



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Vyšetření polymorfismů v genu *CYP1A2* a jejich klinický význam

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Dominika Krůčková

Vedoucí práce: Mgr. Dagmar Riegert Bystřická, Ph.D.

České Budějovice 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Vyšetření polymorfismů v genu *CYP1A2* a jejich klinický význam“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 2.6.2020

Podpis

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala paní Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. za odborné vedení, konzultace a udělení cenných rad při psaní mé bakalářské práce.

Vyšetření polymorfismů v genu *CYP1A2* a jejich klinický význam

Abstrakt

Bakalářská práce s názvem Vyšetření polymorfismů v genu *CYP1A2* a jejich klinický význam se zabývá polymorfismy v genu *CYP1A2* a jejich přínosem především pro farmakogenetiku. Gen *CYP1A2* je lokalizován na chromozomu 15 a jeho velikost je přibližně 7,8 kb. *CYP1A2* kóduje jeden z enzymů cytochromu P450. Enzym CYP1A2 patří k nejvýznamnějším enzymům podílejících se na metabolismu různých druhů léčiv jako jsou antipsychotika, léčiva užívaná při léčbě nádorových onemocnění nebo anestetika. Dále se podílí na metabolismu řady prokarcinogenních a karcinogenních látek, ale také látek endogenních například melatonin nebo estrogen. Polymorfismy, které mohou být v genu přítomny částečně odpovídají za rozdílné reakce na léčiva. Kromě genetických polymorfismů se na interindividuální variabilitě podílejí i negenetické faktory například kouření nebo užívání hormonální antikoncepce.

Praktická část bakalářské práce je zaměřena na detekci polymorfismu rs4646425, avšak v teoretické části jsou popisovány další polymorfismy, které se v genu *CYP1A2* nacházejí a mají klinický význam. Polymorfismus rs4646425 byl detekován u pacientů s psychickou diagnózou, a to pomocí metody Real-time PCR.

Klíčová slova

CYP1A2; rs4646425; farmakogenetika; polymorfismus; PCR

Analysis of the *CYP 1A2* gene polymorphism and its clinical importance.

Abstract

The bachelor thesis named Analysis of the *CYP1A2* gene polymorphism and its clinical importance focuses on polymorphisms in gene *CYP1A2* and their benefits to pharmacogenetics. *CYP1A2* gene is localized on chromosome 15, it spans around 7,8 kb. *CYP1A2* codes one of the P450 cytochrome enzymes. Enzyme CYP1A2 is one of the most important enzymes participating in metabolism of variety of medicines, for instance antipsychotics or anaesthetics. Furthermore, CYP1A2 partakes in metabolism of procarcinogenic and carcinogenic substances and endogenous substances, for example melatonin or oestrogen. Polymorphisms in gene partially cause different reactions to medicines. Non-genetic factors also contribute to interindividual variability, for example smoking or taking birth control pills.

The practical part of the thesis is dedicated to detection of polymorphism rs4646425, however further polymorphisms of gene *CYP1A2* which have clinical meaning are described in theoretical part of the thesis. Using the Real-Time PCR method polymorphism rs4646425 was detected in patients with psychological diagnosis.

Key words

CYP1A2; rs4646425; pharmacogenetics; polymorphism; PCR

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Farmakogenomika a farmakogenetika.....	10
2.1	Benefity a limity.....	10
3	Cytochromový systém P450.....	11
3.1	Význam cytochromu P450.....	11
3.2	Výskyt cytochromu P450.....	12
3.3	Struktura cytochromu P450.....	12
3.4	Dělení cytochromu P450.....	13
4	Metabolismus xenotik.....	14
4.1	Vstup xenobiotik do organismu.....	14
4.1.1	Vstup látek do krevního řečiště.....	14
4.1.2	Vstup látek do cílových buněk.....	15
5	Genetický polymorfismus.....	16
5.1	Jednonukleotidové polymorfismy (SNPs).....	17
5.2	Mikrosatelity.....	18
5.3	Minisatelity.....	18
6	CYP1A2.....	19
6.1	Faktory ovlivňující aktivitu CYP1A2.....	20
6.1.1	Genetické faktory.....	20
6.1.2	Negenetické faktory variability.....	21
6.2	Alely CYP1A2.....	23
6.3	Asociace CYP1A2 s onemocněními.....	24
6.3.1	CYP1A2 a nádorová onemocnění.....	24
6.3.2	CYP1A2 a Parkinsonova choroba.....	25
6.3.3	CYP1A2 souvislost s infarktem myokardu.....	26
6.3.4	CYP1A2 a psychická onemocnění.....	26

6.4	Polymorfismus rs4646425	27
7	Laboratorní vyšetření polymorfismu <i>CYP1A2</i>	28
7.1	PCR	28
7.1.1	Optimalizace PCR.....	30
7.1.2	Real-time PCR	31
8	Cíl práce.....	34
9	Metodika	35
9.1	Preanalytická část.....	35
9.1.1	Bukální stěr	35
9.1.2	Periferní krev	36
9.1.3	Materiál.....	36
9.2	Izolace DNA.....	36
9.2.1	Izolace DNA z bukálního stěru.....	37
9.2.2	Izolace DNA z periferní krve.....	38
9.2.3	Měření koncentrace DNA ě	39
9.3	Příprava Master Mixu	40
9.4	Real time PCR.....	40
10	Výsledky	42
10.1	Křivky tání.....	43
11	Diskuze	49
12	Závěr	52
13	Bibliografie	53
14	Seznam použitých zkratk	61

1 Úvod

Rozvoj genetiky a molekulární biologie umožňuje nový pohled na léčbu pacientů. Dochází ke vzniku nové éry personalizované medicíny. Princip personalizované medicíny je založen na skutečnosti, že každý jedinec je vybaven odlišnými genetickými vlastnostmi, tím pádem rozdílně reaguje na podávaná léčiva, a proto by léčba měla být individuálně přizpůsobená jednotlivým pacientům. Aktuální vědecké studie ukazují, že léčba není účinná u téměř poloviny pacientů a rovněž velká část z nich podstupuje hospitalizaci z důvodu závažných vedlejších účinků léčiv.

Vědní obor farmakogenetika studuje lidský genom a dává lékařům možnost volby takového léčebného přípravku, který bude pro konkrétního pacienta nejvhodnější. Kromě faktorů genetických se na metabolismu léčiv podílejí také faktory negenetické jako je strava, životní prostředí a celkové zdraví. Tyto faktory mají také podstatný vliv v reakci na léky, ovšem žádný z těchto faktorů není tak významným ukazatelem jako právě genetika.

Cílem farmakogenetiky je tedy sestavení individuálního léčebného plánu pro každého pacienta. To má za následek docílení maximálně možného účinku léčiva a zamezení nežádoucích účinků léčiv a intoxikace pacienta. Personalizovaná medicína a s ní související farmakogenetika slibují jednak zlepšení zdravotní péče, ale také snížení nákladů, které souvisejí s podáváním neúčinných léčebných preparátů.

Léčiva patří do skupiny xenobiotik, což jsou látky cizorodého původu. Tyto látky jsou z velké části metabolizovány cytochromem P450 (CYP), což je skupina hemoproteinových enzymů, které se nacházejí napříč všemi živými organismy. Z hlediska podílu jednotlivých cytochromů na metabolismu cizorodých látek se za nejdůležitější izoenzymy považují CYP1A2, CYP2A6, CYP2D6, CYP2C, CYP2E1 a CYP3A4.

Gen *CYP1A2* kóduje enzym CYP1A2, který patří k nejdůležitějším enzymům metabolizujícím léčiva. Dále se podílí na metabolismu řady prokarcinogenů a karcinogenů, které mohou být následně přeměněny na toxické produkty. Mnoho klinicky důležitých léků slouží jako substrát pro CYP1A2 například Klozapin, Escitalopram, Paroxetin. Variabilita aktivity enzymu CYP1A2 je ovlivněna genetickými i negenetickými faktory, přičemž genetická složka variability tvoří přibližně 75 %.

V teoretické části mé bakalářské práce se podrobněji zabývám izoenzymem CYP1A2, jeho genetickými polymorfismy a genetickými i negenetickými faktory, které významně ovlivňují jeho fyziologickou funkci. V praktické části bakalářské práce vyšetřuji konkrétní polymorfismus v genu *CYP1A2* (rs4646425). Tento polymorfismus se podílí na různorodé odpovědi pacientů na antipsychotická léčiva.

2 Farmakogenomika a farmakogenetika

Farmakogenomika/farmakogenetika je vědní obor studující genetické predispozice pacienta ve vztahu k individuální variabilitě lékové odpovědi. Farmakogenomika se zabývá variabilitou lékové odpovědi celého genomu, zatímco farmakogenetika sleduje pouze omezené množství genetických biomarkerů na úrovni DNA (Slanař, 2012). Genetické odchylky mohou ovlivňovat metabolismus léčiv na více úrovních, včetně vstřebávání léku, jeho distribuce v organismu a vylučování (Holgate, 2004). Aktuální vědecké studie popisují, že léčiva jsou účinná pouze u 60 % pacientů, jimž jsou podávána a zároveň významný počet pacientů je hospitalizován pro výskyt závažných nežádoucích reakcí po nasazení farmakoterapie (Bartošová et al., 2016). Cílem farmakogenetického výzkumu je individualizace léčby, a tím minimalizace nežádoucích účinků léčiva. Lékaři tak budou moci zvolit pro konkrétního pacienta nejefektivnější a nejbezpečnější způsob léčby (Wolf et al., 2000). Koncept personalizované medicíny předložil již roku 1800 kanadský lékař Sir William Osler, který pozoroval velkou variabilitu mezi jednotlivci. Právě farmakogenetika dnes představuje hlavní pilíř personalizované medicíny (Scott, 2011).

2.1 *Benefity a limity*

Bezesporu největším benefitem farmakogenetiky a farmakogenomiky je již výše zmíněná individualizace léčby a snížení nežádoucích účinků. Dále pak snížení ekonomických nákladů, které často vznikají při léčbě pacienta nevhodným léčivem.

To, jak organismus na dané léčivo reaguje je podmíněno velkým počtem genů, přičemž každý z těchto genů může obsahovat mnoho polymorfismů, které mohou významně ovlivnit metabolismus léčiv. Variabilita lékové odpovědi tedy není monogenní a komplexnost lidského genomu výrazně ztěžuje hledání vhodného léku pro konkrétního pacienta (Spear et al., 2001).

Dalším omezením farmakogenetiky a farmakogenomiky je fakt, že metabolismus léčiv není ovlivněn jen genetickým polymorfismem, ale také faktory negenetickými jako je například věk, životní styl, pohlaví nebo etnické rozdíly. Například při léčbě karcinomu plic a prsu byla zaznamenána zvýšená toxicita u asijských pacientů, ve srovnání s bělošskými pacienty (Phan et al., 2009).

3 Cytochromový systém P450

3.1 Význam cytochromu P450

Cytochrom P450 (CYP) je systém biotransformačních enzymů, které jsou hlavním zdrojem variability metabolismu léčiv a odpovědi organismu na léčivo. Jsou zodpovědné za biotransformaci většiny cizorodých látek, včetně 70-80 % všech léků užívaných v klinické praxi (Zanger and Schwab, 2013). Cytochromy P450 se nacházejí v nejrůznějších živočišných i rostlinných druzích. Kromě savců ho můžeme najít u ptáků, ryb, plazů, hmyzu, hub, rostlin a bakterií (Nelson, 2009). V současné době jsou známy tisíce těchto enzymů, přičemž jejich počet v organismu se liší v závislosti na druhu. V lidském genomu rozlišujeme 57 izoform cytochromu P450, u *Mycobacterium Tuberculosis* 20 izoform a například v rýži se nachází 457 druhů izoform tohoto cytochromu (Hu et al., 2011). Jedná se o enzym, který se vyvíjel cestou divergentní evoluce. Z jednoho genu cytochromu P450 se tak postupně vyvinulo ohromné množství odlišných genů, které kódují cytochromy prokaryotních a eukaryotních organismů.

Předpokládá se, že prehistorické mikroorganismy cytochrom P450 využívaly k hydroxylaci organických látek, které mohly být následně použity jako zdroj energie (Stiborová et al., 1999). Jeho původní funkcí bylo zachování celistvosti buněčné membrány metabolismem a biosyntézou steroidů, později se cytochromy P450 začaly podílet na syntéze a metabolismu různých molekul, chemických a cizorodých látek v organismu (Ďuricová a Grundmann, 2011). Cytochrom P450 hraje významnou roli v syntéze například steroidních hormonů, cholesterolu, mastných a žlučových kyselin a v metabolismu exogenních látek jako požitá léčiva, ale i látek endogenních, například toxinů, které vznikají v buňkách (Nelson, 2009). Na metabolismu exogenních i endogenních látek se CYP podílí tak, že mění lipofilní látky na hydrofilní nebo polární. Takto upravené látky se stávají ve vodě rozpustnými a mohou být následně vyloučeny z organismu (Ďuricová a Grundmann, 2011). 70-80 % enzymů zúčastňujících se metabolismu léčiv představují právě enzymy cytochromu P450. Absence cytochromu P450 by tedy vedla ke kumulaci léčiv v organismu po dlouhou dobu, což by mohlo způsobit následné poškození tkání (Gonzalez, 2005). Cytochromy P450 lze považovat za buněčný detoxikační systém. Avšak určité sloučeniny, které pro organismus nejsou toxické mohou být cytochromy P450 přeměněny na vysoce reaktivní meziprodukty např.: nitrosaminy, tetrachlormethan nebo acetaminofen (paracetamol) (Cederbaum, 2015).

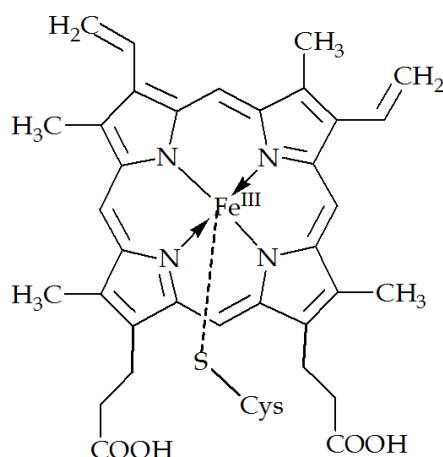
Mezi 12 CYP geny má 10 % lidí alespoň jednu potenciálně škodlivou variantu. Bohužel jen malé množství těchto variant bylo jednoznačně spojeno se změnami v odpovědi na léčivo. Stále existuje velké množství variant, u nichž není jejich význam objasněn (Giacomini et al., 2007).

3.2 Výskyt cytochromu P450

Cytochromy P450 se v lidském těle nacházejí převážně v jaterní tkáni, ale jejich hladiny byly nalezeny také v ledvinách, plicích, gastrointestinálním traktu (zejména v tenkém střevě), kůži, mozku a nadledvinkách. V buňkách jsou enzymy cytochromu P450 lokalizovány v membránách hladkého endoplazmatického retikula a v membránách mitochondrií. (Stiborová et al., 1999). Enzymy vyskytující se v membránách mitochondrií se z větší části podílejí na metabolismu a syntéze endogenních látek, zatímco enzymy endoplazmatického retikula metabolizují látky exogenní (Gonzalez, 2005).

3.3 Struktura cytochromu P450

Cytochrom P450 je hemoprotein typu b. Číslo 450 je označení absorpčního maxima, kterého tato skupina enzymů dosahuje při vlnové délce okolo 450 nm. Přičemž běžné hemoproteiny absorbují při vlnové délce 420 nm. (Manikandan, 2018). Cytochromy P450 obsahují přibližně 400-500 aminokyselinových zbytků a porfyrinový skelet (protoporfyrin IX), který je vázán pomocí hydrofobních vazeb a prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu. Thiolátová síra je pátým ligandem iontu železa. Šestým ligandem je atom kyslíku molekuly vody. Toto uspořádání cytochrom P450 odlišuje od ostatních hemoproteinů, díky odlišným spektrálním a katalytickým vlastnostem (Stiborová et al., 1999).



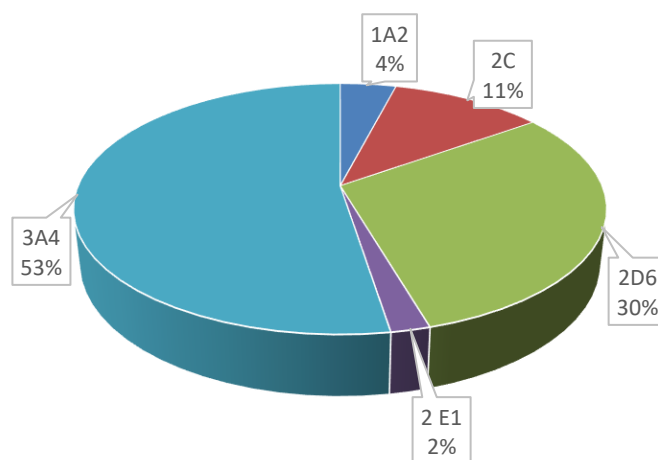
Obrázek 1: Struktura cytochromu P450 (Hu et al., 2011)

3.4 Dělení cytochromu P450

Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách (izoenzymech). Podle stupně homologie jejich primární struktury (pořadí aminokyselin) je řadíme do genetických rodin a podrodin označovaných předponou CYP (Stiborová et al., 1999). Enzymy se shodou v sekvenci aminokyselin 40 % a více patří do stejné rodiny, která se značí arabským číslem (např.: CYP3). Enzymy se sekvencí shodnou více, než 55 % řadíme do stejné subrodiny, které označujeme velkým písmenem (např.: CYP3A). Pokud jsou proteiny enzymů kódovány stejnými geny, označujeme je jako izoformy, což je značeno arabským číslem za písmenem označujícím subrodinu (např.: CYP3A4) (Ďuricová a Grundmann, 2011).

