



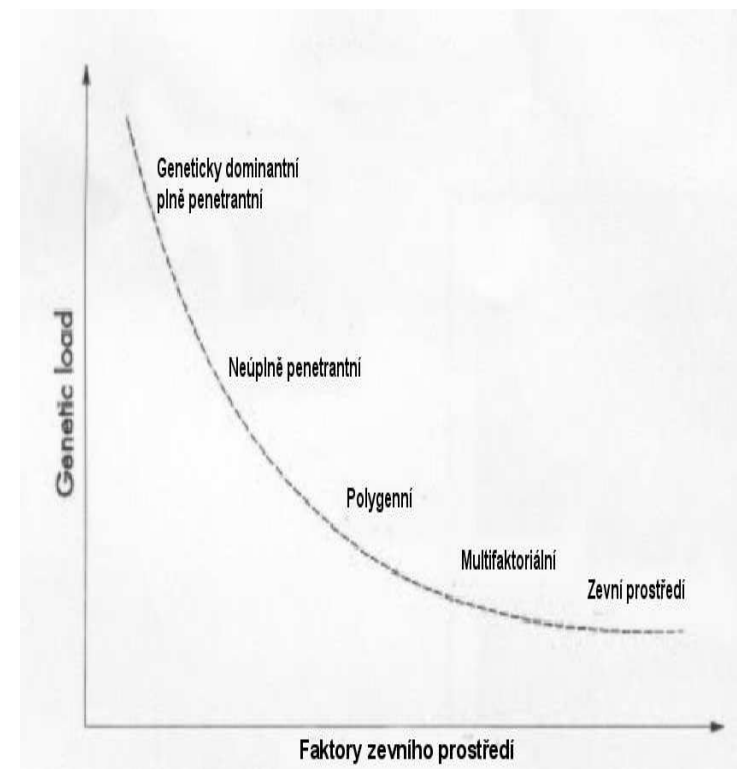
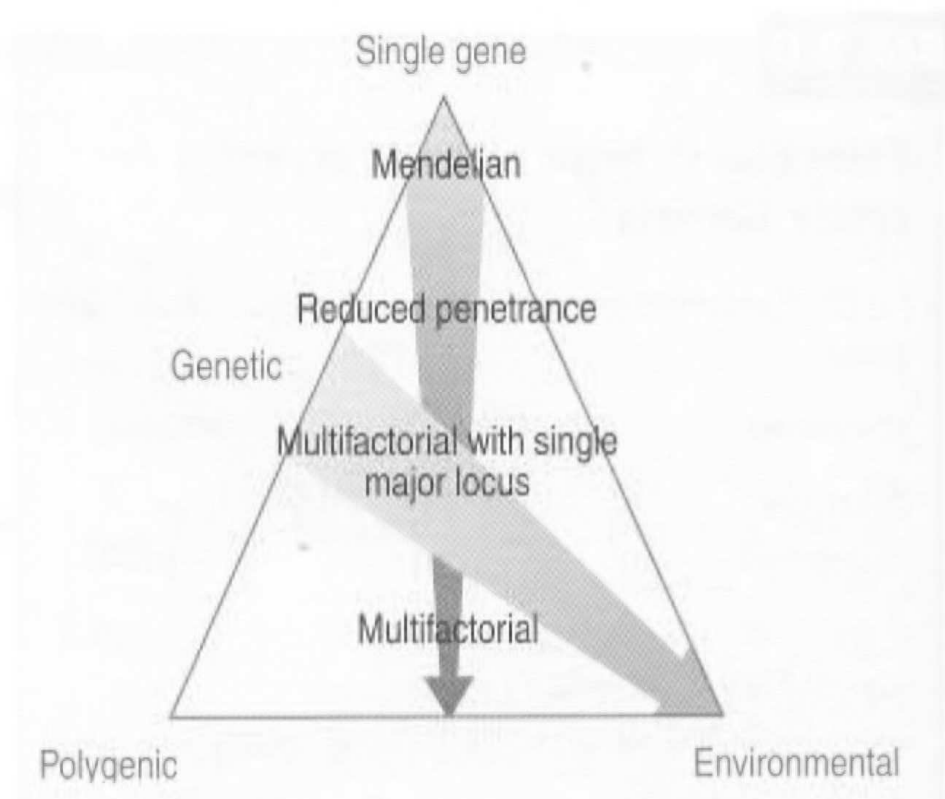
KOMPLEXNÍ CHOROBY



