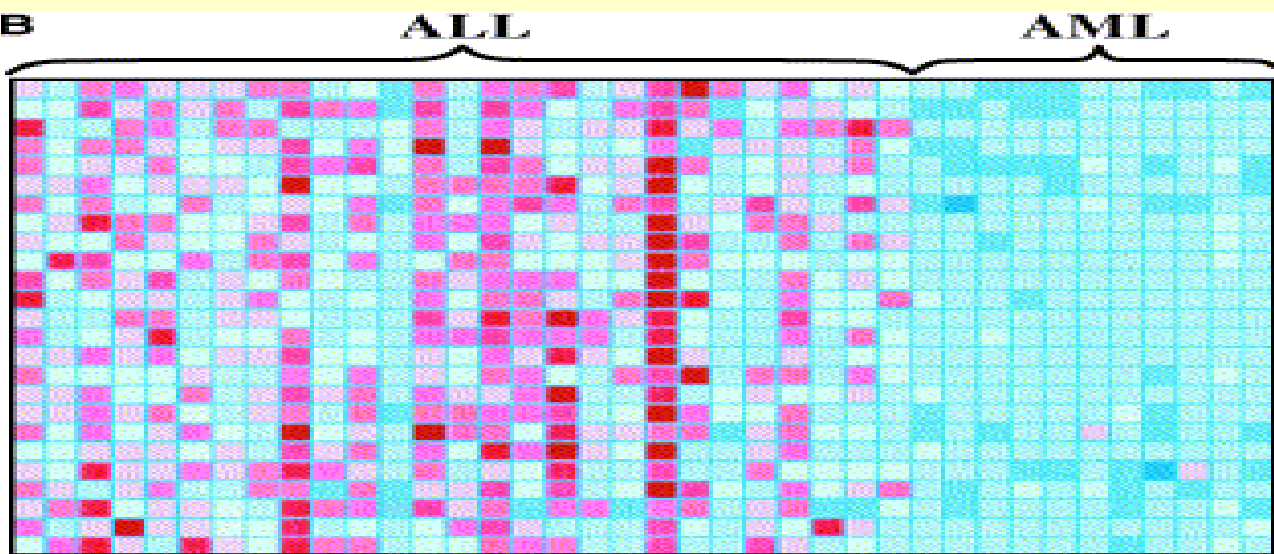
- Muži s CHF, TC < 5 mmol/l (58)
- Muži s CHF, TC > 5 mmol/l (58)

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**

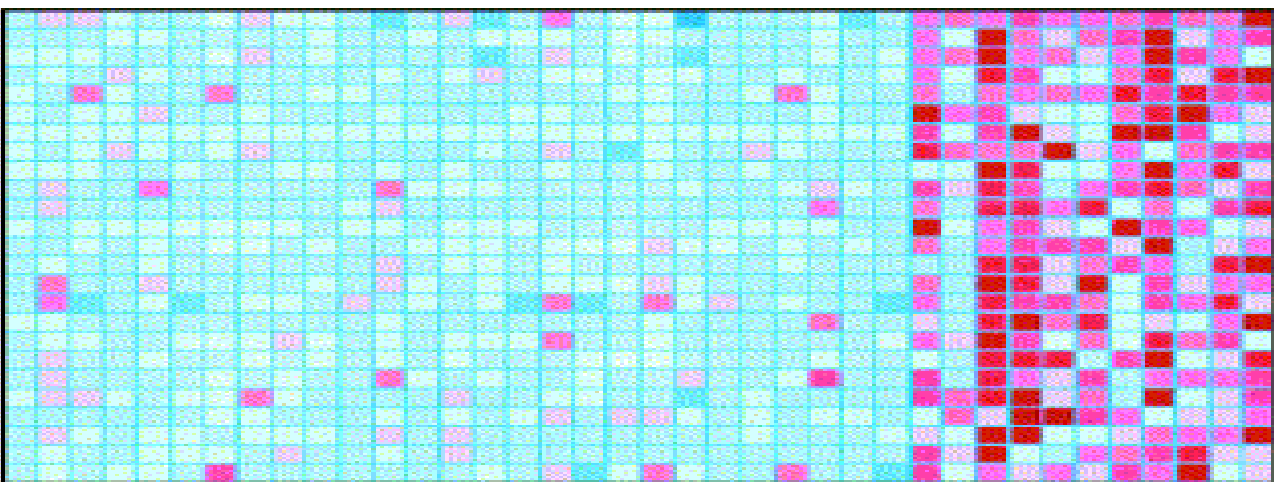
## Model terapie hypertenze (podle Lindpaintnera, březen 2003)