Tabulka 1: Průměrný podíl jednotlivých izoform na celkovém obsahu cytochromu P450 v játrech a na biotransformaci léčiv (Ďuricová a Grundmann, 2011)

CYP450	Podíl na obsahu (%)	Podíl na biotransformaci
1A2	12	4
2C	20	11
2D6	4	30
2E1	6	2
3A4	30	52



Obrázek 2: Podíl jednotlivých cytochromů P450 na biotransformaci (Ďuricová a Grundmann, 2011)

4 Metabolismus xenotik

Xenobiotika jsou látky, které mohou být jak přírodního, tak i syntetického původu. Přírodní xenobiotika můžeme najít například v potravě (rostlinná barviva, aromatické látky atd.). V mnohem větší míře jsou ovšem v našem prostředí přítomny cizorodé látky syntetické (agrochemikálie, průmyslové zplodiny, léčiva, kosmetické přípravky, potravinová aditiva). Xenobiotika můžeme dále dělit například na základě jejich chemické struktury (polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorované bifenyly, polyfenoly apod.), dále podle skupenství, orgánu, na který působí a také z hlediska míry toxicity. Nejčastější cestou vstupu cizorodých látek do organismu je gastrointestinální trakt, dále dýchací cesty a v menší míře kůže (Skálová, 2017). Cílem metabolismu xenobiotik je omezit jejich vstup do dalších orgánů a tkání, tím snížit toxicitu a usnadnit jejich eliminaci. Principem metabolismu cizorodých látek je změna jejich struktury. Enzymy metabolizující xenobiotika jsou schopny přeměnit hydrofobní sloučeniny na hydrofilní. Cizorodé látky, které prošly touto přeměnou mohou být z organismu následně vyloučeny. Tento proces ovšem zahrnuje tvorbu vysoce reaktivních meziproductů. Meziproducty, které v tomto procesu vznikají se vyznačují odlišnou biologickou aktivitou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi a jiným chováním v organismu (Stanley, 2017). Xenobiotika představují pro organismus potenciální riziko, protože mohou interagovat s endogenními látkami a narušit tak fyziologické pochody (Skálová, 2017).

4.1 Vstup xenobiotik do organismu

Vstup xenobiotik do organismu probíhá v několika fázích. Látka se dostává nejprve do krevního řečiště, kde může dojít k interakci s plazmatickými proteiny, pomocí kterých je dále transportována (např. albumin). Druhou fází je vstup cizorodé látky do jednotlivých tělních buněk (Knejzlík et al., 2000).

4.1.1 Vstup látek do krevního řečiště

Do krve se látky dostávají zejména trávicím ústrojím (žaludek, střeva), dále respiračním ústrojím (plíce, průdušky, nosní sliznice) a velmi lipofilní sloučeniny pak mohou prostupovat pokožkou. Bariéry mezi krví a tkáněmi jsou tvořeny epitelem. Epiteliální buňky obsahují velké množství lipidů a fosfolipidů. Díky této skutečnosti vstupují do organismu snáze látky lipofilní. Další způsob, jak mohou látky vstupovat do krve, je za pomoci přenašečů umístěných na povrchu jednotlivých buněk. Takto přenášené mohou

být tzv. analogy, což jsou látky, které se v organismu nevyskytují, ale mají značnou podobnost k látkám plnicím v organismu fyziologickou funkci. Této schopnosti látek je využíváno především ve farmacii, kde část molekuly léku je analogická fyziologicky aktivní látce (Knejzlík et al., 2000).

4.1.2 Vstup látek do cílových buněk

Pokud je xenobiotikum přítomno v krvi, dochází k transportu látek do orgánů, tkání a cílových buněk. Míra poškození jednotlivých tkání a orgánů závisí na mnoha faktorech. Například na typu endoteliálních buněk. Srdce tak patří k nejnáchylnějším orgánům působením xenobiotik, jelikož kapilární síť srdečního svalu se vyznačuje přítomností endoteliálních buněk s tzv. transcytotickou aktivitou. Transcytotická aktivita znamená transport tekutiny z krevního řečiště do intersticia a obráceně. Při tomto transportu nejsou podstatné fyzikálně-chemické vlastnosti látky. Xenobiotika se tedy dostávají do srdečního svalu bez jejich selekce endocytózou krve. V organismu je nejběžnější síť krevních kapilár, jejíž buněčná stěna je propustná pouze pro látky s nízkou molekulovou hmotností. Takovéto uspořádání kapilár se vyskytuje například u pankreatu. Mezi játry a krví mohou procházet i makromolekulární látky, proto jsou játra nejvíce zasažena při chronických otravách (Knejzlík et al., 2000).

5 Genetický polymorfismus

Termín polymorfismus je složenina řeckých slov *morphos* (tvar) a *polys* (mnohý). V genetice je polymorfismem označován rozdíl v sekvenci DNA mezi jednotlivci. Jde o výskyt jednoho znaku ve více variantách (alelách), přičemž musí být tato mnohotvárnost geneticky podmíněná. Genetický polymorfismus může vést např. k fenotypovým rozdílům jako jsou hnědé/modré oči, rovné/kudrnaté vlasy apod. (Ismail and Essawi, 2012). Frekvence výskytu polymorfismu musí v populaci přesahovat 1 %. Pokud je procentuální výskyt menší mluvíme o mutacích. Výjimku tvoří například mutace *p.F508del* vyskytující se u pacientů s cystickou fibrózou s frekvencí 0,01-0,02 v severní evropské populaci. I když je hodnota vyšší, než 0,01, nejedná se o polymorfismus, ale patogenní mutaci. Pojem polymorfismus se totiž používá pro označení nepatogenních variant, bez ohledu na jejich frekvenci (Strachan and Read, 2011).

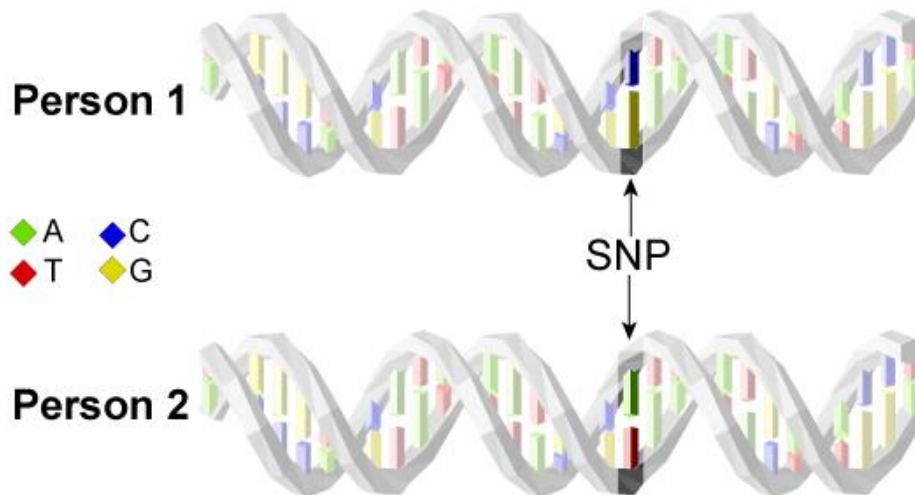
Důsledkem polymorfismů v DNA může být různá aktivita a funkce. Příkladem mohou být krevní skupiny. Mezi 50.-90. léty se ke studiu polymorfismů využívala zejména variabilita proteinů. Tyto proteiny lišící se například v jedné aminokyselině byly separovány na gelu na základě jejich elektrického náboje a následně detekovány. Jelikož je genetický kód degenerovaný, tzn., že dva či více kodonů může kódovat stejnou aminokyselinu a substitucí chemicky podobných aminokyselin může vzniknout protein s identickou funkcí, který nemusí být laboratorními metodami odlišitelný, zůstává většina genetické variability nedetekována. Díky dešifrování genetického kódu, objevení technologie rekombinantní DNA a restrikčních enzymů byly vyvinuty techniky molekulární detekce polymorfismů na úrovni DNA. Protože DNA polymorfismus může být kdekoli v genomu, nejen v kódující sekvenci, není alela pouze formou genu, ale vyjadřuje, že v daném místě je variabilita. DNA polymorfismy jsou také využívány k mapování genů, proto se označují jako DNA markery. Alely DNA markerů jsou detekovatelné bez ohledu na fenotyp jedince (Strachan and Read, 2011).

Z hlediska velikosti můžeme rozlišit 3 hlavní třídy DNA polymorfismů. Jednonukleotidové polymorfismy (SNP-single nucleotide polymorphism), krátké tandemované opakování (STR-short tandem repeats-mikrosatelity) a variabilní počet tandemových opakování (VNTR – variable number of tandem repeats – minisatelity). Nejčastějším typem polymorfismu je jednonukleotidový polymorfismus (SNP) (Ismail and Essawi, 2012).

5.1 Jednonukleotidové polymorfismy (SNPs)

Lidský genom obsahuje přibližně 3 miliardy párů bází, složených ze 4 typů nukleotidů: Adenin (A), Thymin (T), Cytosin (C) a Guanin (G). Lidský genom je u všech z 99,9 % totožný, což zaručuje příslušnost k jednomu druhu. Zbývající část (0,1 %) je odlišná, a právě tato část zapříčiňuje rozdíly mezi jednotlivci, a to jak zevnějšek (například barva očí), tak i náchylnost a odolnost k určitým nemocem nebo rezistenci vůči lékům (Ahmadian et al., 2000). Jednonukleotidový polymorfismus je nejčastějším typem genetické variability v lidské populaci. Každý SNP představuje rozdíl v jednom nukleotidu. K identifikaci SNP slouží RS kód (např. rs4646425), který je přiřazen ke každému identifikovanému SNP. Písmena R a S jsou zkratkou pro „reference SNP ID number“ a čísla za zkratkou udávají klastr, kde se SNP nachází. Na základě tohoto kódu jsou veškeré SNP shromažďovány v databázi *NCBI dbSNP*. SNP se vyskytuje přibližně v jednom z 1000 po sobě následujících nukleotidů, z toho vyplývá, že v lidském genomu se jich nachází přibližně 4 až 5 milionů. Celkem bylo nalezeno více než 100 milionů SNP v populacích po celém světě. Většina z těchto SNP nemá na zdraví nebo vývoj jedince vliv, protože se nacházejí v části genomu, která nemá kritickou funkci v tzv. intronech, což jsou nekódující sekvence genomu. Vědci studují význam jednotlivých SNP například ve vztahu k odpovědi na léčivo nebo s výskytem různých onemocnění. Miliony těchto polymorfismů již byly v lidském genomu identifikovány v rámci mezinárodního HapMap projektu (Varela and Amos, 2010). SNP můžeme rozdělit do dvou hlavních kategorií. První z nich je indikativní SNP, což jsou polymorfismy, které se nenacházejí v genech a neovlivňují funkci proteinu, přesto však ovlivňují odpověď na určité léčivo nebo zvyšují riziko vzniku onemocnění. Druhým typem je kauzativní SNP, které také ovlivňují souvislost se vznikem onemocnění a reakci jedince na léčivo a zároveň ovlivňují způsob fungování proteinu. Kauzativní SNP se vyskytují ve dvou formách jako kódující SNP v exonech a nekódující SNP v intronech. Kódující SNP mění pořadí aminokyselin. Nekódující SNP nacházející se v nekódující oblasti genů mohou měnit načasování, umístění nebo úroveň genové exprese. Pokud by se podařilo rozšifrovat informaci uloženou v SNP, bylo by možné určit, k jakým onemocněním je daný člověk náchylný a

zároveň by se mohly při léčbě používat léky, které by maximalizovaly léčebný efekt, a naopak minimalizovali vedlejší účinky léčiv (McCarthy and Hilfiker, 2000).



Obrázek 3: Jednonukleotidový polymorfismus, obrázek znázorňuje DNA dvou osob, z nichž každá má na stejné pozici jiný nukleotid (zdroj: SITN Harvard University, dostupné z: <http://sitn.hms.harvard.edu/flash/2017/whats-genes-newly-approved-genetic-testing-disease-risks/>)

5.2 Mikrosatelity

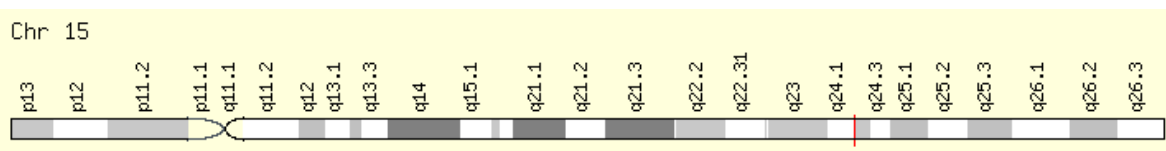
Mikrosatelity jsou krátké sekvence (2-6 pb), které se tandemově opakují. Příkladem může být dvounukleotidová repetice $(CG)_n$ nebo třínukleotidová repetice $(CAG)_n$. V genomu se nejčastěji vyskytují dvounukleotidové a třínukleotidové repetice. Nejméně je repetice šestinukleotidových, které byly nalezeny v telomerách lidských chromozomů (Kuciel a Urban, 2016).

5.3 Minisatelity

Rozdíl mezi mikrosatelity a minisatelity spočívá v rozdílné délce repetice a jejich počtem. Jednotky tandemové repetice o velikosti 5-30 pb mohou mít i několik stovek opakování. Oproti mikrosatelitům se v genomu vyskytují výrazně méně. Minisatelity se mohou vyskytovat ve dvou formách. Buď se může jednat o jedinečné lokusy, které se vyskytují v genomu pouze jednou nebo jsou v genomu různě rozmístněny lokusy s mnoha kopiemi (Kuciel a Urban, 2016).

6 CYP1A2

Gen *CYP1A2* je spolu s geny *CYP1A1* a *CYP1B1* lokalizován na 15. chromozomu, konkrétně v oblasti 15q24.1 (obrázek 4). Jeho velikost je přibližně 7,8 Kb. Obsahuje 6 intronů a 7 exonů, včetně nekódujícího exonu. Gen *CYP1A2* kóduje enzym cytochromu P450 (Ou-Yang et al., 2000). Enzym CYP1A2 je nejvíce zastoupen v játrech, dále se nachází v plicích, pankreatu, gastrointestinálním traktu a mozku (Thorn et al., 2012). CYP1A2 je klíčový pro metabolismus různých druhů léčiv. Metabolizuje antipsychotika, například Klozapin, Olanzapin a Paroxetin, nebo léčiva užívaná při léčbě nádorových onemocnění, například Flutamid, anebo anestetika, například Lidokain. (Zhou et al., 2009) CYP1A2 metabolizuje také látky endogenní, například melatonin, estrogen a estradiol nebo bilirubin. Dále hraje roli v bioaktivaci prokarcinogenů, jako jsou heterocyklické aromatické aminy nebo polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) (Gunes and Dahl, 2008). Markerem pro stanovení aktivity CYP1A2 *in vivo* je kofein. Podle metabolických poměrů kofeinu lze určit, jak rychle pacient léčivo metabolizuje. Na základě toho se následně pacienti rozřazují do jednotlivých skupin na pomalé, rychlé, intermediární a ultrarychlé metabolizátory (Rasmussen et al., 2002).



Obrázek 4: Lokace genu *CYP1A2* (zdroj: GeneCards, dostupné z:

<https://genecards.weizmann.ac.il/v3/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP1A2>)

1) Pomalí metabolizátoři (PM)

Pacient označovaný jako pomalý metabolizátor (PM-poor metabolizer) je nosičem alely s nedostatečnou funkcí v homozygotním stavu (aa). Jeho enzymy pak mohou mít sníženou až nulovou aktivitu. Tito jedinci jsou vystaveni vyššímu riziku toxicity následkem vysokých hladin nemetabolizovaného léčiva nebo v případě užívání léčiv, které pro svůj účinek potřebují metabolickou přeměnu, může dojít k selhání terapie (Zanger and Schwab, 2013).

2) Rychlí metabolizátoři (EM)

Rychlým metabolizátorem (EM-extensive metabolizer) označujeme homozygotního jedince nesoucí obě „normální“ alely kódující funkční protein (AA). Jedinci nesoucí tuto alelu metabolizují léčivo tak, jak je očekáváno. Tento fenotyp obvykle představuje hlavní část populace (Zanger and Schwab, 2013).

3) Intermediární metabolizátoři (IM)

Pacienti, kteří jsou heterozygoti a nesou tedy jen jednu normální nebo funkčně deficitní alelu, jsou označováni jako intermediární metabolizátoři (IM-intermediate metabolizer) (Aa). Tito jedinci mají zhoršenou schopnost oxidace léčiva (Zanger and Schwab, 2013).

4) Ultrarychlí metabolizátoři (UM)

U pacientů označovaných jako ultrarychlí metabolizátoři (UM-ultra rapid metabolizer) dochází k duplikaci, či amplifikaci daného genu. Tito jedinci metabolizují léčivo rychleji, než EM a může u nich být potřebná vyšší než běžná dávka léčiva k docílení potřebné terapeutické plazmatické koncentrace (Zanger and Schwab, 2013)

6.1 Faktory ovlivňující aktivitu CYP1A2

Jak již bylo zmíněno výše, účinnost léčiv není vždy stoprocentní a pro každého pacienta je velmi individuální. Variabilita CYP1A2 je ovlivněna jak geneticky, tak vnějšími faktory. Přibližně ze 75 % je variabilita závislá na genetické složce, zbývající rozdíl tvoří faktory prostředí (Thorn et al., 2012).

