

# CVIČENÍ Z GENETIKY ČLOVĚKA (KBB/GCCSB)

## JEDNA VELIKOST NESEDÍ VŠEM

### I. ÚVOD

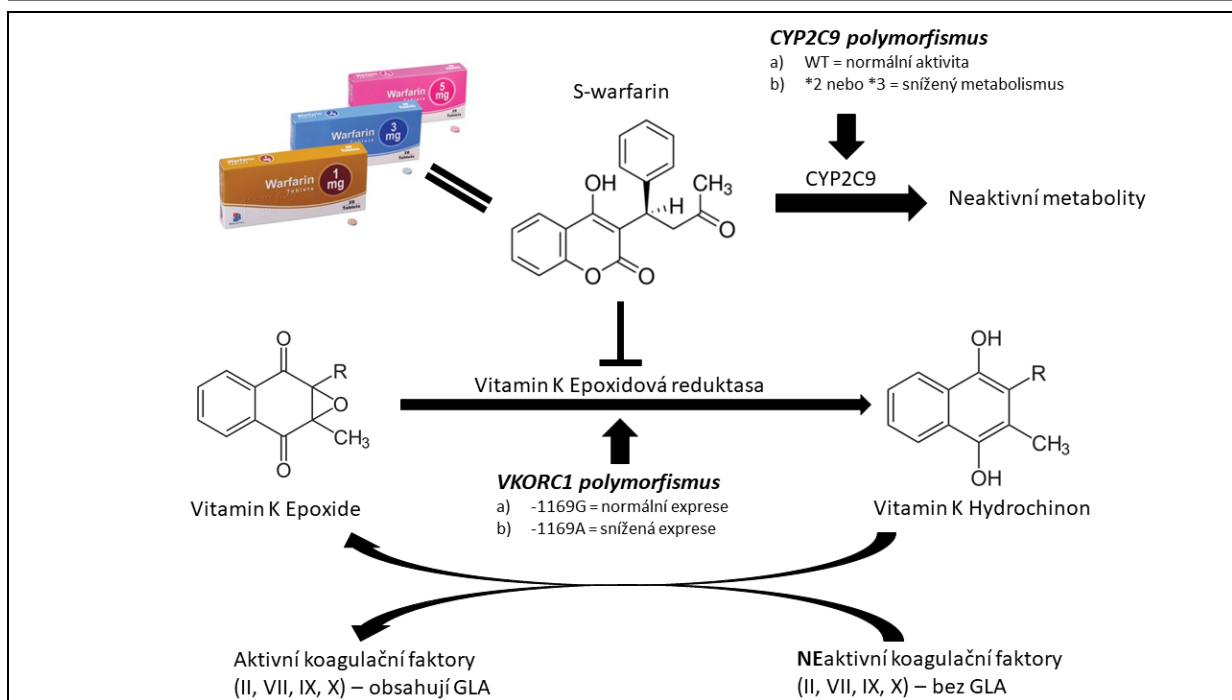
Riziko vzniku trombóz (krevních sraženin / koagula uvnitř cévy) se zvyšuje po prodělaných operacích, nedostatkem pohybu, těhotenstvím, kouřením či obesitou. Nejčastěji světově podávaným orálním anti-koagulantem je lék **warfarin**. Ten má mnoho výhodných (např. vysokou účinnost, nízké náklady na léčbu, malé kolísání efektu při vynechání dávky) ale i nevýhodných vlastností (např. relativně nízký terapeutický index, vysoká interindividuální variabilita, riziko lékových a potravinových interakcí, navození prokoagulačního stavu na počátku léčby). Komplikace plynoucí z nevhodného dávkování patří mezi nejčastější příčiny nežádoucích reakcí. Dávkování warfarinu se odvozuje obvykle dle protrombinového času (Quickův test), případně od populačního průměru (cca 4-5 mg/den). Vzhledem k výše uvedenému jsou tak pacienti vystaveni riziku nadměrné nebo nedostatečné antikoagulační léčby vedoucí buď ke krvácení či krevní sraženinám.