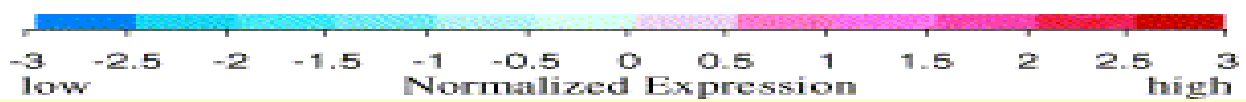
# Geny odlišující ALL od AML



- C-myc (U22376)
- Proteasome Iota (X59417)
- MB-1 (U05259)
- Cyclin D3 (M92287)
- Myosin light chain (M31211)
- RbAp48 (X74262)
- SNF2 (D26156)
- Hkr1-1 (S50223)
- E2A (M31523)
- Inducible protein (L47738)
- Dynein light chain (U32944)
- Topoisomerase II  $\beta$  (Z15115)
- IRF2 (X15949)
- TFIIIB (X63469)
- Acyl-Coenzyme A dehydrogenase (M91432)
- SNF2 (U29175)
- (Ca<sup>2+</sup>)-ATPase (Z69881)
- SRP9 (U20998)
- MCM3 (D38073)
- Deoxyhypusine synthase (U26266)
- Op 18 (M31305)
- Rabaptin-5 (Y08612)
- Heterochromatin protein p25 (U35451)
- IL-7 receptor (M29696)
- Adenosine deaminase (M13792)



- Fumarylacetoacetate (M55150)
- Zyxin (X95735)
- LFC4 synthase (U50136)
- LYN (M16058)
- HoxA9 (U82759)
- CD33 (M23197)
- Adipsin (M84526)
- Leptin receptor (Y12670)
- Cystatin C (M27891)
- Proteoglycan 1 (X17042)
- IL-8 precursor (Y00787)
- Azurocidin (M96326)
- p62 (U46751)
- CyP3 (M80254)
- MCL1 (L08246)
- ATPase (M62762)
- IL-8 (M28130)
- Cathepsin D (M63138)
- Lectin (M57710)
- MAD-3 (M69043)
- CD11c (M81695)
- Ebp72 (X85116)
- Lysozyme (M19045)
- Properdin (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.