6.1.1 Genetické faktory

Nejčastěji se vyskytující alela pro každý enzym tzv. divoká alela („wild type“) se označuje jako *1. Varianty této alely se označují například *2, *3. Alelické varianty se liší funkcí i výskytem v jednotlivých etnických skupinách. Enzymový defekt, který se projevuje změnou v metabolické aktivitě je v populaci přenášený autozomálně recesivně. Proto jsou projevy nejvýraznější u homozygotů s defektním genem. Na základě genotypu, který ovlivňuje stupeň aktivity enzymů cytochromu P450, můžeme, jak již bylo výše uvedeno, populaci rozdělit do čtyř metabolických skupin. Enzymy cytochromu P450 mají širokou substrátovou specifitu. To znamená, že na metabolismu daného léčiva se může podílet i více enzymů. Podíl daného polymorfismu na metabolismu léčiv tedy závisí na množství enzymů, kterými je lék metabolizován. Pokud je přeměna léčiva zajišťována jen jedním enzymem, pak může genetický polymorfismus významně ovlivňovat účinek tohoto léčiva (Ďuricová a Grundmann, 2011).

6.1.2 Negenetické faktory variability

Rozdílnou biotransformaci léčiva lze pozorovat i v rámci jedné geneticky definované skupiny. Bylo zjištěno, že některé druhy potravin, kouření a určitá léčiva mění odpověď organismu na léčivo. Podle toho, zda daná látka zvyšuje, nebo snižuje enzymatickou aktivitu, rozlišujeme tyto látky jako induktory a inhibitory. Enzymová indukce zvyšuje enzymatickou aktivitu, v důsledku toho dochází ke zrychlenému metabolismu léčiva. V případě, že metabolity daného léčiva mají malý, nebo žádný farmakologický účinek dochází ke snížení plazmatických hladin terapeutického účinku pro daný lék. Naopak, pokud mají metabolity vyšší toxicitu, může dojít k projevům intoxikace. V případě snížení enzymové aktivity mluvíme o enzymových inhibitech, jejichž výsledkem je prodloužení farmakologického účinku léčiva v důsledku zvýšení jeho plazmatických hladin s možnou intoxikací. Pokud se jedná o léčivo, u něhož je nutná transformace na aktivní formu, pak výsledkem inhibice může být selhání terapeutického účinku (Ďuricová a Grundmann, 2011). Silným induktorem aktivity CYP1A2 je kouření. To znamená, že u kuřáků je aktivita CYP1A2 vyšší a léčiva, která jsou metabolizovaná CYP1A2 by měla být podávána ve vyšších dávkách. Pokud pacient kouření ukončí, exprese genu pro CYP1A2 znovu klesne a je tedy nutné dávku léčiva opět snížit. Aktivitu také indukují některé potraviny jako je košťálová zelenina (brokolice, kapusta), polyaminové uhlovodíky z grilovaného masa, léčiva (například Omeprazol) a další inhibitory protonové pumpy, užívané při poruchách trávení (Thorn et al., 2012). Těžká fyzická námaha může také působit jako induktor pro CYP1A2 (Gunes and Dahl, 2008). Naopak hormonální antikoncepce, fluvoxamin a další léčiva snižují exprese genu *CYP1A2* a působí tedy jako inhibitory (Thorn et al., 2012). Na myších i lidech byla také popsána změněná aktivita CYP1A2 v závislosti na pohlaví jedince. U myší byla pozorována vyšší aktivita u samce v porovnání se samicí. Stejně tak tomu bylo ve studii s lidskými vzorky, kde byla prokázána snížená aktivita u žen oproti mužům. Tyto výsledky ale mohou být zkreslené některými z inhibitorů nebo induktorů jako je kouření a užívání hormonální antikoncepce. Jen některé z těchto studií probíhali na nekuřácích a ženách neužívajících hormonální antikoncepci (Gunes and Dahl, 2008). Ve studii, kde byla porovnáována aktivita enzymu v závislosti na užívání hormonální antikoncepce bylo zjištěno, že uživatelky hormonální antikoncepce měly aktivitu enzymu sníženou oproti ženám, které hormonální antikoncepci neužívaly (Petersen et al., 2006). Vysvětlením odlišné aktivity závislé na pohlaví může být nižší tělesná váha a velikost orgánů, vyšší procento tělesného

tuku, snížená rychlost glomerulární filtrace a rozdílná žaludeční motilita. Mimo jiné i zvýšená hladina estrogenu a progesteronu, která se může vyskytovat nejen u uživatelů hormonální antikoncepce, ale také u žen v luteální fázi menstruačního cyklu nebo u těhotných. Studie zaměřená na těhotné ženy ukázala, že metabolický poměr kofeinu v moči klesá v časně fázi těhotenství (8-12 týdnů) o 35 % oproti měření po porodu. Koncentrace kofeinu měřená ve slinách těhotných žen byla více než dvojnásobná oproti negavidním kontrolám. V aktivitě CYP1A2 hrají roly i etnické rozdíly. Nižší enzymová aktivita byla měřena u Asijské a Africké populace oproti Europoidní rase. V další studii byla sledována koncentrace Klozapinu u pacientů trpících schizofrenií a byla zjištěna o 30-50 % zvýšená koncentrace Klozapinu v plazmě u tchajwanských pacientů oproti pacientům Europoidní rasy (Gunes and Dahl, 2008).

Tabulka 2: *Substráty, inhibitory a induktory izoenzymu CYP1A2* (zdroj: Flockhart TableTM Indiana University, dostupné z: <https://drug-interactions.medicine.iu.edu/MainTable.aspx>)

Substráty	Inhibitory	Induktory
Kofein	Amiodaron	Brokolice
Paracetamol	Cimetidin	Růžičková kapusta
Amitriptylin	Ciprofloxacín	Tabák
Klomipramin	Citalopram	Grilované maso
Klozapin	crisaborole	Insulin
Duloxetin	Efavirenz	Modafinil
Doxepin	Interferon	Karbamazepin
Estradiol	Methoxsalen	Rucaparib
Fluvoxamin	mibefradil	
Haloperidol	Ribociclib	
Mexiletin	Rucaparib	
Olanzapin	Tiklopidin	
Fenacetin		
Rucaparib		
Tacrine		
Tizanidin		
Verapamil		
Warfarin		
Zileuton		

Souvislost CYP1A2 s výživou

Mezi negenetické faktory ovlivňující aktivitu CYP1A2 patří, jak již bylo výše zmíněno, některé potraviny. Příjem potravy bohaté na žluto-zelenou zeleninu je spojen s nižším rizikem některých druhů rakoviny ve srovnání s běžnou stravou. Zelenina rodu *Brassica* obsahuje několik chemických sloučenin, které mohou modulovat karcinogenní proces. Nedávná studie z roku 2019, která se zaměřila na konzumaci kapusty v souvislosti s aktivitou tohoto enzymu, zjistila významně vyšší aktivitu u skupiny konzumující tento druh zeleniny oproti kontrolní skupině, a to o 16,4 % 8. den a o 15,2 % 15. den konzumace. Podobné výsledky byly zaznamenány i u konzumace brokolice v další studii, kde sledovaná skupina konzumovala 500 g brokolice po dobu 6 ti dnů. V této studii byl zaznamenán nárůst aktivity enzymu CYP1A2 o 19 % (Charron et al., 2020).

6.2 Alely CYP1A2

V populaci je nejběžnější alela divokého typu (*CYP1A2*1A*). Tato alela nemá žádnou změnu v nukleotidové sekvenci a její enzymatická funkce je normální. Mezi nejčastěji sledovanou alelu patří zejména alela *CYP1A2*1F*, která se vyznačuje zvýšenou enzymovou aktivitou (Zhou et al., 2009).

Tabulka 3: Frekvence výskytu jednotlivých alel CYP1A2 v populaci (Đuricová a Grundmann, 2011)

Alela	Frekvence výskytu v populaci (%)		
	Bělošská	Asijská	Africká
<i>CYP1A2*1A</i>	24,4	21,7	39,9
<i>CYP1A2*1C</i>	< 1	23,0	-
<i>CYP1A2*1F</i>	56,7	7,7	49,6
<i>CYP1A2*1K</i>	0,3	0,0	3,0

Tabulka 4: Enzymová aktivita jednotlivých alel izoenzymu CYP1A2 (zdroj: Pharmacogene Variation Consortium, dostupné z: <https://www.pharmvar.org/gene/CYP1A2>)

Alela	Změna v nukleotidové sekvenci	Změna enzymové aktivity (<i>in vivo</i>)
CYP1A2*1A	Žádná (divoká alela)	Žádná
CYP1A2*1B	5347 T>C	-
CYP1A2*1C	-3860G>A	Snížená
CYP1A2*1D	-2467delT	-
CYP1A2*1E	-739T>G	-
CYP1A2*1F	-163C>A	zvýšená
CYP1A2*1G	-739T>G, 5347T>C	-
CYP1A2*1H	2025A>C, 5347T>C	-
CYP1A2*1K	-739T>G, -729C>T, -163C>A	Snížená
CYP1A2*2	63C>G	-
CYP1A2*3	2116G>A, 5347T>C	Snížená
CYP1A2*4	2499A>T	Snížená
CYP1A2*5	3496G>A	-
CYP1A2*6	5090C>T	Ztráta
CYP1A2*7	3533G>A	Snížená

6.3 Asociace CYP1A2 s onemocněními

6.3.1 CYP1A2 a nádorová onemocnění

Jak již bylo zmíněno výše CYP1A2 je jedním z enzymů odpovědných za aktivaci aromatických a heterocyklických aminů a polycyklických aromatických uhlovodíků. Tyto sloučeniny se vytvářejí například během smažení, nebo grilování masa. Jejich metabolismus prostřednictvím CYP1A2 vede k tvorbě meziproductových metabolitů. Tyto metabolity jsou často vysoce reaktivní sloučeniny, které se mohou vázat na DNA, způsobit tak mutace a mohou vést až ke vzniku rakoviny. Proto se předpokládá, že vysoká aktivita CYP1A2 je rizikovým faktorem rakoviny močového měchýře, tlustého střeva a konečníku (Sachse et al., 2003).

CYP1A2 a karcinom prsu

Alela CYP1A2 *1F je spojována s některými druhy karcinomů, například s karcinomem prsu. Z výsledků metaanalýzy od Tiana et al. (2013) vyplývá, že polymorfismus CYP1A2 *1F může být spojen se zvýšeným výskytem rakoviny prsu a ovarií zejména u

kavkazských populací (Tian et al., 2013). Také je to nejvíce studovaná varianta v souvislosti s kofeinem (Petersen et al., 2006). Podle studií zvýšená konzumace kávy chrání před karcinomem prsu pacientky s genotypem *CYP1A2* *1F C/C. Káva způsobuje změnu metabolismu estrogenů a tím dochází k ochraně před karcinomem. Ženy s vyšší konzumací kávy (≥ 2 šálky/den) mají vyšší poměr 2-OHE1 ku 16 α -OHE1. 2-OHE1 působí jako slabý estrogen, nebo antiestrogen. Zatímco 16 α -OHE1 působí jako prokarcinogen, který se může vázat na estrogenový receptor. Vysoký poměr 2-OHE1 je také spojován s lepší prognózou. Tento pozitivní efekt konzumace kávy na karcinom prsu byl pozorován pouze u pacientek s genotypem *CYP1A2* *1F s minimálně jednou alelou C, ne však u pacientek s genotypem A/A (Bageman et al., 2008).

CYP1A2 a karcinom plic

I přes zlepšení diagnostických a terapeutických technik je rakovina plic na prvním místě v úmrtnosti na onkologická onemocnění. Karcinogeneze plic ještě není zcela objasněna. Kromě nejrizikovějšího faktoru, jímž je kouření, se na vzniku karcinomu plic podílejí další aspekty včetně genetického polymorfismu (Shao and He, 2015). Podle metaanalýzy od Suna et al. (2014) je genetický polymorfismus *CYP1A2* *1F spojen se zvýšeným rizikem rakoviny plic a sníženým rizikem rakoviny močového měchýře u Kavkazů (Sun et al., 2015).

Jak se ukázalo, na vznik karcinomu plic má vliv také etnicita. U polymorfismu rs2069514 nosiči homozygotní alely A/A vykazovali zvýšené riziko vzniku karcinomu plic ve srovnání s jedinci nesoucí genotyp G/G. U asijské populace však nebyly nalezeny žádné asociace s tímto genotypem a výskytem karcinomu plic (Shao and He, 2015).

6.3.2 *CYP1A2* a Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba je neurodegenerativní onemocnění centrální nervové soustavy, které souvisí s úbytkem buněk v mozku. Tyto buňky za normálního stavu produkují dopamin, který zajišťuje přenos signálů mezi nervovými buňkami. Nedostatek dopaminu má za následek neschopnost pacienta ovládat, nebo kontrolovat svůj pohyb. Bylo zjištěno, že konzumace kávy je spojena s nižším výskytem tohoto onemocnění. Podle metaanalýzy se riziko Parkinsonovy choroby snížilo o 30 % u konzumentů kávy ve srovnání s nekonzumenty kávy. Kromě genu *ADORA2A*, který je s Parkinsonovou chorobou spojovaný, má vliv na toto onemocnění také polymorfismus genu *CYP1A2*. Konkrétně

v případě polymorfismu rs2470890 bylo u pacientů, kteří konzumují kávu ve vyšším množství, pozorováno snížení rizika vzniku tohoto onemocnění o přibližně 18 % u heterozygotů (TC) a homozygotů (CC) oproti homozygotům s alelou „divokého“ typu (TT), kde bylo riziko nižší o přibližně 5 % (Popat et al., 2011).

6.3.3 *CYP1A2 souvislost s infarktem myokardu*

Mutageny obsažené v tabákovém kouři poškozují DNA a tím může dojít k rozvoji aterosklerózy. Mnoho těchto mutagenů vyžaduje metabolickou aktivaci enzymy metabolizujícími xenobiotika jako jsou CYP1A1 a CYP1A2. Genetické polymorfismy těchto enzymů mohou měnit jejich aktivitu a tím částečně vysvětlit rozdíly v náchylnosti jedinců na srdeční onemocnění v souvislosti s kouřením. Bylo zjištěno, že pacienti s genotypem, kde došlo k substituci A>C na pozici 734 (*CYP1A2* *1F), mají nízkou indukovatelnost enzymu, což je spojeno se zvýšeným rizikem infarktu myokardu (Cornelis, 2004). V jiné studii se sledoval vliv kávy na rozvoj infarktu myokardu. Podle této studie jsou zvýšeným rizikem ohroženi pouze jedinci nesoucí alelu *CYP1A2* *1F, což jsou „pomalí“ metabolizátoři kofeinu, oproti jedincům s homozygotní alelou *CYP1A2* *1A, kteří jsou označováni jako „rychlí“ metabolizátoři kofeinu (Cornelis et al., 2006).

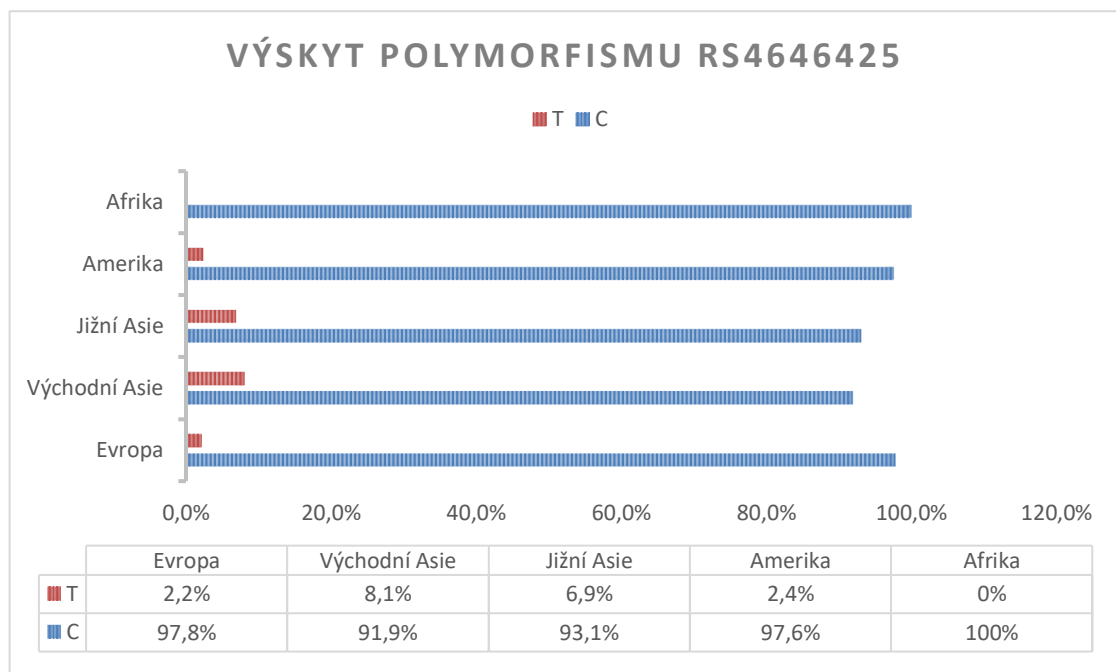
6.3.4 *CYP1A2 a psychická onemocnění*

Mezi základní metody v léčbě duševních poruch patří psychofarmakoterapie. U deprese nebo schizofrenie však velká část pacientů (30-50 %) na léčbu dostatečně neodpovídá. Zda je podávaná léčba skutečně neúčinná se však potvrdí až za 3-6 týdnů od počátku terapie a až po této době může být zahájena léčba jiným psychofarmakem. Dochází tedy k tomu, že jsou pacienti léčeni pro ně neúčinným léčivem, které může mít závažné vedlejší účinky (Juřica a Hosák, 2011). Ve studii, která se zabývala pacienty trpící depresivní poruchou, kteří byli léčeni antipsychotikem Escitalopram, byla pozorována odlišná odpověď na léčivo v závislosti na rozdílném genotypu. U pacientů s genotypem CC (rs4646425) se vyskytovalo méně závažnějších účinků v porovnání s genotypem TT. U pacientů nesoucí genotyp TT byla léčba spojena se zvýšenou nevolností, zvracením a únavou. Tyto rozdíly byly pozorovány ve 2. týdnu léčby. Po 4, nebo 8 týdnech již nebyl pozorován žádný významný rozdíl (Kuo et al., 2013). Ve studii zaměřené na pacienty léčící se přípravkem Paroxetin byly sledovány 4 SNP (rs4646425, rs2472304, rs2470890, rs762551). U všech těchto polymorfismů byla prokázána asociace s depresivní poruchou při léčbě Paroxetinem. U polymorfismu rs4646425 byl genotyp CC spojen s pomalejší

odpovědi na léčivo a zároveň zvýšenou pravděpodobností výskytu remise v porovnání s genotypem TT, kde byla prokázána naopak rychlejší doba odezvy na léčbu a snížená pravděpodobnost výskytu remise. U genotypu rs762551 byla zjištěna souvislost s léčebnou dávkou Paroxetinu ve 4. týdnu léčby, kdy u pacientů nesoucích alelu A byla potřeba vyšší dávka léčiva oproti pacientům s alelou C (Lin et al., 2010).