Doc. MUDr. Lydie Izakovičová Hollá, Ph.D

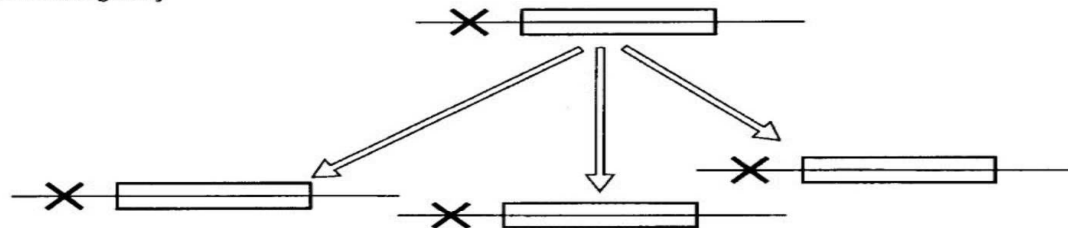
Ústav patologické fyziologie LF MU Brno

Spektrum lidských chorob

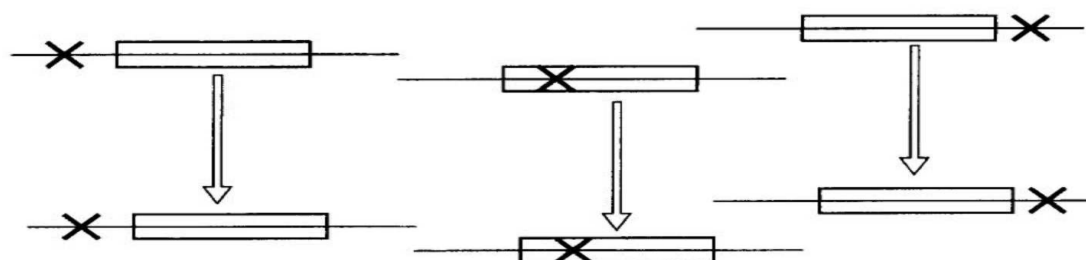


Alelická architektura komplexních nemocí

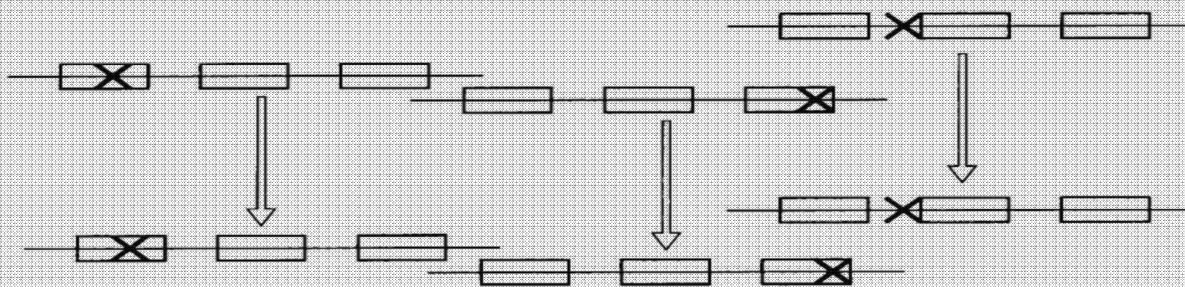
(a) Model 1: allelic homogeneity