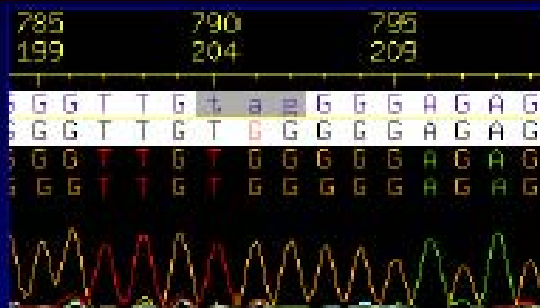
# Analýza SNP

 Hmotnostní  
spektrometrie

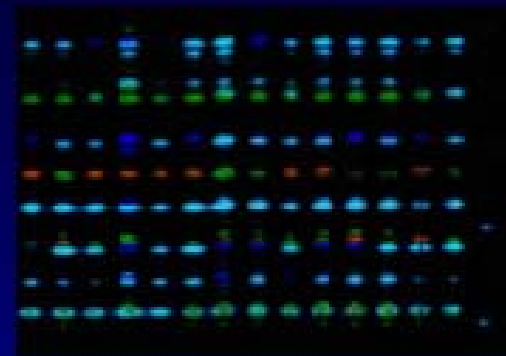
 Fluorescenční metody



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



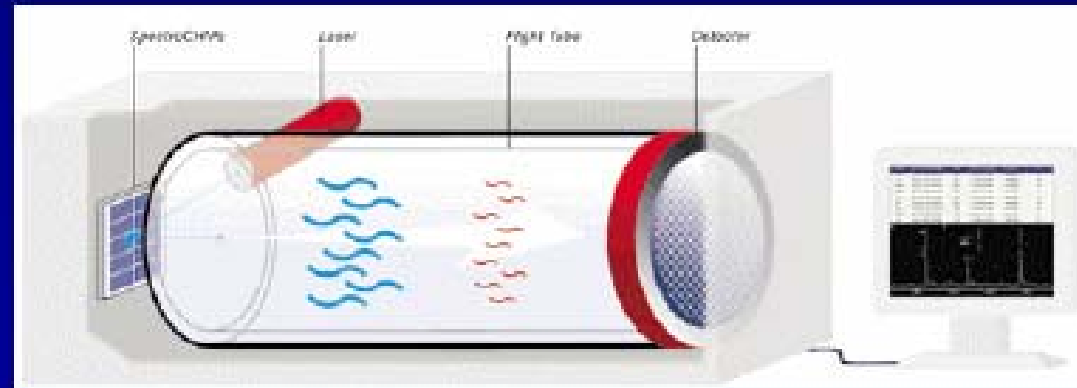
Automated capillary  
DNA sequencers



Multiplex SBE  
Single base extension



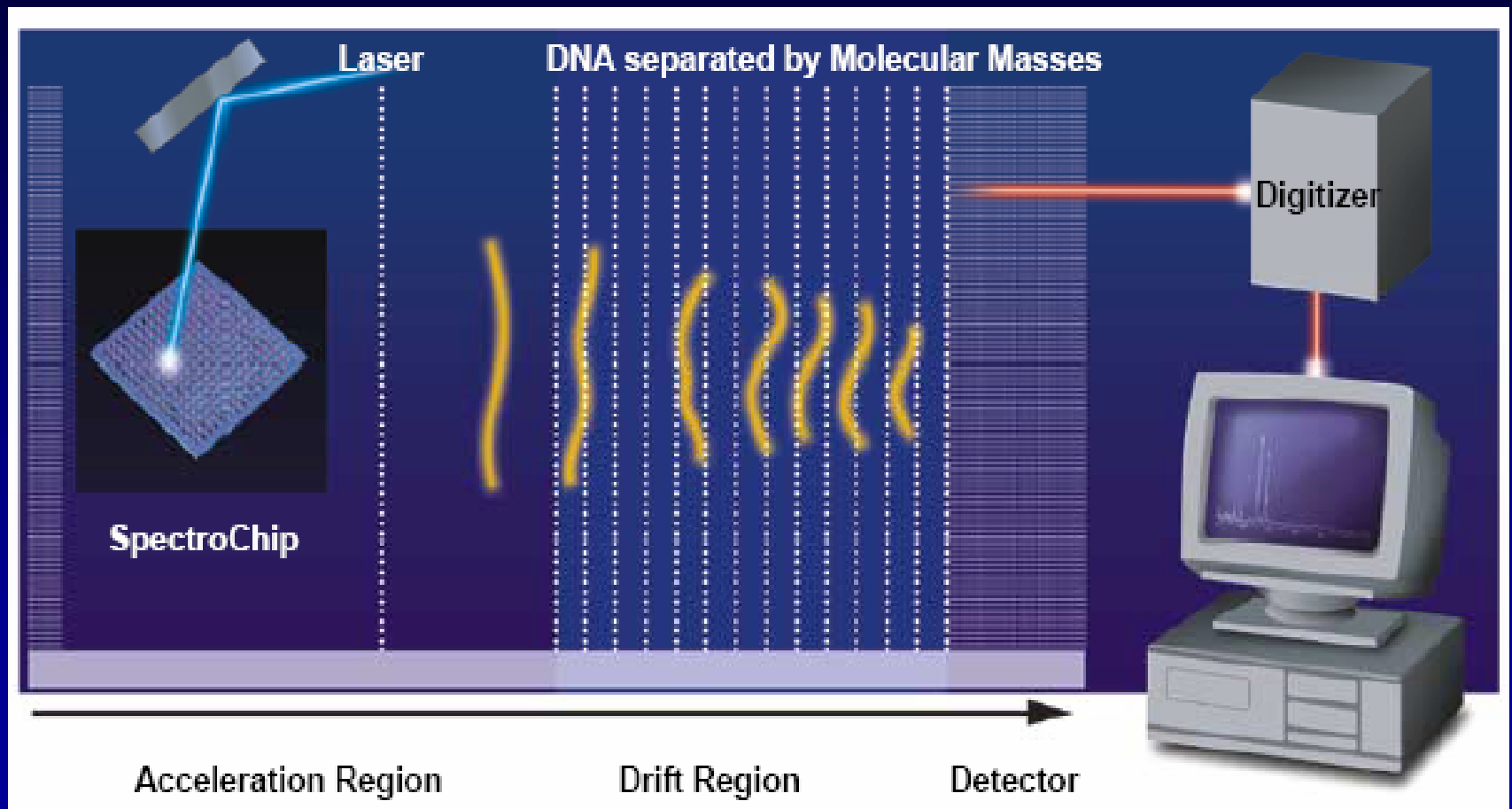