6.4 Polymorfismus rs4646425

V bakalářské práci jsem se zabývala různými polymorfismy v genu *CYP1A2*, avšak vyšetřovala jsem jeden konkrétní polymorfismus a to rs4646425. Jak je již popsáno výše, tento polymorfismus souvisí zejména s odlišnou odpovědí pacientů na antipsychotická léčiva například Escitalopram, nebo Paroxetin. Polymorfismus rs4646425 je poměrně vzácný ve všech etnických skupinách. Alela T má největší výskyt v asijské populaci. Konkrétně ve východoasijské populaci to je 8,1 % a v jižní Asii 6,9 %. Naopak v africké populaci se tato alela na základě získaných poznatků nevyskytuje (Thorn et al., 2012).



Obrázek 5: Výskyt polymorfismu rs4646425 v populaci (Thorn et al., 2012)

7 Laboratorní vyšetření polymorfismu *CYP1A2*

7.1 PCR

PCR je zkratka z angl. Polymerase chain reaction, tedy polymerázová řetězová reakce. PCR má široké využití v molekulární biologii a genetice. Příchod této metody velmi urychlil postup studií genomové struktury různých organismů. Tato metoda je důležitá například pro detekci genetických onemocnění, klinickou a forenzní analýzu nebo pro detekci patogenů u lidí, zvířat rostlin a v potravinách. Jedná se o základní metodu pro výzkumy molekulární biologie. Metodu PCR vynalezl americký vědec Kary Mullis, a protože se tato metoda stala klíčovým objevem pro práci s DNA, roku 1993 za ní získal Nobelovu cenu (Erlich, 1989). Díky PCR může být každá oblast i ve vysoce komplexních genomech během několika hodin specificky amplifikována. PCR umožňuje produkci neomezeného množství kopií DNA prostřednictvím sekvenčně specifických primerů, které můžeme následně klonovat, separovat pomocí elektroforézy nebo kvantifikovat. Bez schopnosti vytvářet kopie molekul DNA by nebylo možné mnoho vzorků vůbec analyzovat. To platí především pro forenzní analýzu, kde je jak množství, tak kvalita získaného vzorku značně omezena. Namnožení DNA je umožněno díky přístroji, který se nazývá termální cykler. Pomocí termálního cykleru je možné rychle měnit teplotu v mikrokumavkách, které jsou vkládány do centrální části přístroje tzv. termálního bloku. Pro provedení PCR reakce je nejprve nutné připravit si chemikálie. PCR směs se připravuje ve dvou složkách. První složkou je „master mix“, který obsahuje vodu, pufr pro *Taq*-polymerázu, hořčík, deoxyribonukleotidové trifosfáty (dNTP), primery A a B (přímý a zpětný), *Taq*-polymerázu, $MgCl_2$, KCl a Tris-HCl. DNA polymeráza katalyzuje reakci replikace. *Taq*-DNA polymeráza je získávána z bakterie *Thermus Aquaticus*. Tyto bakterie žijí v horkých pramenech při teplotách 72 °C a k jejich denaturaci dochází až při teplotách přesahujících 90 °C. Druhou složku tvoří směs vzorku DNA a vody (Snustad and Simmons, 2017).

Principem metody PCR je cyklické střídání teplot, tedy ohřívání a chlazení, čímž dochází k denaturaci dvouvláknové molekuly DNA, navázání primeru a následnému vytvoření nového vlákna. Tyto cykly mají 3 kroky: denaturace, annealing, elongace (Kuciel a Urban, 2016).

1) Denaturace

K denaturaci dvoušroubovice DNA dochází krátkým zahřátím vzorku na dostatečně vysokou teplotu což je přibližně 90-95 °C, aby došlo k přerušení vodíkových vazeb, které drží komplementární řetězce DNA pohromadě. Proces denaturace má několik cyklů, přičemž první cyklus je nejdelší (2-9 minut), aby došlo k rozpletení všech dvojvláken DNA. Následující cykly jsou zřetelně kratší, trvají přibližně 15-30 sekund. Výsledkem denaturace je oddělování dvojitého řetězce, aby poskytly jednovláknovou DNA (Kuciel a Urban, 2016).

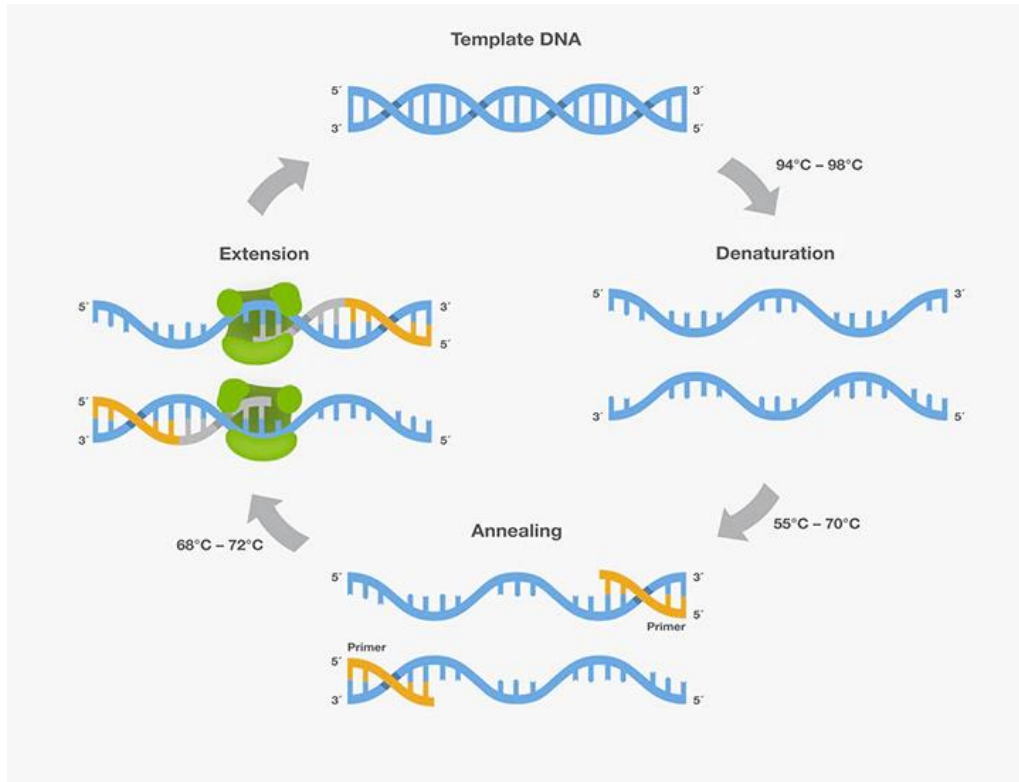
2) Annealing

Annealingem se rozumí hybridizace komplementárních primerů (oligonukleotidů) na konkrétní místo templátové DNA. Připojování primerů trvá přibližně 15-30 sekund a dochází k tomu při teplotě mezi 55-65 °C. Po ochlazení se oligonukleotidové primery mohou vázat na základě párování bází na komplementární sekvenci jednovláknové DNA (Kuciel a Urban, 2016).

3) Elongace

Dále dochází k prodlužování připojených primerů. Je potřeba, aby došlo k replikaci úseku DNA, která je komplementární k oligonukleotidovým primerům, toho se docílí použitím DNA polymerázy. Primer poskytuje volnou 3'OH skupinu, která je potřebná pro navázání dalšího nukleotidu a k prodloužení řetězce. Tato fáze prodlužování primerů se nazývá elongace a probíhá při zahřátí na teplotu 68-72 °C (Kuciel a Urban, 2016). Proces elongace je vlastně replikací nukleové kyseliny, avšak ve specifickém úseku, který je ohraničen dvěma primery. Původně byla jako DNA polymeráza používána *E. Coli*. Z důvodu inaktivace enzymu vysokou teplotou během denaturace se musel ve fázi elongace při každém cyklu přidávat čerstvý enzym, což celou reakci komplikovalo a prodlužovalo. Proto velkým přínosem pro PCR reakci byl objev termostabilní DNA polymerázy v termofilní bakterii *Thermus Aquaticus*. *Taq*-polymeráza (*T. Aquaticus*) zůstává po dobu denaturace aktivní. *Taq* polymeráza má však nevýhodu v tom, že na rozdíl od většiny polymeráz nemá 3' → 5' korekční aktivitu, to způsobuje vznik chyb při replikaci s vyšší četností, než je obvyklé. Proto, pokud je kladen důraz na vysokou přesnost, používají se polymerázy, které tuto korekční aktivitu vykazují například *Pfu*-polymeráza (z *Pyrococcus furiosus*). Další nevýhoda *Taq*-polymerázy spočívá

v neúčinné amplifikaci DNA úseků, které jsou delší než několik tisíc nukleotidových párů. Při amplifikaci dlouhých úseků je proto potřeba použít jinou polymerázu, například *Tfl*-polymerázu, která je schopna amplifikovat fragmenty do velikosti 35 Kb (Rychlik, 1990).



Obrázek 6: Ilustrace hlavních kroků PCR (zdroj: Thermo Fisher Scientific, dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations.html>)

Tyto 3 fáze-denaturace, annealing a elongace se opakují třicetkrát až čtyřicetkrát. Po jednom replikačním cyklu z původní DNA dvoušroubovice vznikají dvě nové, po dvou cyklech 4, po 3 cyklech 8 atd. Po 30 amplifikačních cyklech se vytvoří přes miliardu kopií sekvence DNA, což je cílem PCR reakce. Množství namnožené DNA lze kontrolovat pomocí elektroforézy na agarovém gelu (Kuciel a Urban, 2016).

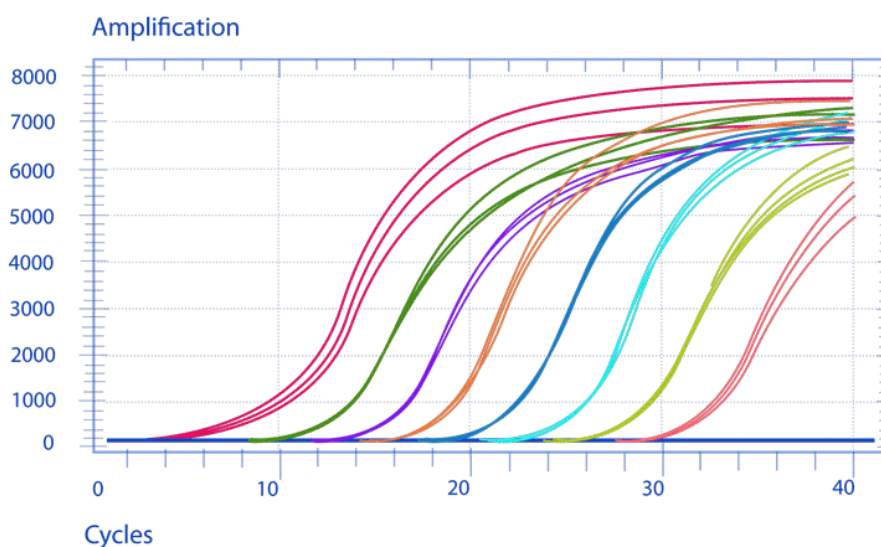
7.1.1 Optimalizace PCR

Optimalizace PCR je proces, během kterého dochází k výběru a testování parametrů ovlivňujících reakci tzn. složení reakční směsi, nebo časový a teplotní průběh reakce. Optimalizace se provádí jak při sestavování nové PCR, tak při zavádění metodiky, která

byla převzata z literatury, jelikož konkrétní podmínky laboratoře se mohou lišit (Kočárek, 2007).

7.1.2 Real-time PCR

Real-time PCR, označována také jako kvantitativní PCR, nebo kinetická analýza, byla poprvé popsána v 90. letech v USA a jedná se o variaci klasické PCR, to znamená, že se provádí stejným způsobem (denaturace dvouvláknové DNA s následným nasednutím primerů a prodloužením). Odlišnost spočívá v procesu detekce. Metoda Real-time PCR slouží k amplifikaci DNA fragmentů v reálném čase. Jedná se o široce používanou metodu kvantifikace DNA nebo RNA. Pomocí fluorescenčních barviv, která se specificky nebo nespecificky váží na amplifikovanou DNA, se měří množství DNA v každém cyklu reakce. Síla fluorescenčního signálu je přímo úměrná množství PCR produktu a závisí na počtu amplifikačních cyklů. Pokud je konkrétní sekvence DNA/RNA ve vzorku přítomna ve velkém množství je možné amplifikaci pozorovat již v dřívějších cyklech. Pokud je množství sekvence malé, amplifikaci pozorujeme v cyklech pozdějších. Změna fluorescence v průběhu reakce se měří pomocí přístroje, který kombinuje tepelné cyklování s možností detekce fluorescence. Mezi hlavní výhody Real-time PCR patří možnost sledovat průběh reakce, ke které dochází v reálném čase, díky tomu lze měřit množství DNA produktu v každém cyklu. Amplifikace a detekce probíhá v jedné zkumavce, čímž je eliminována post PCR manipulace (Mackay, 2002).

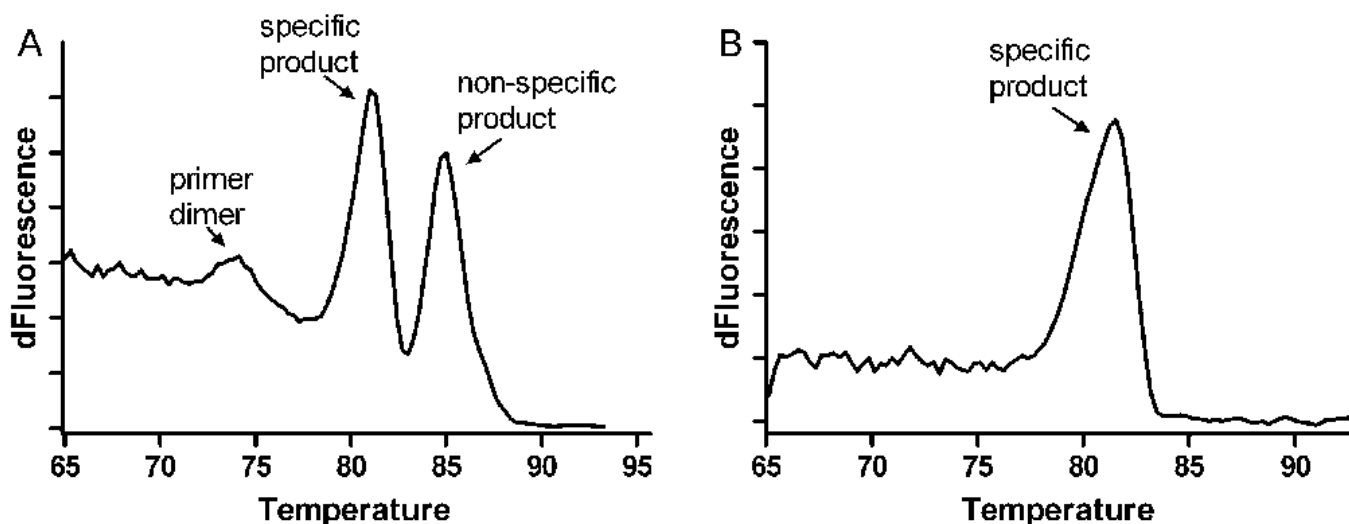


Obrázek 7: PCR amplifikace (zdroj: QPCR services. Genechron, dostupné z: <http://www.genechron.com/en/services/translational-and-clinical-services/qpcr-services>)

Fluorescenční sondy

Jako zdroj fluorescence se využívá několik technologií, z nichž nejpoužívanější je SyberGreen. SyberGreen je fluorescenční barvivo, které se váže jen na dvouvláknovou DNA (dsDNA), tzn., že na jednovláknovou DNA (ssDNA) se nenaváže. V momentě, kdy se naváže na dsDNA, začne fluoreskovat. Tím, jak se během cyklu PCR reakce vytváří stále větší množství dvouvláknového produktu, ke kterému se barvivo připojuje a fluoreskuje, je generováno rostoucí množství fluorescenčního signálu. Sonda SyberGreen se váže kdekoliv na DNA, tzn., že její vazba je nespecifická. Z tohoto důvodu může být přesnost výsledků nižší, než je tomu u ostatních substrátů, jako například TaqMan, kde dochází k vazbě specifických fluorescenčních sond na konkrétní místo DNA. Sonda TaqMan je označena dvěma fluorescenčními skupinami, reportér (fluorofor), který je připojen k 5' konci sondy a zhášec připojen k jeho 3' konci. Tato sonda je komplementární k vnitřnímu segmentu stanovované DNA. Zhášec, pokud je v těsné blízkosti reportéru, pohlcuje jeho fluorescenci. Během PCR však Taq polymeráza prodlužuje primer na cílovém řetězci, čímž dojde k přerušení vlivu zhášeče na reportér a dochází k fluorescenci (Butler, 2005). Mezi specifické sondy řadíme také fluorescenční sondy FRET. Sondy FRET jsou dvě fluorescenční barviva (červená, zelená), které fungují na základě odlišnosti vlnových délek a emisní energie. Zelené barvivo má vyšší emisní energii ve srovnání s barvou červenou. V případě, že jsou obě barviva v těsné blízkosti dochází k tomu, že excitovaná energie zeleného barviva je přenášena do barviva červeného a tím dochází k potlačení zeleného signálu. Pokud se barviva v těsné blízkosti nenachází, je zelenému barvivu umožněno vysílat plný signál (Mackay, 2002).