(b) Model 2: allelic heterogeneity



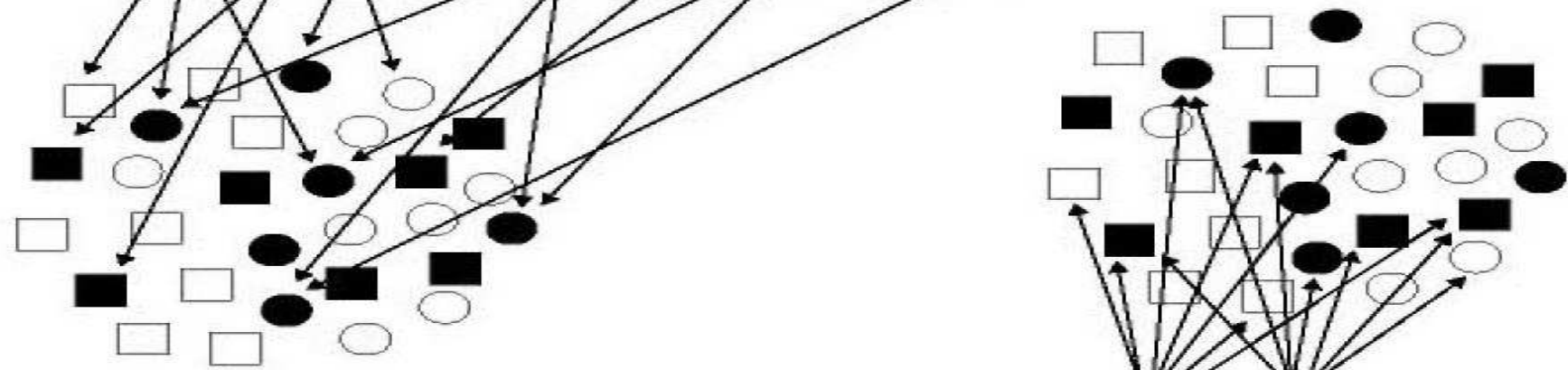
(c) Model 3: multiple mutations in multiple genes



(a) **Multilocus/multiallele hypothesis**

Genes A B C D E F G H I J K L...

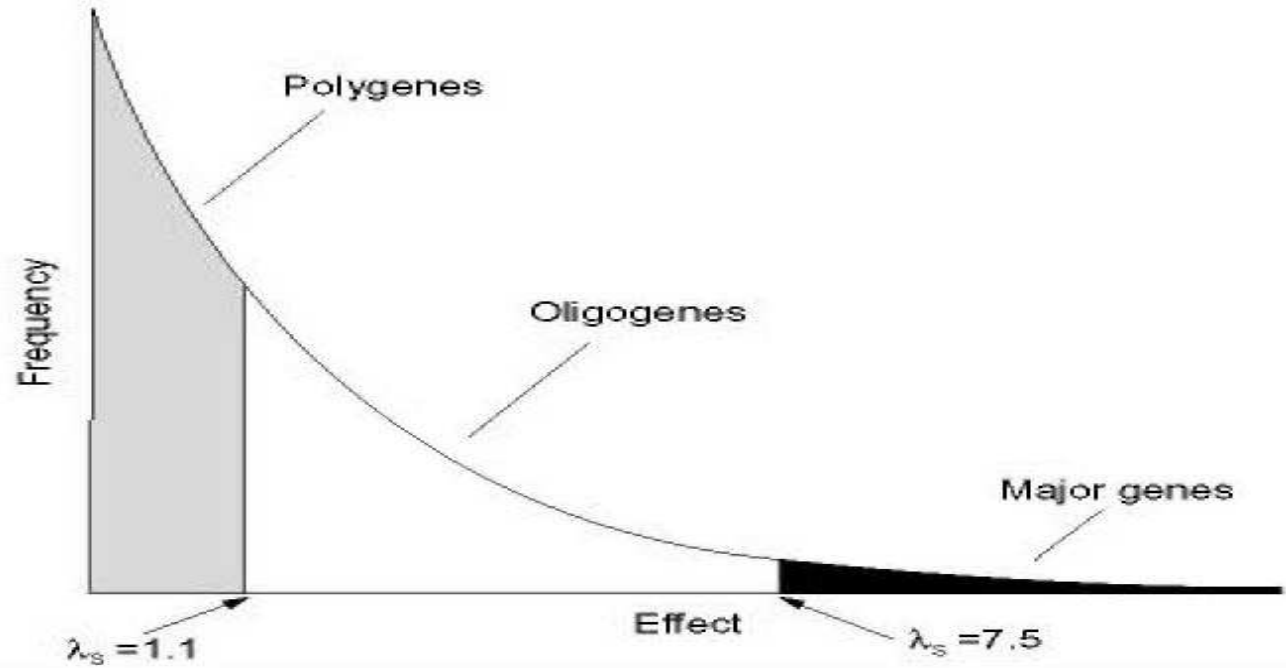
Alleles



Alleles
Genes A B C D...