DNA chips



MALDI-TOF Mass Spectrometry

# MALDI-TOF MS

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

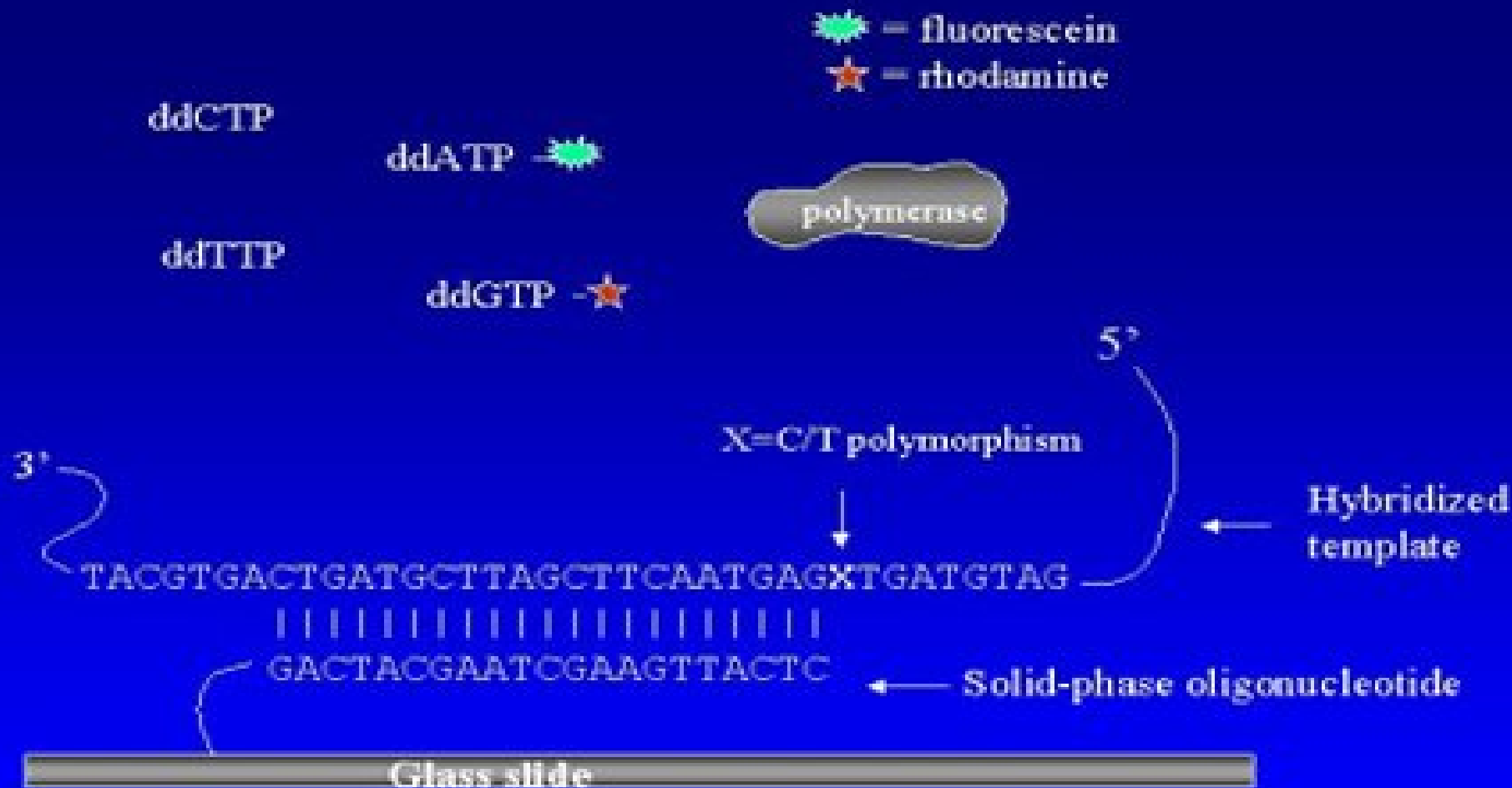


# Kroky minisekvenace

- Multiplex PCR genomové DNA
- Příprava single strand templátů
- Annealing templátů na primery, vázané na solidní fázi
- Minisekvenace na array
- Měření inkorporovaných dNTP