Existuje mnoho modelů pro Real-time PCR. Každý model musí být vybaven zdrojem excitace, který excituje fluorescenční barviva, detektorem pro detekci fluorescenční emise a termálním cyclerem. Dále pak softwarem pro sběr a analýzu dat. Specifičnost Real-time PCR je dána použitím primerů a dodržáním reakčních podmínek. Nicméně vždy je zde možnost, že i dobře navržené primery mohou vytvářet dimery primerů, nebo amplifikovat nesprávný produkt. Může dojít k tomu, že vzorek RNA by mohl obsahovat genomovou DNA, která by byla také následně amplifikována. Specifičnost Real-time PCR reakce lze potvrdit pomocí analýzy křivky tání, která je schopna detekovat přítomnost nespecifických produktů (Real-time PCR: Principles and Applications, 2019).



Obrázek 8: Křivka tání - (A) tvorba dimerů primerů a nespecifického produktu; (B) tvorba specifického produktu. (Holopainen et al., 2011)

Metoda Real-time PCR je díky své vysoké citlivosti, možnosti zpracovávat více vzorků současně a schopnosti okamžitě poskytovat informace o průběhu reakce, široce využívanou metodou. Umožňuje vypočítat počáteční koncentraci templátu, a proto je často používána při vyhodnocování počtu kopií DNA, při stanovování virové zátěže nebo detekce jednonukleotidových polymorfismů (Real-time PCR: Principles and Applications, 2019).

8 Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo:

- Obeznámit se s danou problematikou a pomocí odborných publikací vypracovat odbornou rešerži na téma Vyšetření polymorfismů v genu *CYP1A2* a jejich klinický význam.
- Praktické zvládnutí základních laboratorních metod v genetické laboratoři: izolace DNA, měření koncentrace DNA, příprava Master mixu a následné provedení Real-time PCR.
- Analýza a vyhodnocení získaných výsledků.

9 Metodika

Praktická část bakalářské práce probíhala pod odborným dohledem vedoucí práce, Mgr. Dagmar Rieger Bystřické, Ph.D., v genetické laboratoři GENLABS. Po řádném proškolení a seznámením s laboratorními postupy jsem vykonávala praktickou část bakalářské práce, jejíž součástí byla izolace DNA z periferní krve nebo bukalního stěru, stanovení její koncentrace a vlastní analýza polymorfismu genu *CYP1A2* pomocí metody Real-time PCR.

9.1 Preanalytická část

Jedním z nejdůležitějších bodů laboratorního vyšetření z hlediska ovlivnění výsledků je preanalytická fáze. Tato část předchází samotnému laboratornímu vyšetření a zahrnuje odběr biologického materiálu a jeho transport, identifikaci vzorků a jejich uschování v případě, že vyšetření není provedeno okamžitě. Do preanalytické fáze také spadá poučení pacienta o správném provedení odběru v případě bukalního stěru, který si pacient provádí sám. Do laboratoře může být přijat pouze vzorek, který je řádně odebraný a označený. Spolu se vzorkem musí být přítomna laboratorní žádanka a informovaný souhlas s molekulárně-genetickým vyšetřením. Každá zkumavka, která obsahuje vzorek musí být označena datumem odběru, jménem a příjmením klienta, jeho identifikačním číslem a v případě, že se nejedná o samoplátce také číslem pojištěnce a pojišťovny.

9.1.1 Bukální stěr

Aby genetické vyšetření proběhlo úspěšně a bylo získáno dostatečné množství materiálu k následné izolaci DNA, je potřeba vzorek správně odebrat. Bukální stěr si provádí pacient sám po řádném proškolení odborným pracovníkem. Pacient obdrží odběrovou sadu, jejíž součástí jsou instrukce k odběru. Je důležité, aby pacient 60 minut před odběrem nejedl, neprováděl ústní hygienu a pil pouze čistou neslazenou vodu. Aby nedošlo k nechtěné kontaminaci vzorku, měl by si pacient před manipulací s odběrovou sadou umýt ruce. Po celou dobu manipulace s odběrovým tamponem se musí zamezit styku odběrového tamponu s jakýmkoli jiným materiálem než s bukalní sliznicí vyšetřovaného pacienta. Odběrový tampon se uchopuje za nesterilní část (tyčku). Samotný stěr pak probíhá tak, že si pacient vloží vatovou tyčinku do úst a důkladně otírá vnitřní stěny tváří a záhyby mezi tvářemi. Aby se využila celá plocha odběrového tamponu, je zapotřebí s ním otáčet. Pro získání co největšího množství materiálu je

vhodné vyvíjet tamponem na povrch sliznice tlak a sliznici otírat minimálně po dobu 1 minuty. Po správně provedeném odběru vloží pacient tampon do odběrové zkumavky, kterou je potřeba označit jeho osobními údaji pro následnou identifikaci.

9.1.2 Periferní krev

Odběr periferní krve je prováděn vyškoleným pracovníkem v odborném zdravotnickém zařízení. Pro izolaci DNA je pacientovi odebíráno 5-10 ml venosní krve do zkumavky s 0,3 ml 0,5M EDTA. EDTA (ethylendiaminotetraoctová kyselina) vyvazuje Ca^{2+} ionty a tím zajišťuje inaktivaci nukleáz. Nukleázy jsou za normálního stavu přítomny v cytoplazmě buňky a štěpí nukleové kyseliny. Pokud by tedy nukleázy zůstaly v aktivním stavu, rozštěpily by DNA a RNA a nebylo by možné provést následnou analýzu (Kočárek, 2007). Pro většinu genetických vyšetření není nutné, aby byl pacient na lačno. Samotný odběr je ve většině případů prováděn z loketní žíly z důvodu snadné přístupnosti a možné opakovatelnosti. Paže musí být v natažené poloze bez pokrčení v lokti. Místo vpichu se dezinfikuje dezinfekčním prostředkem. Aby nedošlo k následné hemolýze, je potřeba nechat dezinfekci zaschnout.

9.1.3 Materiál

Pro analýzu polymorfismu rs4646425 v genu *CYP1A2* bylo použito 47 vzorků. Vzorky pacientů byly získány ve spolupráci s Psychiatrickou ambulancí v Ústřední vojenské nemocnici v Praze. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas s genetickým laboratorním vyšetřením.

9.2 Izolace DNA

Izolace DNA je prvním krokem pro molekulárně genetickou analýzu. Jedná se o rutinní techniku používanou v molekulární biologii a genetice. Samotný proces lze rozdělit na dva základní kroky – lyze buněk a následné přečištění nukleových kyselin. Prvním krokem pro izolaci DNA je lyze buněk. Lyzí buněk dojde k deformaci buněčné membrány a tím k uvolnění DNA. Rozbití buněčných membrán lze docílit buďto mechanicky pomocí homogenizace, nebo pomocí enzymů (proteináza). Popřípadě kombinací obou těchto postupů. Lyzí buněk dojde k uvolnění celého jejich obsahu, čímž vznikne směs obsahující nejen samotnou DNA, ale i další komponenty jako jsou zbytky buněčných membrán, proteinů a polysacharidů. Tyto komponenty musí být následně odstraněny v druhé části izolace DNA. Cílem izolace DNA je získání čisté DNA bez

těchto kontaminantů. DNA může být izolována z leukocytů, které získáváme z periferní krve, nebo z buněk dutiny ústní získané bukalním stěrem. Izolovanou DNA i RNA lze skladovat při -20 °C. RNA je z důvodu její nestability možné uchovávat maximálně 1 měsíc.

9.2.1 Izolace DNA z bukalního stěru

Izolaci DNA jsem prováděla pomocí komerčního kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV mini. Použité reagentie a jejich skladování jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Seznam reagentií izolačního kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV mini a jejich skladování

Reagentie	Podmínky skladování
PBS pufr	Pokožová teplota
Proteináza K	-20 °C
BL pufr	Pokožová teplota
BW pufr	Pokožová teplota
TW pufr	Pokožová teplota
AE pufr	Pokožová teplota
Ethanol (100 %)	Pokožová teplota

Nejprve jsem si z mrazícího boxu vyndala proteinázu K a při pokojové teplotě ji nechala rozmrazit. Do zkumavky, která obsahovala tampon pro bukalní stěr, jsem napipetovala 400 µl PBS pufru, 40 µl proteinázy K a 400 µl BL pufru. Pomocí vortexu jsem vzorek důkladně promíchala a následně vložila na 10 minut do inkubátoru, který jsem si předem vyhřála na 60 °C. Pro odstranění kapek z vnitřní strany víčka jsem vzorek krátce stočila. Poté jsem přidala 400 µl 100% ethanolu, vortexovala v pulzech a znovu krátce stočila. V dalším kroku jsem celou směs přenesla ve dvou krocích na kolonku. Na kolonku jsem nejprve napipetovala 700 µl a centrifugovala 1 minutu při 6000 x g. Následně jsem na kolonku napipetovala zbytek směsi a opět centrifugovala. Po centrifugaci jsem nahradila sběrnou zkumavku novou sběrnou zkumavkou a přidala 600 µl BW pufru. Poté jsem znovu centrifugovala 1 minutu při 6000 x g, opět vyměnila sběrnou zkumavku a napipetovala jsem 700 µl TW pufru. Po přidání TW pufru jsem vzorek centrifugovala 1 minutu při 6000 x g. Ze sběrné zkumavky jsem odstranila supernatant a kolonku vrátila zpět do sběrné zkumavky. Aby došlo k odstranění zbytkového promývacího pufru, centrifugovala jsem vzorek při nejvyšších otáčkách 1 minutu. Mezitím jsem si připravila novou 1,5 ml mikrozukmavku s víčkem, kterou jsem popsala příslušným označením

vzorku. Po centrifugaci jsem kolonku umístila do této zkumavky a napipetovala přímo na střed filtru kolonky 50 µl AE pufru. Zkumavku jsem vložila do inkubátoru a inkubovala po dobu 5 minut. Po inkubaci jsem vzorek centrifugovala 1 minutu při nejvyšších otáčkách. Poté jsem znovu přidala AE pufr a opět inkubovala po dobu 5 minut. Nakonec jsem zkumavku s kolonkou centrifugovala 1 minutu při nejvyšších otáčkách.

9.2.2 *Izolace DNA z periferní krve*

Izolaci DNA z periferní krve jsem prováděla pomocí komerčního kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV Mini. Použité reagentie a jejich skladování jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Seznam reagentií izolačního kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV mini a jejich skladování

Reagencie	Podmínky skladování
Proteináza K	-20 °C
BL pufr	Pokojová teplota
BW pufr	Pokojová teplota
TW pufr	Pokojová teplota
AE pufr	Pokojová teplota
Ethanol (100 %)	Pokojová teplota

Nejprve jsem si nechala vytemperovat termostat na 60 °C, vyndala proteinázu K z mrazíčního boxu a připravila jsem si 1,5 ml mikrozkušavky, které jsem řádně a čitelně popsala. Do popsané mikrozkušavky jsem napipetovala 20 µl proteinázy K a následně přidala 200 µl vzorku. Do mikrozkušavky se vzorkem a proteinázou K jsem napipetovala 200 µl BL pufru. Zkušavku jsem krátce zvortexovala, aby došlo k promíchání vzorku. Poté jsem zkumavku vložila do předem vytemperovaného termostatu a inkubovala při 60 °C. Pro odstranění kapek z vnitřní strany a víčka zkumavky jsem směs krátce stočila na minicentrifuze. Dále jsem do zkumavky napipetovala 200 µl 100% ethanolu, vortexovala v pulzech a znovu krátce stočila na minicentrifuze. V dalším kroku jsem směs opatrně přenesla na kolonku, a poté centrifugovala po dobu 1 minuty při 8000 rpm. Po centrifugaci jsem sběrnou zkumavku nahradila novou sběrnou zkumavkou, přidala 600 µl BW pufru. Opět jsem směs centrifugovala 1 minutu při 8000 rpm a sběrnou zkumavku jsem nahradila novou sběrnou zkumavkou. Zkontrolovala jsem, zda je supernatant průhledný. Pokud průhledný nebyl tento krok jsem opakovala znovu. Dále jsem do směsi napipetovala 700 µl TW pufru a 1 minutu centrifugovala při 8000 rpm. Ze sběrné

zkumavky jsem odstranila supernatant a kolonku jsem do ní opět vrátila. Aby došlo k odstranění zbytkového promývacího pufru, centrifugovala jsem směs při nejvyšších otáčkách po dobu 1 minuty. Kolonku jsem umístila do nové popsané 1,5 ml mikrozkuavky s víčkem a přímo na střed filtru kolonky jsem přidala 50 μ l AE pufru. Vzorky jsem následně inkubovala 5 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci jsem zkumavky přesunula do centrifugy a centrifugovala 1 minutu při nejvyšších otáčkách. Dále jsem na kolonku znovu napipetovala 50 μ l AE pufru a směs jsem inkubovala 5 minut při pokojové teplotě. Nakonec jsem při nejvyšších otáčkách centrifugovala po dobu 1 minuty.

9.2.3 Měření koncentrace DNA ě

Koncentraci nukleových kyselin jsem zjišťovala pomocí Qubit dsDNA Assay Kit, s použitím přístroje QubitTM 2.0 Fluorometer. Součástí této sady byly také mikrozkuavky QubitTM assay tubes. Reagencie, které jsem použila, jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7: Seznam použitých reagentů pro měření koncentrace izolátu DNA a jejich skladování

Reagencie	Podmínky skladování
Qubit TM dsDNA BR reagent (Component A)	Pokojová teplota
Qubit TM dsDNA BR buffer (Component B)	Pokojová teplota
Qubit TM dsDNA BR Standart #1 (Component	Lednice (≤ 4 °C)
Qubit TM dsDNA BR Standart #2 (Component	Lednice (≤ 4 °C)

Před vlastním měřením jsem nechal pufrů a standardů vytemperovat při pokojové teplotě. Mezitím jsem si pro každý vzorek a standardy připravila mikrozkuavky, které jsem čitelně popsala.

Nejprve jsem začala s přípravou pracovního roztoku. Podle počtu vzorků jsem vypočítala objemy potřebné pro jeho přípravu. Pro každý vzorek jsem napipetovala 199 μ l Componentu B a 1 μ l Componentu A. Celkový objem pracovního roztoku byl 200 μ l (199 μ l + 1 μ l) pro každý vzorek. Mikrozkuavky s tímto obsahem jsem zvortexovala a krátce zcentrifugovala na minicentrifuze. Poté jsem 190 μ l připraveného roztoku rozpipetovala do mikrozkuavek pro standardy, které jsem si předem připravila a následně přidala 10 μ l QubitTM dsDNA BR Standart #1 (Component C) do jedné mikrozkuavky a 10 μ l QubitTM dsDNA BR Standart #2 (Component D) do druhé

mikrozkumavky. Do připravených mikrozkumavek pro vzorky jsem napipetovala 198 μ l pracovního roztoku a 2 μ l izolátu DNA (výsledný objem byl 200 μ l). Mikrozkumavky jsem zvortexovala a krátce stočila na minicentrifuze a nechala je inkubovat 2 minuty při pokojové teplotě. Po inkubaci jsem provedla vlastní měření na fluorometru QubitTM 2.0.

9.3 Příprava Master Mixu

Analýza rs4646425 *CYP12* byla provedena pomocí metody Real-time PCR s použitím komerčně dostupného kitu LightSNiP rs4646425 CYP1A2. Pro Real-time PCR byl použit přístroj LightCycler 2.0 firmy Roche, který využívá skleněné kapiláry.