Common disease/common variant hypothesis

(b)





Komplexní nemoci (znaky)

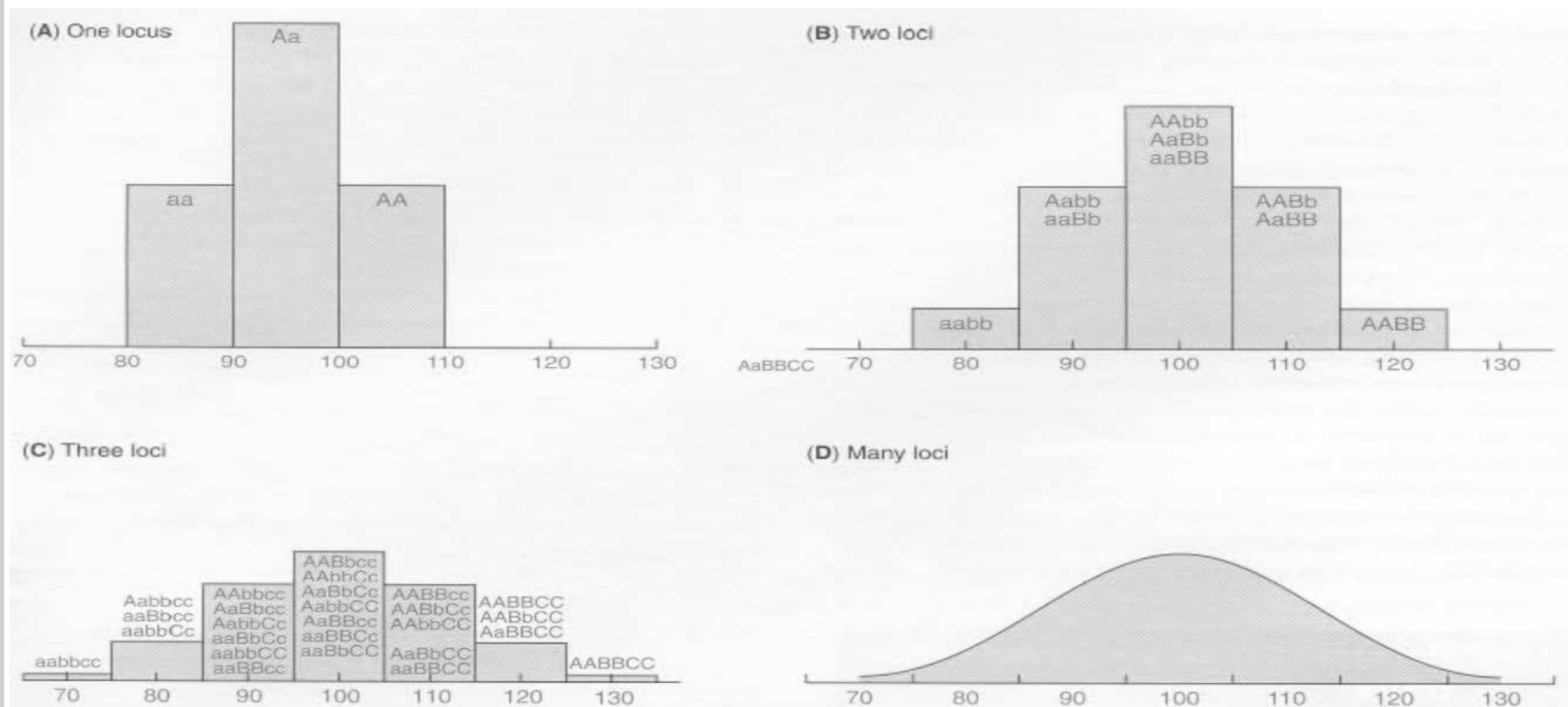
- Stojí na vrcholu pomyslné pyramidy složitosti celé genetiky
- Genotypovou složkou komplexních chorob není striktní determinismus, nýbrž predispozice k fenotypové manifestaci nemoci
- Řada interakcí : genotyp – genotyp
genotyp – prostředí
- Epidemiologickou charakteristikou komplexních chorob



je statistická kumulace v rodinách, tj. statisticky významně zvýšená frekvence onemocnění u pokrevních příbuzných daného postiženého jedince bez jasného mendelistického způsobu přenosu