# Minisekvenace pomocí fluorescenčně značených ddNTP- genotypizace polymorfismu na templátové DNA

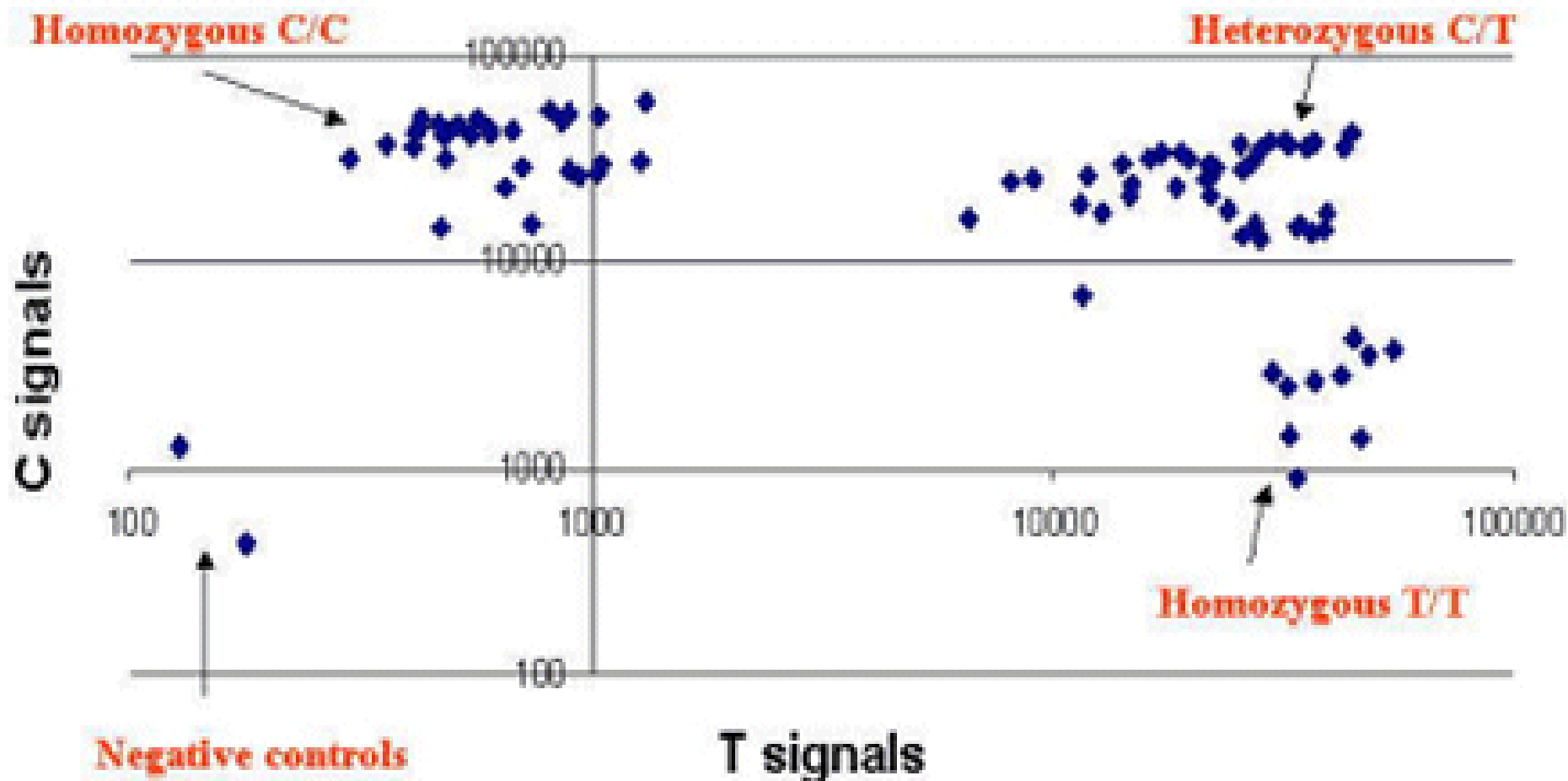


# Příklady použití minisekvenace

- Zetterberg M, Tasa G, Prince JA, Palmer M, Juronen E, Veromann S, Teesalu P, Karlsson JO, Blennow K, Zetterberg H.  
**Methylenetetrahydrofolate Reductase Genetic Polymorphisms in Patients With Cataract.** Am J Ophthalmol. 2005 Nov;140(5):932-934
- PURPOSE: Hyperhomocysteinemia is commonly associated with polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene. The level of homocysteine can be lowered by dietary intake of folate. A protective effect of folate supplementation has been reported against cataract. Here we investigate MTHFR polymorphisms in human cataract. DESIGN: Retrospective case-control association study. METHODS: Patients with nuclear (n = 77), cortical (n = 155), posterior subcapsular (n = 119), and mixed (n = 151) cataract, and 187 controls were analyzed for the MTHFR 677C-->T and 1298A-->C polymorphisms using minisequencing technique. RESULTS: The wild-type MTHFR 677CC/1298AA genotype was strongly overrepresented among cataract cases (P = .003). This effect was most pronounced in the mixed cataract group (P < .001). Hyperhomocysteinemia-associated genotypes had similar frequencies in cataract and control groups. CONCLUSIONS: The previously reported protective effect of folate against cataract is not due to overrepresentation of hyperhomocysteinemia-associated MTHFR genotypes. Instead, the strong predominance of wild-type MTHFR in cataract may suggest impaired DNA synthesis as a cataractogenic factor.

# Genotypizace polymorfismu v genu pro integrin alfa 2 fluorescenční identifikací nukleotidů v extendovaném primeru

## T & C Signals for integrin alpha 2 polymorphism genotyping of 96 samples





# Analýza SNP pomocí fluorescenčních metod

Category	Method	Comment	Reference	
Restriction digest	MADGE	Can only be used at SNP sites that are part of restriction sites; not practicable for real large scale; no specific instrumentation available.	[36]	