Při přípravě reakční směsi jsem postupovala podle uživatelského manuálu TIB MOLBIOL. Reakční směs jsem připravovala pomocí kitu LightCycler[®] FastStart DNA Master HybProbe (Roche). Pozitivní kontrola nebyla součástí kitu. Jako pozitivní kontrola byl použit vzorek DNA o známé koncentraci, u něhož nebyl předem znám genotyp, jelikož před první reakcí nebyl vzorek o známém genotypu k dispozici. Reagent Mix se přidává v množství 1 μ l pro 20 μ l reakční směsi. Zhotovená směs obsahuje všechny potřebné primery a sondy pro provedení 96 reakcí. Složení 20 μ l reakční směsi je uvedeno v tabulce 8.

Tabulka 8: Reagencie pro přípravu Master Mixu

Komponenty	Množství (μ l)
H ₂ O	14,4-10,4
Reagent Mix	1,0
FastStart DNA Master	2,0
MgCl ₂ (25 mM)	1,6
DNA	1,0-5,0

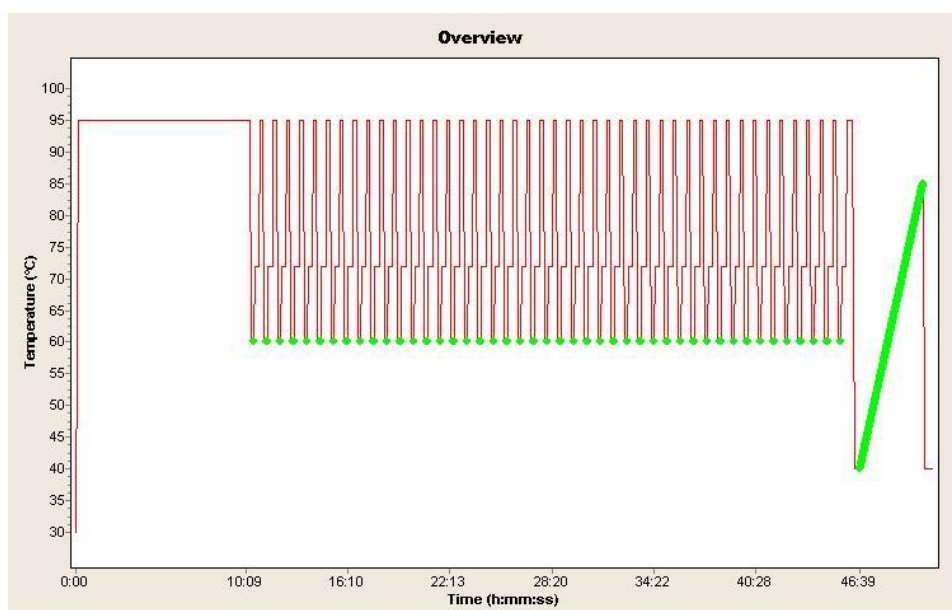
9.4 Real time PCR

Nejprve jsem vytemperovala reagencie na pokojovou teplotu, následně jsem je zvortexovala a krátce stočila na minicentrifuze. Dále jsem si v dekontaminovaném laminárním boxu připravila skleněné kapiláry. Podle tabulky 8 jsem vypočítala množství jednotlivých reagentů pro příslušný počet vzorků a dvě kontroly. Výsledné objemy jsem napipetovala do zkumavky, kterou jsem následně krátce zvortexovala a stočila. Do jednotlivých kapilár jsem napipetovala 17 μ l Master Mixu a 3 μ l jednotlivých DNA izolátů. Do kapiláry pro pozitivní kontrolu jsem místo DNA izolátu napipetovala stejné

množství pozitivní kontroly a do poslední kapiláry, představující negativní kontrolu, jsem napipetovala stejný objem vody. Výsledný objem reakční směsi byl 20 µl. Všechny kapiláry jsem uzavřela víčkem, opatrně přenesla do centrifugy a centrifugovala 10 sekund při 1000 rpm. Při vyjímání kapilár z centrifugy jsem kontrolovala, zda došlo ke stočení směsi na dno kapiláry. Kapiláry, které byly řádně stočené, jsem následně přesunula do karuselu a do cykleru. Na počítači, který je k Light Cycleru 2.0 (Roche) připojený, jsem podle manuálu nastavila příslušný amplifikační program uvedený v tabulce 9.

Tabulka 9: Reakční profil metody Real-time PCR

Program:	Denaturace	Cyklování			Tání			Ochlazení
Cykly	1	45			1			1
Segment	1	1	2	3	1	2	3	1
Teplota [°C]	95	95	60	72	95	40	85	40
Čas [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:10	00:00:10	00:00:15	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30



Obrázek 9: Reakční profil Real-time PCR - na obrázku je možné sledovat změny teploty v průběhu celé reakce; zelená barva znázorňuje snímání intenzity fluorescenčního signálu

10 Výsledky

Metodou Real time PCR bylo celkem vyšetřeno 47 vzorků. V tabulce 10 jsou uvedeny výsledky včetně koncentrací jednotlivých vzorků.

Tabulka 10: Koncentrace vzorků a výsledné genotypy

Číslo vzorku	Koncentrace (ng/ µl)	Genotyp
P1	3,2	C/C
P2	38,6	C/C
P3	63,1	C/C
P4	43,2	C/C
P5	7,01	C/C
P6	11,8	C/C
P7	7	C/C
P8	46,1	C/C
P9	46,1	C/C
P10	41,2	C/C
P11	39,4	C/C
P12	106	C/C
P13	5,48	C/C
P14	83,6	C/C
P15	23,5	C/C
P16	91,6	C/C
P17	3,96	C/C
P18	17,5	C/C
P19	13,5	C/C
P20	15	C/C
P22	1,82	C/C
P23	35	C/C
P25	28,4	C/C
P26	10,2	C/C
P27	18,4	C/C
P28	4,04	C/C
P29	4,44	C/C
P30	4,8	C/C
P32	12,6	C/C
P33	44,7	C/C
P34	13	C/C
P35	25,5	C/C
P36	46,6	C/C

P37	104	C/C
P38	35,5	C/C
P39	42,8	C/C
P40	18,6	C/C
P41	94	C/C
PET31	95,9	C/C
PET44	Nedekovatelná	C/C
PET51	3,99	C/C
PET52	3,97	C/C
PET55	18,2	C/C
PET56	55,3	Nezměřeno
PET58	32,3	C/C
PET59	13,3	C/T
PET60	3,05	C/C

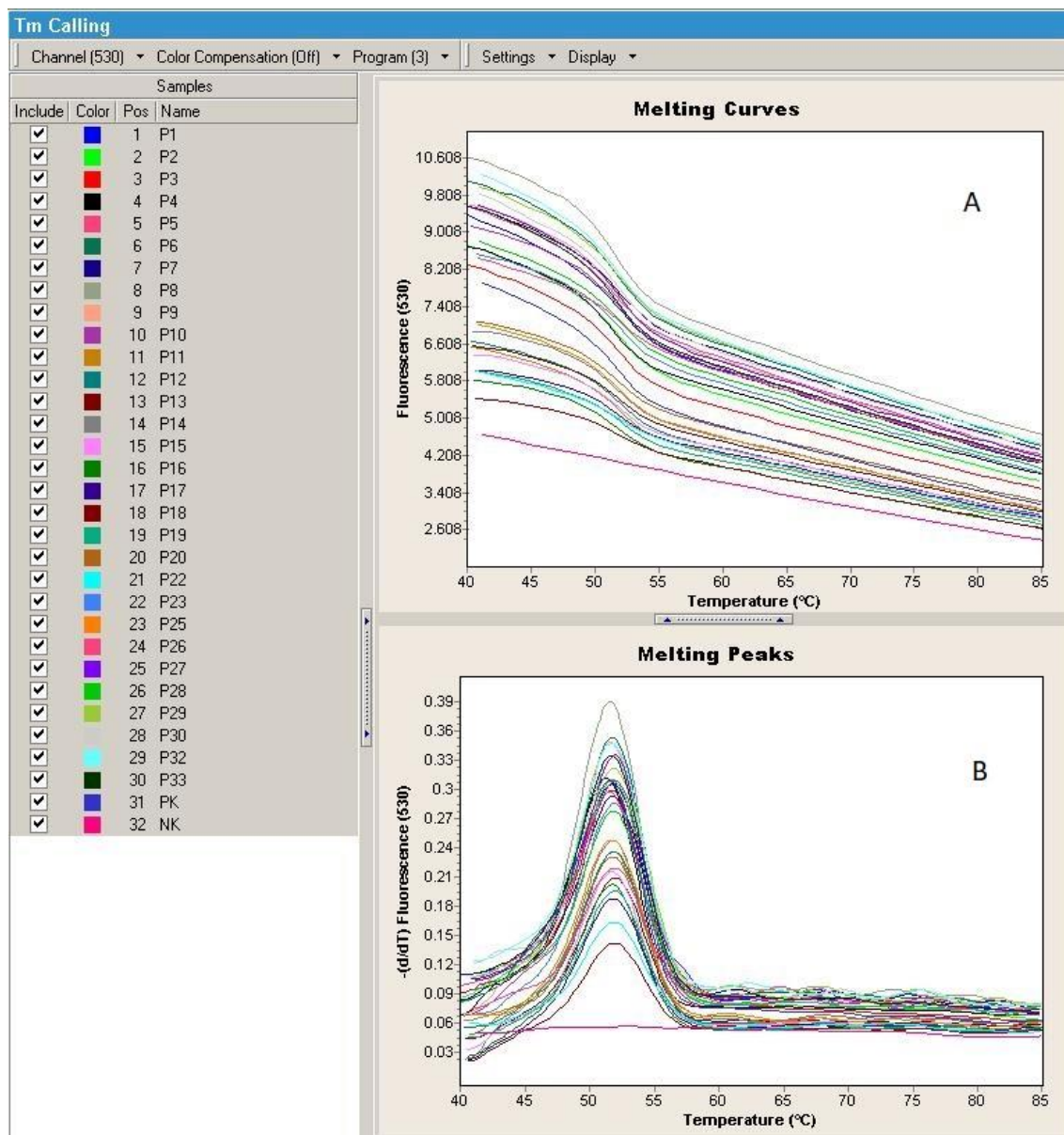
10.1 Křivky tání

Pro analýzu jednonukleotidového polymorfismu byla provedena genotypizace v LightCycleru a programu LightCycler software. Výstupními daty pro analýzu jsou křivky tání. Křivka tání mapuje změnu fluorescence, ke které dochází, když se dvouvláknová DNA (dsDNA) s navázaným fluorescenčním barvivem rozplete na jednovláknovou DNA (ssDNA) během zvyšování teploty. Pokles fluorescence je detekován v momentě, kdy je dosaženo bodu tání v důsledku disociace řetězců DNA a následného uvolňování barviva. Změna intenzity fluorescence, ke které během vlastní melting analýzy dochází, je vnášena do grafu v závislosti na změně teploty.

Abychom rozpoznali případnou kontaminaci vzorku, a to, zda reakce proběhla úspěšně, používáme pozitivní a negativní kontrolu. Negativní kontrola neobsahuje cílovou DNA, takže u ní nedochází k amplifikaci. Negativní kontrola je na obrázku 10B zobrazena jako křivka, která jako jediná nevytvořila pík. Naproti tomu pozitivní kontrola obsahuje známou koncentraci cílové DNA a dochází u ní k amplifikaci, která je charakteristická pro tuto cílovou DNA sekvenci.

Teplota tání je teplota, při které se vlákno DNA rozplétá a mění se v závislosti na sekvenci, délce vlákna a obsahu nukleotidů ve vláknech. Teploty tání se mohou lišit u produktů stejné délky, ale s odlišným obsahem nukleotidů, nebo u produktů, které mají stejnou délku i obsah nukleotidů, ale liší se jejich distribucí.

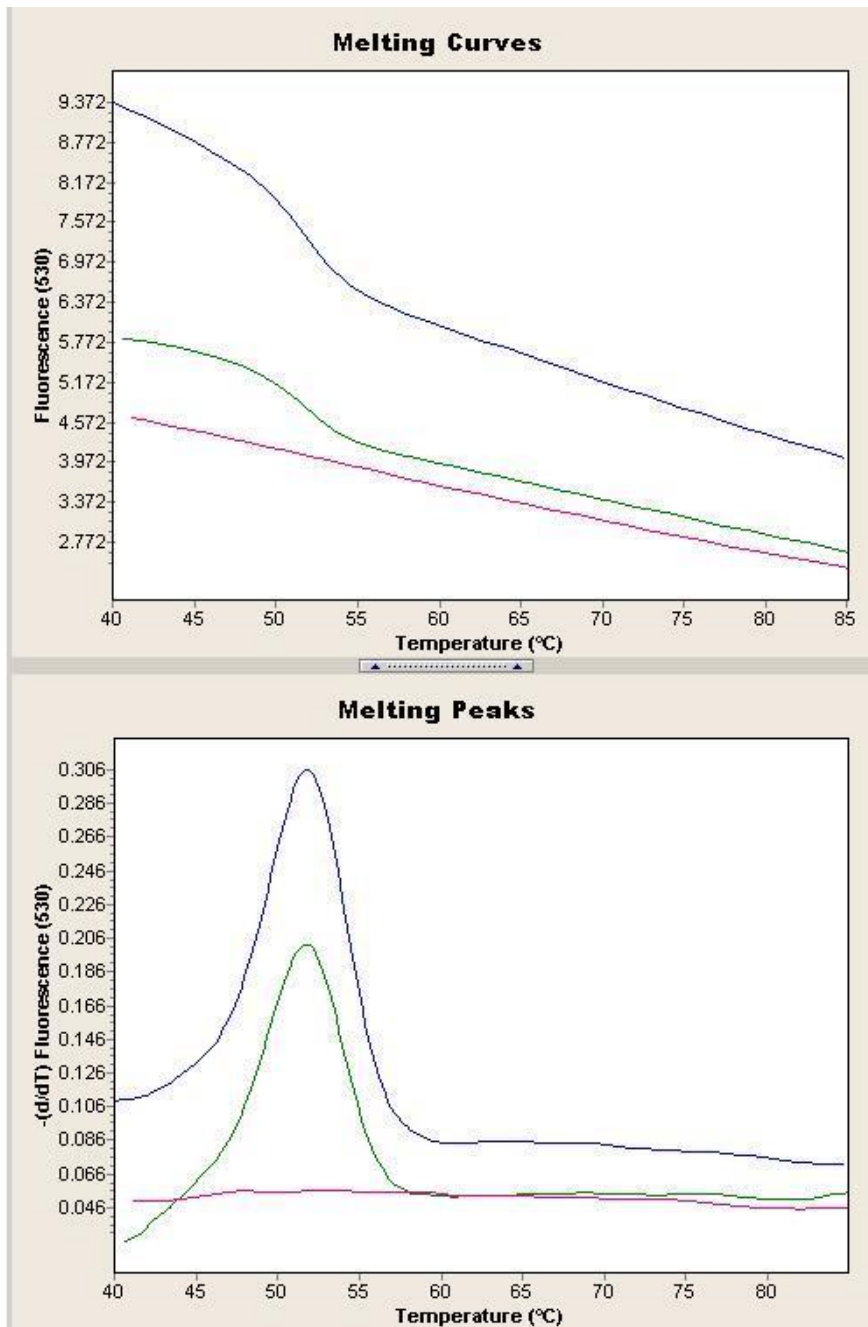
Abychom mohli sledovat průběh PCR v reálném čase a následně analyzovat teplotní profily tání u jednotlivých vzorků, musí být průběžně snímána intenzita fluorescenčního signálu. K tomu dochází v každém cyklu jednotlivě při nasednutí primerů (anealing) a pak kontinuálně během celé melting analýzy. Během melting analýzy dochází ke zvýšení teploty ze 40 °C na 75 °C, současně navázaná sonda odpadá a intenzita vyzařované fluorescence úměrně klesá. V grafu je pokles fluorescence viditelný na obrázku 10A, kde jsou znázorněny klesající křivky.



Obrázek 10: Křivky tání vzorků P1-P33

Na obrázku 10 můžeme vidět křivky tání 30-ti vzorků, včetně pozitivní a negativní kontroly. U obrázku 10A je intenzita fluorescence vynesena proti teplotě. Obrázek 10B znázorňuje výsledky analýzy křivek tání.