Trombus vzniká v procesu hemostázy (zástavy krvácení). Na její správné regulaci se podílejí koagulační faktory, z nichž některé ve své struktuře obsahují gama-karboxyglutamovou kyselinu (GLA), jejíž přítomnost je esenciální pro správnou funkci koagulačního systému. Vznik GLA je podmíněn přeměnou redukované formy vitamínu K (hydrochinonu) na oxidovanou (epoxid) formu (Obr.1). Zpětnou redukci na hydrochinonovou strukturu v těle katalyzuje enzymatický komplex, jehož klíčovou podjednotku kóduje gen *VKORC1*. Tato enzymaticky aktivní podjednotka je rychlost určujícím krokem v recyklaci vitamínu K.

Zároveň je *VKORC1* terapeutickým (farmakodynamickým) cílem warfarinu, který je podáván jako racemická směs, kdy S-warfarin je potentnější než R-warfarin. Na genetické úrovni byl popsán významný jednonukleotidový polymorfismus (SNP) označovaný jako *VKORC1* (c.-1639G>A), který snižuje expresi tohoto genu, což vede k nižší aktivitě enzymu a přeměněnému množství vitamínu K. Následkem tohoto SNP se sníží množství funkčních/aktivních srážecích faktorů a u pacientů se může vyskytnout těžké krvácení a modřiny. Oproti homozygotním jedincům s běžnými (**Wild-Type**) alelami (WT/WT), pacienti s jednou či dvěma **MUT**antními alelami (WT/MUT nebo MUT/MUT) vyžadují signifikantně nižší dávky warfarinu. Přítomnost **MUT**atního fenotypu se liší dle rasy, kde u asijské populace je 90-95%, 37% u běložské a 14% u africké.

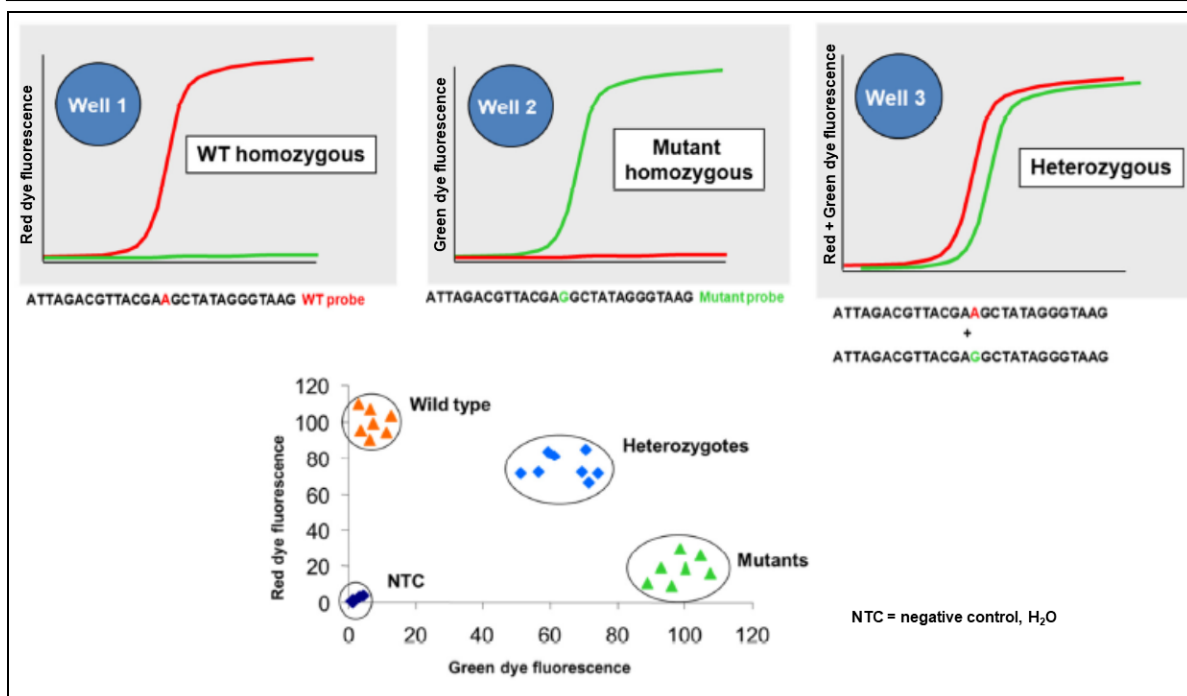
Do správné terapie warfarinem navíc zasahuje i skutečnost, že účinný enantiomer S-warfarin je primárně metabolizován Cytochromem P450 (*CYP2C9*) (Obr.1), který tak ovlivňuje hladinu warfarinu v plasmě a zasahuje do jeho farmakokinetických vlastností. *CYP2C9* má přes 60 alelických variant, kde homozygoti s referenční alelou *CYP2C9\*1* (WT) jsou považováni za ty, co mají „normální metabolizující“ fenotyp. Dvě nejčastější alely snižující funkci se označují jako *CYP2C9\*2* (c.430C>T; p.Arg144Cys) a *CYP2C9\*3* (c.1075A>C; p.Ile359Leu). Dle *in vitro* a *in vivo* studií vedou alely *CYP2C9\*2* a *\*3* k poklesu metabolismu S-warfarinu o 30-40%, respektive o 80-90%. Ve srovnání s homozygoty pro *CYP2C9\*1*, jedinci, co zdědí 1 nebo 2 kopie *CYP2C9\*2* nebo *\*3* mají vyšší riziko krvácení během terapie warfarinem a vyžadují nižší dávky za účelem dosažení příznivého antikoagulačního účinku.