Homogeneous	TaqMan	Use of FRET to detect amplification: allele specific probes (hydrolysis probes, hybridization probes, molecular beacons, scorpions) are used for genotyping; TaqMan suited for high throughput analysis (>10 <sup>6</sup> genotypes/week).	[37,38]	
Hybridization Mismatch distinction by polymerases and ligases	LightCycler Oligonucleotide assay (OLA)	ligation	Not easy to automate; variant protocol using FRET (DOL) available.	[39,40]
Array hybridization assays	e.g. Affymetrix		Capable of high throughput analysis.	[41]
Minisequencing	various methods		Basically simple protocol with many variations including homogeneous detection; automatable.	[42,43]
Rolling circle signal amplification			DNA polymerase-driven reaction enabling replication of circularised oligonucleotides under isothermal conditions. RCA has been adopted to solid phase arrays for mutation detection (RCA-CACHET) with PCR products being used as targets.	[44]

# Farmakogenetika u chronického srdečního selhání-beta blokátory

	Polymorfismus I/D ACE		Odds ratio	P
	ID+DD	II		
Věk (medián, rozsah, roky)	57 (21-83)	51 (30-91)		0,002
<b>Betablokátory A/N</b>	106/80	40/11	2,74 pro podávání betablokátorů u II	0,004
<b>Diuretika A/N</b>	161/25	50/1	7,76 pro podávání diuretik u II	0,01
<b>Aspirin A/N</b>	109/77	21/30	0,49 pro podávání aspirinu u II	0,02
<b>Glykémie (medián, rozsah, mmol/l)</b>	6,0 (1,6-17,5)	5,5 (4,2-16,8)		0,0002
<b>Hladiny TNF<math>\alpha</math> (median, rozsah, <math>\mu</math>mol/l)</b>	70 (0,1 -949,5)	2,2 (0,1-121,8)		0,03

Vašků A et al., Člč 2006, v tisku

# Farmakogenetika srdečního selhání

## bb-dávky

	Srdeční frekvence (medián, rozsah, min <sup>-1</sup> )	Renin ( $\mu\text{mol/l}$ )	Hladiny TNF $\alpha$ v plazmě ( $\mu\text{mol/l}$ )
Pacienti s doporučenou dávkou	76 (48-95)	3,64 (0,02-30,1)	2,7 (0,1-279)
Pacienti s nižší než 50% dávkou	78 (52-100)	8,13 (0,01-33,7)	2,6 (0,1-949)
Pacienti bez terapie betablokátory	80 (60-130)	9,96 (0,1-229)	95,9 ( 0,1-291,6)
P	0,0004	0,004	0,001

Vašků A et al., Člč 2006, v tisku

# Farmakogenetika srdečního selhání

## bb-dávky

	I/D ACE						
	II	ID	D D	I	D	Pg	Pa
Pacienti s doporučenou dávkou (N=113)	35	49	29	0,527	0,473	0,005	0,002
Pacienti bez terapie betablokátory (N=91)	11	46	34	0,374	0,626		
Pacienti s nižší než 50% dávkou (N=33)	6	17	10	0,439	0,561		