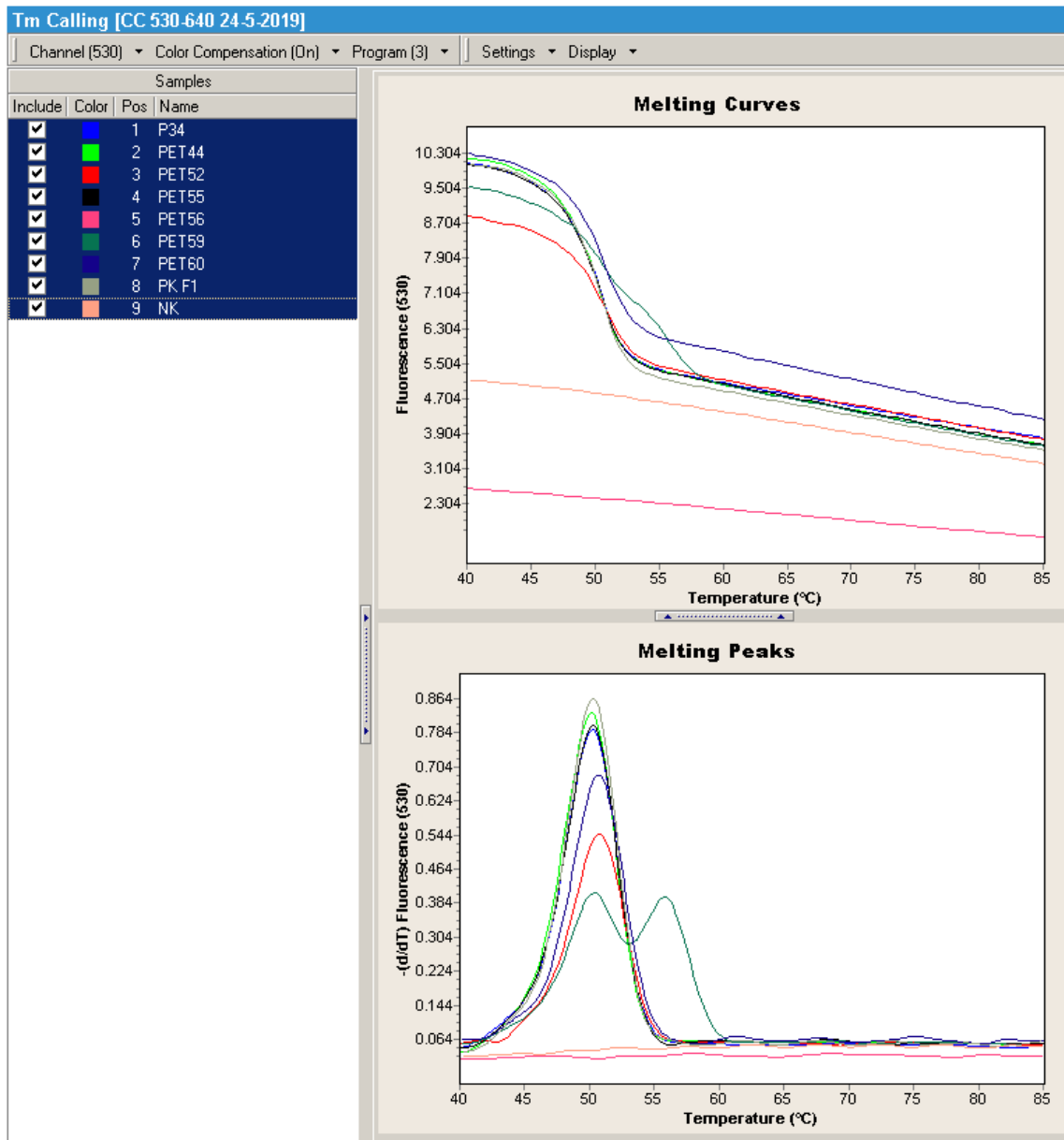
Z analýzy křivek tání lze říct, že všechny vzorky jsou homozygoti s genotypem C/C, což je wild type alela. Lidé s tímto genotypem mají méně závažné vedlejší účinky v porovnání s jedinci, kteří mají heterozygotní genotyp C/T nebo mutovaný homozygotní genotyp T/T.



Obrázek 11: Křivky tání vzorků s nejnižší a nejvyšší koncentrací: modrá křivka – vzorek P16 (koncentrace 91,6 ng/μl); zelená křivka – vzorek P1 (koncentrace 3,2 ng/μl)

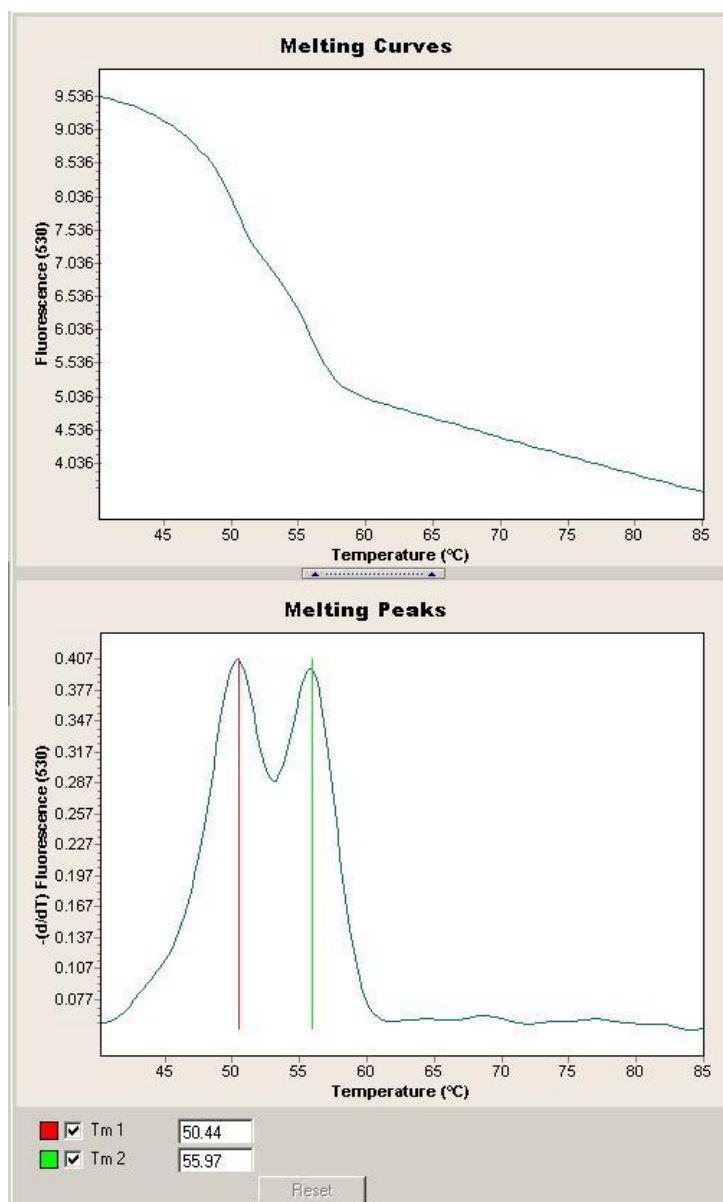
Na obrázku 11 můžeme vidět vzorky s nejvyšší a nejnižší koncentrací DNA izolátu (ze skupiny vzorků P1-P33) spolu s negativní kontrolou. Jedná se o vzorek P1 a P16, kdy vzorek P1 má koncentraci 3,2 ng/μl a u vzorku P16 je koncentrace 91,6 ng/μl. Z tohoto

obrázku je také patrné, že nedošlo ke kontaminaci, protože v negativní kontrole, která neobsahovala templát, PCR neproběhla.



Obrázek 12: Křivky tání vzorků P34 a PET44-PET60: křivka se dvěma píky znázorňuje heterozygota s genotypem T/C; oranžová křivka, netvořící pík, zobrazuje negativní kontrolu; růžová křivka, která také pík nevytvořila, patří vzorku PET56, který nevyšel

Na obrázku 12 jsou znázorněny zbývající vzorky, včetně pozitivní a negativní kontroly. Zde můžeme vidět, že vzorek č. 6 - PET59 je heterozygot s genotypem C/T. Ostatní vzorky jsou homozygotní s genotypem C/C. Vzorek č. 5 - PET56 z důvodu možného pochybení během pipetování nevyšel.



Obrázek 13: Křivky tání heterozygotního vzorku PET59

Křivka na obrázku 13 znázorňuje samostatnou analýzu vzorku PET59. Můžeme si všimnout, že křivka obsahuje 2 píky, což znamená, že byly přítomny obě variantní alely, wild type (C) i mutovaná (T), z nichž každá vykazuje jinou teplotu tání. V našem případě se jedná o heterozygota s genotypem C/T s teplotu tání, která odpovídá 50,44 °C pro alelu C a 55,97 °C pro alelu T. Lidé s tímto genotypem mají závažnější vedlejší účinky při léčbě antipsychotiky jako je Escitalopram nebo Paroxetin.

Ošetřujícím psychiatrem nám byly, na základě konzultací s pacienty, poskytnuty reakce pacientů na léčbu, která jim byla předepsaná. Z celkového počtu 47 pacientů tvoří nejpočetnější skupinu ti, kteří na léčbu reagují pouze částečně (60 %). S dobrým efektem se léčí 32 %, se slabým efektem 4 % a bez úplného efektu 2 %. Jeden pacient ze sledované

skupiny neměl předepsanou medikaci a byl léčen na základě psychoterapie se stabilním efektem.

Tabulka 10: Reakce pacientů na léčbu

Reakce na léčbu	Částečná	Dobrá	Slabá	Bez efektu	Stabilní (bez medikace)
Počet pacientů	28 (60 %)	15 (32 %)	2 (4 %)	1 (2 %)	1 (2 %)

11 Diskuze

Jednonukleotidové polymorfismy jsou nejčastěji se vyskytujícím typem polymorfismu v genomu a jsou zodpovědné za individuální sekvenční, ale i fenotypové rozdíly mezi jednotlivci. Ovlivňují jak náš zevnějšek, například barvu očí a vlasů, tak rozdílnou účinnost léčiv a jejich vedlejší účinky, nebo riziko vzniku některých onemocnění. Vyšetření jednonukleotidových polymorfismů má pro farmakogenetiku velký význam. Identifikace polymorfismů zodpovědných za individuální variabilitu v reakci na léčiva vede k postupnému rozvoji personalizované medicíny, jejímž cílem je léková terapie předepsaná na základě konkrétního genotypu. Gen *CYP1A2* je vysoce polymorfní. Bylo v něm nalezeno více než 20 polymorfních variant. Varianta rs4646425 vzniká substitucí cytosinu za thymin. Jedná se o mutaci v intronu na pozici 75043281 (Geng et al., 2015). Frekvence výskytu tohoto polymorfismu je poměrně nízká. Nejvíce se objevuje v Asii, ve východní Asii nese tento polymorfismus 8,1 % populace a v jižní Asii 6,9 % populace. V Evropě i Americe je jeho přítomnost ještě nižší. V Evropě je to 2,2 % a v Americe 2,4 %.

V rámci této bakalářské práce bylo provedeno pomocí metody Real-time PCR stanovení polymorfismu rs4646425 v genu *CYP1A2* u 47 pacientů s psychiatrickou diagnózou. V této skupině se nachází pouze jeden pacient bez předepsané medikace. Zbylých 46 pacientů užívá antipsychotika v závislosti na konkrétní diagnóze. U všech vzorků byla detekována nemutovaná varianta C/C (Wild type) (97,8 %), pouze u jednoho pacienta (PET59) byl detekován heterozygotní genotyp C/T (2,2 %). Tento výsledek odpovídá výskytu sledovaného polymorfismu v evropské populaci, ovšem je nutné upozornit na poměrně malý počet analyzovaných pacientů, a tedy statistickou neprůkaznost této studie. U heterozygotního pacienta (PET 59) byla stanovena diagnóza paranoidní schizofrenie. V průběhu léčby mu bylo podáváno několik typů antipsychotik – Clozapin, Aripiprazol, Sertralin a Hydroxizin. Na léčiva pacient reagoval pouze částečně. Všechna jmenovaná antipsychotika jsou metabolizována cytochromem P450, avšak pouze na metabolismu Clozapinu se podílí mimo jiné i *CYP1A2*. V aktuálních odborných publikacích jsem nenalezla souvislost mezi polymorfismem rs4646425 a léčbou paranoidní schizofrenie pomocí přípravku Clozapin. Částečná účinnost léčby může být způsobena mnoha faktory, a to jak genetickými, například dalšími polymorfismy, tak i faktory negenetickými. V účinnosti Clozapinu na průběh léčby hraje velkou roli, zda je pacient kuřák. Kouření je silným induktorem enzymatické aktivity *CYP1A2*, což vede k významně nižší

koncentraci Clozapinu v séru u kuřáků oproti nekuřákům. Koncentrace Clozapinu v séru byla u kuřáků 2,5krát nižší v porovnání s nekuřáky. Výsledky studie, kterou publikoval Jan van der Weide (2003), ukázaly, že koncentrace Clozapinu v séru se mezi pacienty s různými genotypy významně neliší, a proto genetický polymorfismus *CYP1A2* zřejmě nemá klinicky významný účinek pro léčbu Clozapinem, zatímco kouření je silně spojeno s výslednou koncentrací léčiva v séru (Van der Weide, 2003). Z tohoto důvodu by měla být dávka léčiva na základě kouření upravována. Pokud je pacient kuřák, je potřeba dávku zvýšit, avšak v případě, že v průběhu léčby kouření zanechá, dávka musí být opět snížena.

Podle studie, kterou publikovala Merja Viikki (2014), však polymorfismus v genu *CYP1A2* souvisí vedlejší účinky Clozapinu. Sledován byl konkrétně polymorfismus rs2470890 a variantní genotyp T/T. Z výsledků studie vyplývá, že pacienti s tímto polymorfismem mají výrazně vyšší frekvenci výskytu vedlejších účinků během léčby oproti pacientům s genotypem C/C (Wild type) (Viikki, 2014).

Nejčastěji užívaným antipsychotikem u sledované skupiny pacientů je Escitalopram. Toto antipsychotikum užívá celkem 32 pacientů z testované skupiny 47 pacientů. Escitalopram (S-CIT) je jaterním enzymem CYP1A2 metabolizován na S-desmethylcytopram (S-DCIT) a S-didesmethylcytopram (S-DDCIT). Ve studii zabývající se hladinami Escitalopramu a jeho metabolitů v séru sledovaných pacientů bylo vyšetřováno celkem 10 SNP včetně polymorfismu rs4646425. Výsledky této studie naznačují, že genetické polymorfismy v genu *CYP1A2*, mohou ovlivnit metabolismus Escitalopramu. Konkrétně SNP rs2069521, rs2069526, rs4646425 a rs4646427 jsou významně spojeny s vyššími metabolickými poměry S-DDCIT/S-DCIT v porovnání s wild type alelami. Tyto polymorfismy také souvisejí s častějším výskytem závažnějších vedlejších účinků jako je například suchost úst, nevolnost a zvracení. V této studii je dále zmiňováno, že genetické polymorfismy v genu *CYP1A2* sice ovlivňují metabolické poměry S-DDCIT/S-DCIT, avšak na účinnost léčiva vliv nemají (Kuo, 2013). Pokud bychom tedy vycházeli z této studie, lze říct, že částečný účinek antipsychotika Escitalopram u pacienta, u něhož by byl potvrzen polymorfismus rs4646425 C/T, nemusí s tímto konkrétním polymorfismem souviset. Částečná účinnost antipsychotik u pacientů, u nichž se polymorfismus rs4646425 nevyskytuje, může být způsobena mnoha různými faktory. Od přerušované léčby a vysazování léčiva pacientem bez vědomí ošetřujícího lékaře přes další negenetické faktory jako je již zmiňované kouření až po genetický vliv dalších

polymorfismů, které se mohou vyskytovat nejen v genu *CYP1A2*, ale i jiných genech kódujících enzymy, které se podílejí na metabolismu daného léčiva.

Dalším antipsychotikem sledovaným v souvislosti s genetickým polymorfismem rs4646425 je Paroxetin. Tento léčivý přípravek byl také užíván pacienty, kteří byli vyšetřováni pro výskyt tohoto polymorfismu v mé bakalářské práci, avšak u všech byl přítomen genotyp C/C (Wild type). Nicméně ve studii, která tyto a další polymorfismy sledovala u skupiny pacientů, jimž byla diagnostikována depresivní porucha, byl potvrzen jejich významný vliv při léčbě antipsychotikem Paroxetinem. Výsledkem zmiňované studie je zjištění, že polymorfismus rs4646425 je spojen s pomalejší odpovědí na léčbu Paroxetinem (Lin, 2010).

Závěrem lze říct, že ze 47 pacientů, kteří jsou léčeni s psychickým onemocněním, jich 28 (60 %) odpovídá na léčbu pouze částečně. 15 pacientů (32 %) se léčí s dobrým farmakoterapeutickým efektem. Podle aktuálních vědeckých studií jsou léčiva účinná pouze u 60 % pacientů (Bartošová, 2016). U léčby schizofrenie pouze u 5-10 % pacientů dochází k úplné reakci na léčbu a přibližně 30 % na léčbu neodpovídá vůbec (Lahti, 2009).

Polymorfismy v genu *CYP1A2* mají velký význam pro klinickou farmacii, avšak jsou za potřebí další výzkumy, jelikož některé studie přinášejí nejednoznačné závěry. Reakci konkrétního pacienta na podané léčivo podmiňuje velké množství genů a v každém tomto genu se může vyskytovat hned několik polymorfismů. Vzhledem k této skutečnosti je velmi obtížné určit reálný účinek jednoho polymorfismu a spojit ho s konkrétní reakcí pacienta na podané léčivo.

12 Závěr

V mé bakalářské práci jsem se nejprve zabývala teoretickou částí, kde jsem shrnula základní informace o dané problematice. Z důvodu souvislosti genu *CYP1A2* s metabolismem léčiv jsem v úvodu práce popsala benefity a limity farmakogenetiky a farmakogenomiky a následně jsem se zabývala cytochromovým systémem P450, který zahrnuje klíčové enzymy účinné v metabolismu cizorodých látek (xenobiotik), kam patří mimo jiné i léčiva. Pod cytochrom P450 spadá enzym CYP1A2, kódovaný stejnojmenným genem *CYP1A2*. Právě v tomto genu jsem v rámci praktické části vyšetřovala konkrétní polymorfismus rs4646425 u skupiny pacientů, kterým byla diagnostikována psychická onemocnění.