Obr. 1: Schéma působení warfarinu



Jeden ze způsobů, jak určit genotyp jedince je pomocí PCR techniky alelické diskriminace (Obr. 2). Ta je založena na principu diskriminace (odlišení) mezi genotypy, mutacemi či polymorfismy srovnáním rozdílných fluorescenčních signálů získaných použitím alelově specifických sond. Jedná se spíše o kvalitativní než kvantitativní metodu, kdy se vstupní data pro analýzu berou na konci PCR (někdy též označováno jako „endpoint genotyping“).

Obr. 2: Princip alelické diskriminace



Následující úloha v sobě spojuje základní úkon molekulární genetiky – izolaci DNA s její pokročilejší analýzou, která může pomoci vyřešit možnou farmakokinetickou/dynamickou interakci pro konkrétního jedince. Studenti by si takto měli snáze uvědomit společenský význam molekulárně-biologických metod a porozumět základnímu konceptu personalizované (tzn. geneticky podmíněné) medicíny.

## **ÚKOL** *aneb Jedna velikost nesedí všem*

Právě jste prodělal(a) operaci. Aby se zabránilo vzniku přílišných trombóz vznikajících jako následek pooperačních stavů, lékař se Vám rozhodl předepsat lék první volby, warfarin. Nicméně, aby byl schopen Vám napsat vhodnou dávku musí znát Váš genotyp pro CYP2C9, tak VKORC1. Vaším úkolem je stanovit genotypy pro CYP2C9 a VKORC1 a poradit lékaři, zda má nechat standardně doporučenou dávku nebo Vám ji má snížit.

**Na základě metody alelické diskriminace pomocí PCR určete genotypy a navrhnete, jakou dávku léku by Vám měl lékař předepsat.**

## **II. PROVEDENÍ**

JE NEZBYTNÉ PRACOVAT V RUKAVICÍCH A DBÁT NA ČISTOTU PRÁCE, ABY SE ZAMEZILO KONTAMINACI VZORKŮ!!! VŠECHEN SPOTŘEBNÍ MATERIÁL (ŠPIČKY, ZKUMAVKY) MUSÍ BÝT STERILNÍ A CERTIFIKOVANÝ PRO PRÁCI S DNA.