Polymorfismus byl detekován pomocí metody Real-time PCR po tom, co byla provedena izolace DNA z bukalního stěru nebo z periferní krve 47 pacientů a následně změřena její koncentrace. Genotyp C/T byl detekován pouze v jednom případě a jeho procentuální zastoupení ve sledované skupině bylo tedy 2,2 %, což odpovídá výskytu tohoto polymorfismu v evropské populaci. Možný vliv tohoto polymorfismu na léčbu pacienta jsem podrobněji rozebrala v diskuzi. Díky praktické části bakalářské práce jsem si osvojila základní molekulárně-genetické metody včetně následného hodnocení výsledků.

13 Bibliografie

AHMADIAN, A., GHARIZADEH, B., GUSTAFSSON, A. C., STERKY, F., NYRÉN, P., UHLÉN, M., LUNDEBERG, J., 2000. Single-Nucleotide Polymorphism Analysis by Pyrosequencing. *Analytical Biochemistry* [online]. 280(1), 103-110 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.1006/abio.2000.4493. ISSN 00032697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269700944932>

BAGEMAN, E., INGVAR, C., ROSE C., JERNSTROM, H., 2008. *Coffee Consumption and CYP1A2*1F Genotype Modify Age at Breast Cancer Diagnosis and Estrogen Receptor Status* [online]. 17(4), 895-901 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-07-0555. ISSN 1055-9965. Dostupné z: <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-07-0555>

BARTOŠOVÁ, O., SLANAŘ, O., NETÍKOVÁ, I., 2016. Farmakogenetika v práci klinického farmakologa a farmaceuta. *Praktické lékařství* [online]. 12(3), 3 [cit. 2020-04-23]. ISSN 1803-5329. Dostupné z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2016/03/05.pdf>

BUTLER, J.M., 2005. *Forensic DNA Typing, Biology, Technology and Genetics of STR Markers*. Elsevier Academic Press.

CEDERBAUM, A.I., 2015. Molecular mechanisms of the microsomal mixed function oxidases and biological and pathological implications. *Redox Biology* [online]. 4, 60-73 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1016/j.redox.2014.11.008. ISSN 22132317. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213231714001207>

CORNELIS, M.C, 2004. Genetic polymorphism of CYP1A2 increases the risk of myocardial infarction. *Journal of Medical Genetics* [online]. 41(10), 758-762 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1136/jmg.2004.022012. ISSN 1468-6244. Dostupné z: <http://jmg.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jmg.2004.022012>

CORNELIS, M., EL-SOHEMY, A., KABAGAMBE, E., CAMPOS, H., 2006. Coffee, CYP1A2 Genotype, and Risk of Myocardial Infarction. *JAMA* [online]. 295(10) [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1001/jama.295.10.1135. ISSN 0098-7484. Dostupné z: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.295.10.1135>

CYP1A2 gene. *GeneCards* [online]. [cit. 2020-05-29]. Dostupné z: <https://genecards.weizmann.ac.il/v3/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP1A2>

ŘURICOVÁ, J., GRUNDMANN, M., 2011. Význam genetického polymorfizmu enzymov cytochrómu P450 – časť I. Enzymový systém cytochrómu P450 a cytochróm P450 1A2. *Česká a Slovenská farmacie* [online]. 2011(3), 110-115 [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-slovenska-farmacie/2011-3-1/vyznam-genetickeho-polymorfizmu-enzymov-cytochromu-p450-cast-i-enzymovy-system-cytochromu-p450-a-cytochrom-p450-1a2-35779>

ERLICH, H.A., 1989. Polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Immunology* [online]. 9(6), 437-447 [cit. 2020-05-17]. DOI: 10.1007/BF00918012. ISSN 0271-9142. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00918012>

Flockhart Table TM [online], 2016. [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://drug-interactions.medicine.iu.edu/MainTable.aspx>

GENG, T., ZHANG, X., WANG, L., WANG, H., SHI, X., KANG, L., HOU, P., JIN, T., 2015. Genetic polymorphism analysis of the drug-metabolizing enzyme CYP1A2 in a Uyghur Chinese population: a pilot study. *Xenobiotica* [online]. 46(6), 542-547 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.3109/00498254.2015.1089367. ISSN 0049-8254. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/00498254.2015.1089367>

GIACOMINI, K., BRETT, C., ALTMAN, R., et al., 2007. *The Pharmacogenetics Research Network: From SNP Discovery to Clinical Drug Response* [online]. 81(3), 328-345 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.1038/sj.clpt.6100087. ISSN 0009-9236. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1038/sj.clpt.6100087>

GONZALEZ, F.J., 2005. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* [online]. 569(1-2), 101-110 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2004.04.021. ISSN 00275107. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510704003756>

GUNES, A., DAHL, M.L., 2008. Variation in CYP1A2 activity and its clinical implications: influence of environmental factors and genetic polymorphisms. *Pharmacogenomics* [online]. 9(5), 625-637 [cit. 2020-04-23]. DOI:

10.2217/14622416.9.5.625. ISSN 1462-2416. Dostupné z:
<https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/14622416.9.5.625>

HOLGATE, S.T., 2004. Pharmacogenetics: the new science of personalizing treatment. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* [online]. 4(1), 2 [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: https://journals.lww.com/co-allergy/Citation/2004/02000/Pharmacogenetics__the_new_science_of_personalizing.8.aspx

HOLOPAINEN, R., HONKANEN, J., JENSEN, B.B., ARIEL, E., TAPIOVAARA, H., 2011. Quantitation of ranaviruses in cell culture and tissue samples. *Journal of Virological Methods* [online]. 171(1), 225-233 [cit. 2020-05-17]. DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.11.004. ISSN 01660934. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093410004027>

HU, B., SUN, CH., XU, S., ZHOU, W., 2011. Synthesis of Metallo-Deuteroporphyrin Derivatives and the Study of Their Biomimetic Catalytic Properties. *On Biomimetics* [online]. InTech [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.5772/19279. ISBN 978-953-307-271-5. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/on-biomimetics/synthesis-of-metallo-deuteroporphyrin-derivatives-and-the-study-of-their-biomimetic-catalytic-proper>

CHARRON, C., NOVOTNY, J., JEFFERY, E., KRAMER, M., ROSS S., SEIFRIED, H., 2020. Consumption of baby kale increased cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) activity and influenced bilirubin metabolism in a randomized clinical trial. *Journal of Functional Foods* [online]. 64 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1016/j.jff.2019.103624. ISSN 17564646. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464619305481>

ISMAIL, S., ESSAWI, M., 2012. Genetic polymorphism studies in humans. *Middle East Journal of Medical Genetics* [online]. 1(2), 57-63 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1097/01.MXE.0000415225.85003.47. ISSN 2090-8571.

JUŘICA, J., HOSÁK, L., 2011. Současnost a perspektivy farmakogenetiky v léčbě psychóz. *Česká a Slovenská psychiatrie* [online]. 107(2), 86-93 [cit. 2020-04-23]. ISSN 1212-0383. Dostupné z: <http://www.cspsychiatr.cz/detail.php?stat=702>

KNEJZLÍK, Z., KÁŠ, J., RUML, T., 2000. Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chemické listy*. 913-916.

KOČÁREK, E., 2007. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. ISBN 978-80-7013450-4.

KUCIEL, J., URBAN, T., 2016. *Principy genetiky*. Brno: Mendelova univerzita v Brně. ISBN 978-80-7509-385-1.

KUO, H.W., LIU, S., TSOU, H.H., et al., 2013. CYP1A2 genetic polymorphisms are associated with early antidepressant escitalopram metabolism and adverse reactions. *Pharmacogenomics* [online]. 14(10), 1191-1201 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.2217/pgs.13.105. ISSN 1462-2416. Dostupné z: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/pgs.13.105>

LAHTI, A., WEILER, M., HOLCOMB, H., TAMMINGA, C., CROPSEY, K., 2009. Modulation of Limbic Circuitry Predicts Treatment Response to Antipsychotic Medication: A Functional Imaging Study in Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* [online]. 34(13), 2675-2690 [cit. 2020-05-13]. DOI: 10.1038/npp.2009.94. ISSN 0893-133X. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/npp200994>

LIN, K.M., TSOU, H.H., TSAI, I.J., et al., 2010. CYP1A2 genetic polymorphisms are associated with treatment response to the antidepressant paroxetine. *Pharmacogenomics* [online]. 11(11), 1535-1543 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.2217/pgs.10.128. ISSN 1462-2416. Dostupné z: <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/pgs.10.128>

MACKAY, I.M., 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* [online]. 30(6), 1292-1305 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1093/nar/30.6.1292. ISSN 13624962. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/30.6.1292>

MANIKANDAN, P., NAGINI, S., 2018. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Current Drug Targets* [online]. 19(1) [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.2174/1389450118666170125144557. ISSN 13894501. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/149505/article>

MCCARTHY, J., HILFIKER, R., 2000. The use of single-nucleotide polymorphism maps in pharmacogenomics. *Nature Biotechnology* [online]. 18(5), 505-508 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1038/75360. ISSN 1087-0156. Dostupné z: http://www.nature.com/articles/nbt0500_505

NELSON, D.R., 2009. The Cytochrome P450 Homepage. *Human Genomics* [online]. 4(1) [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1186/1479-7364-4-1-59. ISSN 1479-7364. Dostupné z: <https://humgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-7364-4-1-59>

OU-YANG, D.S, HUANG, S.L., WANG, W., XIE, H.G., XU, Z.H., SHU, Y., ZHOU, H.H., 2000. Phenotypic polymorphism and gender-related differences of CYP1A2 activity in a Chinese population. *British Journal of Clinical Pharmacology* [online]. 49(2), 145-151 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.1046/j.1365-2125.2000.00128.x. ISSN 03065251. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2125.2000.00128.x>

PCR Cycling Parameters. *Thermo Fisher* [online]. [cit. 2020-05-17]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations.html>

PETERSEN, M., HALLING, J., DAMKIER, P., NIELSEN, F., GRANDJEAN, P., WEIHE, P., BRØSEN, K., 2006. Caffeine N3-demethylation (CYP1A2) in a population with an increased exposure to polychlorinated biphenyls. *European Journal of Clinical Pharmacology* [online]. 62(12), 1041-1048 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1007/s00228-006-0205-0. ISSN 0031-6970. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00228-006-0205-0>

PHAN, V., MOORE, M., MCLACHLAN, A., PIQUETTE-MILLER, M., XU, H., CLARKE, S., 2009. *Ethnic differences in drug metabolism and toxicity from chemotherapy* [online]. 5(3), 243-257 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1517/17425250902800153. ISSN 1742-5255. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425250902800153>

PharmVar. 2007. [online]. [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: <https://www.pharmvar.org/gene/CYP1A2>

POPAT, R., VAN DEN EEDEN, S., TANNER, C., et al., 2011. Coffee, ADORA2A, and CYP1A2: the caffeine connection in Parkinson's disease. *European Journal of Neurology* [online]. 18(5), 756-765 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1111/j.1468-1331.2011.03353.x. ISSN 13515101. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-1331.2011.03353.x>

QPCR services. *Genechron* [online]. Roma [cit. 2020-05-17]. Dostupné z: <http://www.genechron.com/en/services/translational-and-clinical-services/qpcr-services>

RASMUSSEN, B., BRIX, T., KYVIK, K., BROSEN, K., 2002.

200208000-00008. ISSN 0960314X. Dostupné z: <http://journals.lww.com/00008571-200208000-00008>

Real-time PCR: Principles and Applications [online], 2019. [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: <https://microbeonline.com/real-time-pcr-principles-and-applications/>

RYCHLIK, W., SPENCER, W.J., RHOADS, R.E., 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research* [online]. 18(21), 6409-6412 [cit. 2020-05-17]. DOI: 10.1093/nar/18.21.6409. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/18.21.6409>

SACHSE, CH., BHAMBRA, U., SMITH, G., et al., 2003. Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. *British Journal of Clinical Pharmacology* [online]. 55(1), 68-76 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1046/j.1365-2125.2003.01733.x. ISSN 03065251. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2125.2003.01733.x>

SCOTT, S.A., 2011. Personalizing medicine with clinical pharmacogenetics. *Genetics in Medicine* [online]. 13(12), 987-995 [cit. 2020-04-26]. DOI: 10.1097/GIM.0b013e318238b38c. ISSN 1098-3600.

SHAO, W., HE, J., 2015. CYP1A2 rs2069514 polymorphism and lung cancer susceptibility: a meta-analysis. *Annals Of Translational Medicine* [online]. 3(7) [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: <http://atm.amegroups.com/article/view/6334/7107>

SKÁLOVÁ, L., 2017. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Druhé, upravené a rozšířené vydání. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-3733-4.

SLANAŘ, O., 2012. Farmakogenomika - současnost, budoucnost, perspektiva. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2012, 5.

SNUSTAD, P., SIMMONS, M., 2017. *Genetika*. 2. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-8613-5.

SPEAR, B., HEATH-CHIOZZI, M., HUFF, J., 2001. Clinical application of pharmacogenetics. *Trends in Molecular Medicine* [online]. 7(5), 201-204 [cit. 2020-05-

15]. DOI: 10.1016/S1471-4914(01)01986-4. ISSN 14714914. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491401019864>

STANLEY, L.A., 2017. Drug Metabolism. *Pharmacognosy* [online]. Elsevier, 527-545 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1016/B978-0-12-802104-0.00027-5. ISBN 9780128021040. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128021040000275>

STIBOROVÁ, M., HUDEČEK, J., HODEK, P., FREI, E., 1999. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické listy*. 1999(93), 229-237.

STRACHAN, T., READ, A., 2011. *Human molecular genetics*. 4. New York. ISBN 978-0815341499.

SUN, W.X, CHEN, Y.H., LIU, Z.Z., et al., 2015. Association between the CYP1A2 polymorphisms and risk of cancer: a meta-analysis. *Molecular Genetics and Genomics* [online]. 290(2), 709-725 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1007/s00438-014-0956-8. ISSN 1617-4615. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00438-014-0956-8>

THORN, C., AKLILLU, E., KLEIN, T., ALTMAN, R., 2012. PharmGKB summary. *Pharmacogenetics and Genomics* [online]. 22(1), 73-77 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1097/FPC.0b013e32834c6efd. ISSN 1744-6872. Dostupné z: <http://journals.lww.com/01213011-201201000-00009>

TIAN, Z., LI, Y.L., ZHAO, L., ZHANG, CH.L., 2013. Role of CYP1A2*1F polymorphism in cancer risk: Evidence from a meta-analysis of 46 case-control studies. *Gene* [online]. 524(2), 168-174 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1016/j.gene.2013.04.038. ISSN 03781119. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111913005052>

VAN DER WEIDE, J., STEIJNS, L., VAN WEELDEN, M., 2003. The effect of smoking and cytochrome P450 CYP1A2 genetic polymorphism on clozapine clearance and dose requirement. *Pharmacogenetics* [online]. 13(3), 169-172 [cit. 2020-05-12]. DOI: 10.1097/00008571-200303000-00006. ISSN 0960-314X. Dostupné z: <http://journals.lww.com/00008571-200303000-00006>

VARELA, M., AMOS, W., 2010. Heterogeneous distribution of SNPs in the human genome: Microsatellites as predictors of nucleotide diversity and divergence. *Genomics* [online]. 95(3), 151-159 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1016/j.ygeno.2009.12.003. ISSN 08887543. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0888754309002699>

VIIKKI, M., KAMPMAN, O., SEPPÄLÄ, N., MONONEN, N., LEHTIMÄKI, T., LEINONEN, E., 2014. CYP1A2 polymorphism -1545C>T (rs2470890) is associated with increased side effects to clozapine. *BMC Psychiatry* [online]. 14(1) [cit. 2020-05-12]. DOI: 10.1186/1471-244X-14-50. ISSN 1471-244X. Dostupné z: <http://bmcp psychiatry.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-244X-14-50>

What's in Your Genes: Newly approved genetic testing for disease risks, 2017. *SITN Harvard University* [online]. [cit. 2020-05-19]. Dostupné z: <http://sitn.hms.harvard.edu/flash/2017/whats-genes-newly-approved-genetic-testing-disease-risks/>

WOLF, C.R., SMITH, G., SMITH, R.L., 2000. Science, medicine, and the future: Pharmacogenetics. *BMJ* [online]. 320(7240), 987-990 [cit. 2020-05-18]. DOI: 10.1136/bmj.320.7240.987. ISSN 09598138. Dostupné z: <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.320.7240.987>

ZANGER, U., SCHWAB, M., 2013. *Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation* [online]. 138(1), 103-141 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2012.12.007. ISSN 01637258. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725813000065>

ZHOU, S.F., WANG, B., YANG, L.P., LIU, J.P., 2009. Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2. *Drug Metabolism Reviews* [online]. 42(2), 268-354 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.3109/03602530903286476. ISSN 0360-2532. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03602530903286476>

14 Seznam použitých zkratk

16 α -OHE1 - 16 α -hydroxyestron

2-OHE1 – 2-hydroxyestron

CYP – cytochrom P450

DNA – kyselina deoxyribonukleová

dNTP – deoxynukleotidové trifosfáty

dsDNA – dvouvláknová DNA

EDTA – kyselina etylendiaminotetraoctová

EM – rychlý metabolizátor

IM – intermediární metabolizátor

PAH – polycyklické aromatické uhlovodíky

PCR – polymerázová řetězová reakce

PM – pomalý metabolizátor

RNA – ribonukleová kyselina

S-CIT – escitalopram

S-DCIT – S-demetylcyporam

S-DDCIT – S-didesmetylcyporam

SNP – jednonukleotidový polymorfismus

ssDNA – jednovláknová DNA

UM – ultrarychlý metabolizátor