### **1. Speciální materiál a použité roztoky:**

1x PBS (fosfátový pufr, pH 7,4; autoklávováno)

Proteinasa K (Applied Biosystems, kat.č.: 4333793, 20mg/mL)

GoTaq pufr, 5x (Promega, kat.č.: M792A)

Testovací souprava „gb PHARM Warfarin“ (Generi Biotech, kat.č.: 3250-025) obsahující následující komponenty:

- a) eseje pro CYP2C9\*2, CYP2C9\*3, VKORC1 = směs amplifikačních primerů, fluorescenčně značených sond specifických k WT alele (značené FAM – 6-carboxyfluorescein) a MUTované alele (značené HEX – hexachlorofluorescein), pufru, nukleotidů a polymerázy = označené **ZELENÝM** víčkem
- b) standardy WT, MUT a HET pro CYP2C9\*2 (žluté, červené a fialové víčko s **ORANŽOVOU** tečkou)
- c) standardy WT, MUT a HET pro CYP2C9\*3 (žluté, červené a fialové víčko s **bílou** tečkou)
- d) standardy WT, MUT a HET pro VKORC1 (žluté, červené a fialové víčko s **růžovou** tečkou)
- e) deionizovaná voda, NTC

## 2. Extrakce DNA z buněk bukální sliznice

- 1) Provedeme důkladný stěr bukální sliznice odběrovým kitem.
- 2) Odběrový tampón zalomíme ve sterilní 1.5 ml zkumavce.
- 3) Ke vzorku přidáme 400 ul 1x PBS a vortexujeme 30 sec.
- 4) Sterilní pinzetou odstraníme ze zkumavky odběrový tampón a vzorek točíme 10 minut při 500g ve vychlazené (4°C) centrifuze.
- 5) Připravíme si MIX o následujícím složení:
  - 12 uL 5xGoTaq pufru
  - 10 uL Proteinasy K
  - 38 uL ddH<sub>2</sub>O
- 6) Opatrně odsajeme supernatant a pelet buněk resuspendujeme v 50 ul MIXu (viz bod 5):
- 7) Inkubujeme 15min při 65°C.
- 8) Vzorek povaříme 10 min při 95 °C (pootevřit vršek)
- 9) Ochladíme na ledu
- 10) Vzorek stočíme při 15 000 rpm. (nebo při max. otáčkách), 5 min, RT.
- 11) Odebereme 40uL do nové zkumavky a jdeme změřit koncentraci DNA na spektrofotometr (nanoDrop) vůči vodě a hodnoty samotného MIXu a vzorku s DNA zapíšeme do tabulky 1.

Tabulka 1:

Vzorek	c(ng/uL)	A260/A280
MIX		
Vzorek s DNA		

### 3. Polymerázová řetězová reakce:

- 1) Pomocí soupravy „gb PHARm Warfarin“ určete přítomnost polymorfismů (Tabulka 2) v genech CYP2C9 a VKORC1 za použití fluorescenčně značených sond.

Tabulka 2:

Alela	ID SNP	WT varianta	MUT varianta
CYP2C9*2	rs1799853	C	T
CYP2C9*3	rs1057910	A	C
VKORC1 (1639A)	rs9923231	G	A

- 2) Reagencie nechte rozmraznout při pokojové teplotě, poté je důkladně promíchejte a krátce stočte. Detekční esej (pro CYP2C9\*2, CYP2C9\*3 a VKORC1 – se ZELENYM vrškem) rozpipetujte po 16 $\mu$ L do jamek 96-ti jamkové destičky umístěné na ledu (Obr.3).

Obr. 3: Schema pipetování do PCR destičky

	1	CYP2C9 *2 esej	CYP2C9 *3 esej	VKORC1 esej	5	6	7	8	9	10	11	12
A		dd H <sub>2</sub> O	dd H <sub>2</sub> O	dd H <sub>2</sub> O								
B		WT	WT	WT								
C		MUT	MUT	MUT								
D		HET (WT+MUT)	HET (WT+MUT)	HET (WT+MUT)								
E												
F	Student 1	Student 2	Student 3	Student 4	Student 5	Student 6	Student 7	Student 8	Student 9	Student 10	Student 11	Student 12
G												
H												

- 3) K esaji přidejte 4  $\mu$ L Vaší DNA o vstupní koncentraci 1-100 ng/ $\mu$ L. Dále přidejte do dalších jamek po 4  $\mu$ L od standardů WT, MUT a WT/MUT = HETerozygot.
- 4) Destičku či vzorky stočte 3 min/1500rpm v centrifuze Eppendorf 5810R.
- 5) Destičku vložte do LightCycleru 480 II (Roche Diagnostics) a zvolte templát *CYP2C9+VKORC1\_template*, ve kterém je přednastaven detekční formát „Dual Color Hydrolysis Probe / UPL Probe“ s následujícím teplotním profilem:

Tabulka 4:

Počáteční denaturace	95°C	3 min	
Denaturace	95°C	10 s	50 cyklů
Annealing + elongace (+snímání fluorescence)	60°C	20s	

- 6) Zvolte Subset Editor, ve kterém definujte sledovaný polymorfismus (např. CYP2C9\*2) a označte testované vzorky. Následně spusťte PCR run.

#### 4. Vyhodnocení:

V módu Analysis – Quantification - zobrazte reakci kontrol s příslušnou detekční esejí (pro každý subset zvlášť). Validita se hodnotí pro každou mutaci zvlášť. Analýza je považována za validní, pokud došlo k následující amplifikaci:

Tabulka 5:

	Kanál FAM/SYBR	Kanál HEX/JOE/VIC
Standard WT	+	-
Standard MUT	-	+
Standard HET (WT+MUT)	+	+
Deionizovaná voda	-	-

Uložíme data ve formátu souboru txt, který následně podrobíme analýze.

#### 5. Závěr:

Pomocí metody alelické diskriminace, někdy též označované jako endpoint genotyping určete Váš genotyp na základě porovnání s dostupnými standardy alelických variant pro CYP2C9 a VKORC1. Vypracujte protokol obsahující postup a dle tabulky 6 doporučte Vašemu lékaři dávkování pro Vaši osobu. Paralelně spočítejte dle níže uvedeného vzorce hodnotu počáteční dávky s přihlédnutím k Vaším tělesným proporcím. Hodnoty porovnejte.

Tabulka 6:

	VKORC1	CYP2C9					
	-1169G>A	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
WT	GG	5-7 mg	5-7 mg	3-4 mg	3-4 mg	3-4 mg	0.5-2 mg
WT/MUT	AG	5-7 mg	3-4 mg	3-4 mg	3-4 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg
MUT/MUT	AA	3-4 mg	3-4 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg

Vytvořeno dle údajů o přípravku Coumadin (Bristol Myers Squibb), [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/Label/2010/009218s108lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/Label/2010/009218s108lbl.pdf), přístup dne 4.6.2021

**Vzorec** (ref 2): **Denní dávka** warfarinu (mg) =  $((2,049 - (0,016 * [\text{věk, roky}]) + (0,007 * [\text{výška, cm}]) + (0,004 * [\text{váha, kg}]) - (0,227 * [\text{CYP2C9}^*2, \text{počet alel 0-2}]) - (0,296 * [\text{CYP2C9}^*3, \text{počet alel 0-2}]) - (0,34 * [\text{VKORC1, A/A=0, A/B=1, B/B=2}]))^2$

#### Reference:

1. Johnson JA et al: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Pharmacogenetics-Guided Warfarin Dosing: 2017 Update, Clin Pharmacol Ther . 2017 Sep; 102(3): 397-404. doi: 10.1002/cpt.668.
2. disertační práce: Tomek, Aleš: Farmakogenetika warfarinu, 2014 (vzorec upraven s vynecháním vlivu antiarytmika amidaronu)