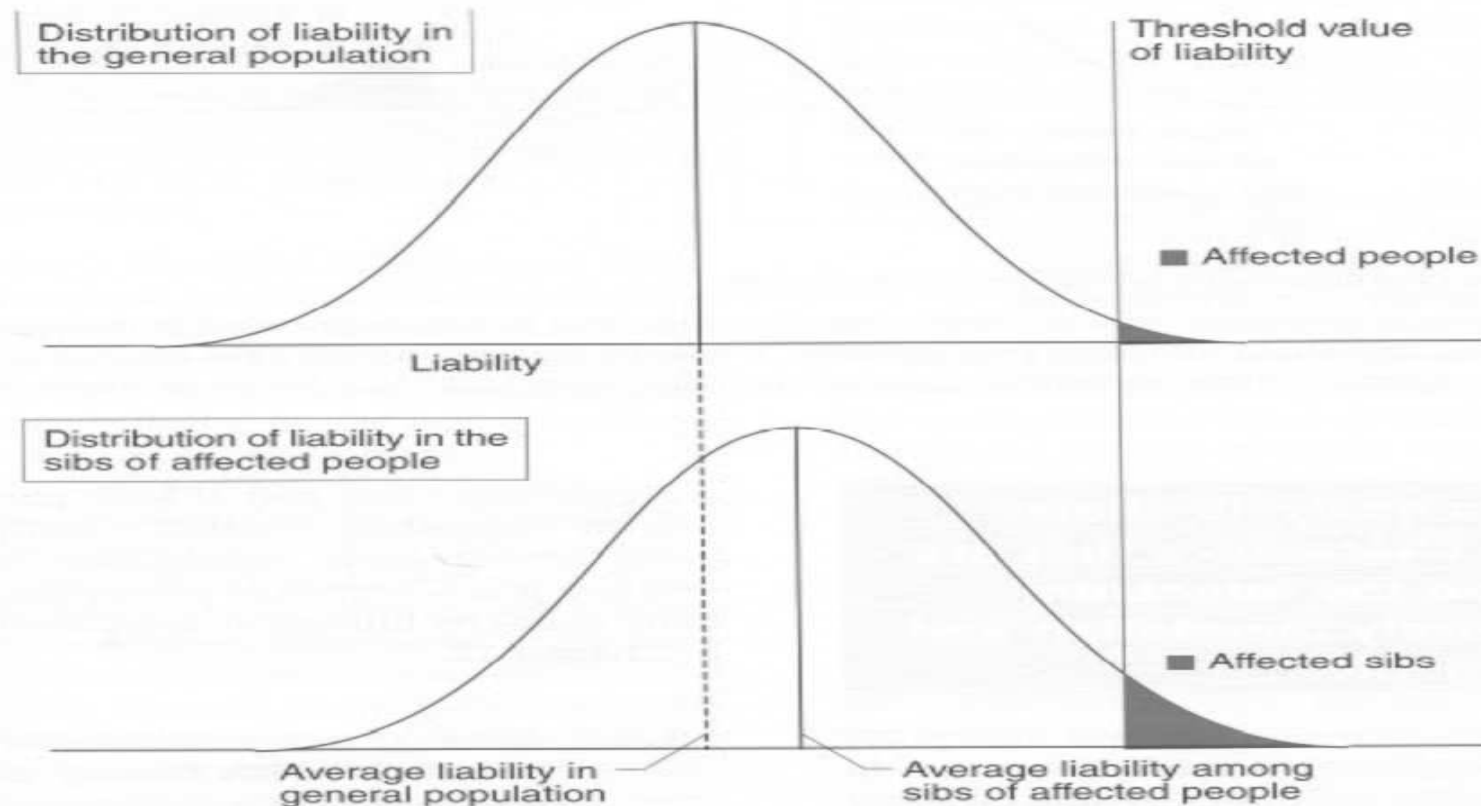
Polygenní model

- Základy genetiky komplexních stavů položil v r. 1918 R.A. Fisher



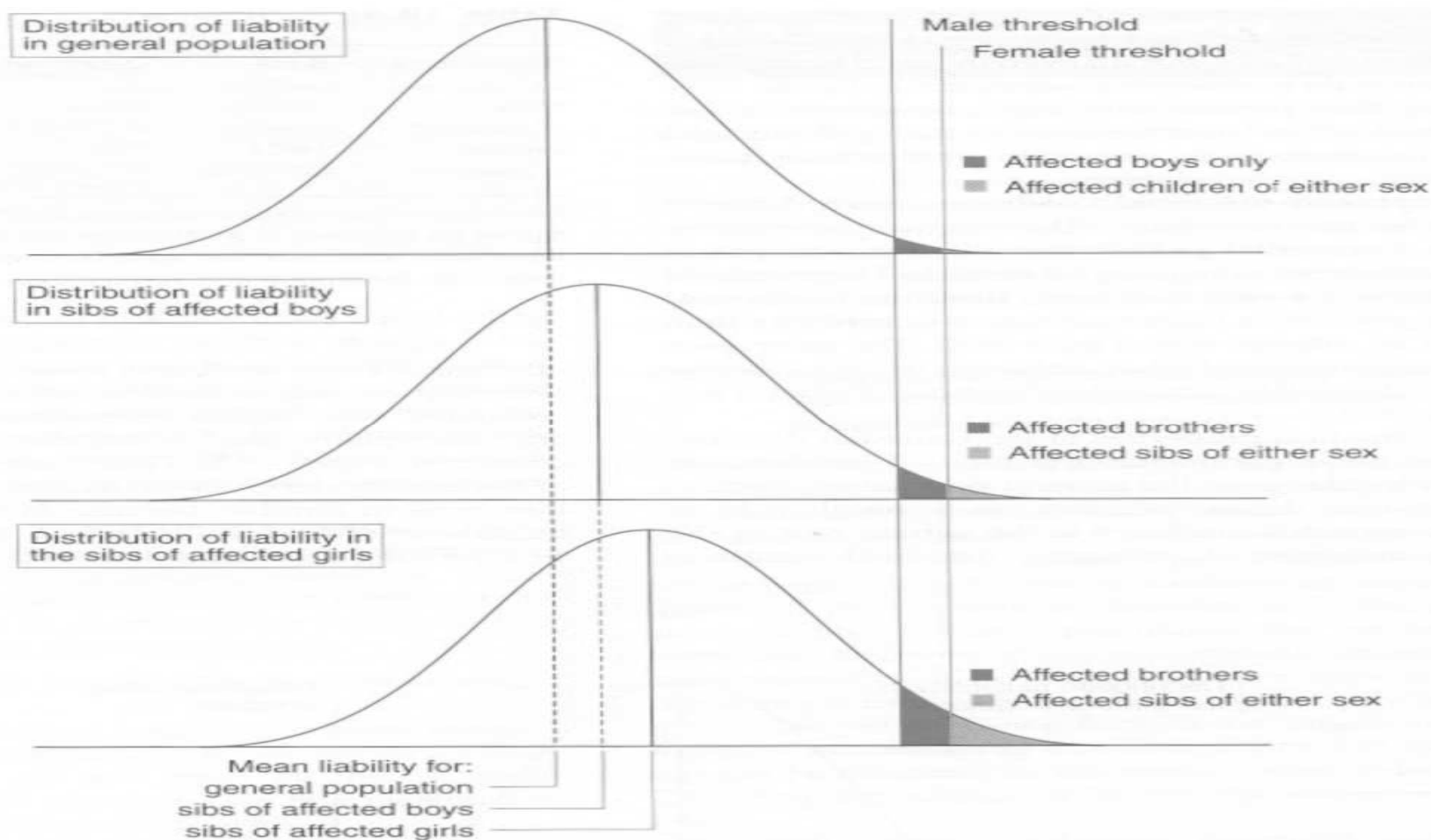
Prahový model

- V polovině 60. let přišel s tzv. prahovým modelem D.S. Falconer





Prahový model s pohlavně rozdílným prahem





Dnešní model

- se od těch klasických v několika ohledech dost zásadně liší
- Je jasné, že genotypová složka komplexních znaků není tak rozsáhlá, jak se předpokládalo (nezahrnuje stovky, max. desítky genů)
- Genotypová složka není homogenní ve smyslu rozsahu účinku jednotlivých genů (zahrnuje geny jak relativně velkého, tak i malého a středního účinku)
- Vzájemný vztah jednotlivých predisponujících genů není v žádném případě uniformně aditivní



vyjádřeno multiplikativním modelem

⇒ souhrnný účinek predisponujících genů je roven součinu jejich dílčích účinků (interekční efekty)



Podklady pro hledání genetické determinace:

- **Zvýšená incidence u dvojčat : MZ > DZ**
- **Zvýšený výskyt v rodinách**
- **Dědičnost intermediárních fenotypů:**



Heritabilita (h^2)

- Je definována jako relativní podíl variability podmíněné geneticky na celkové variabilitě znaku

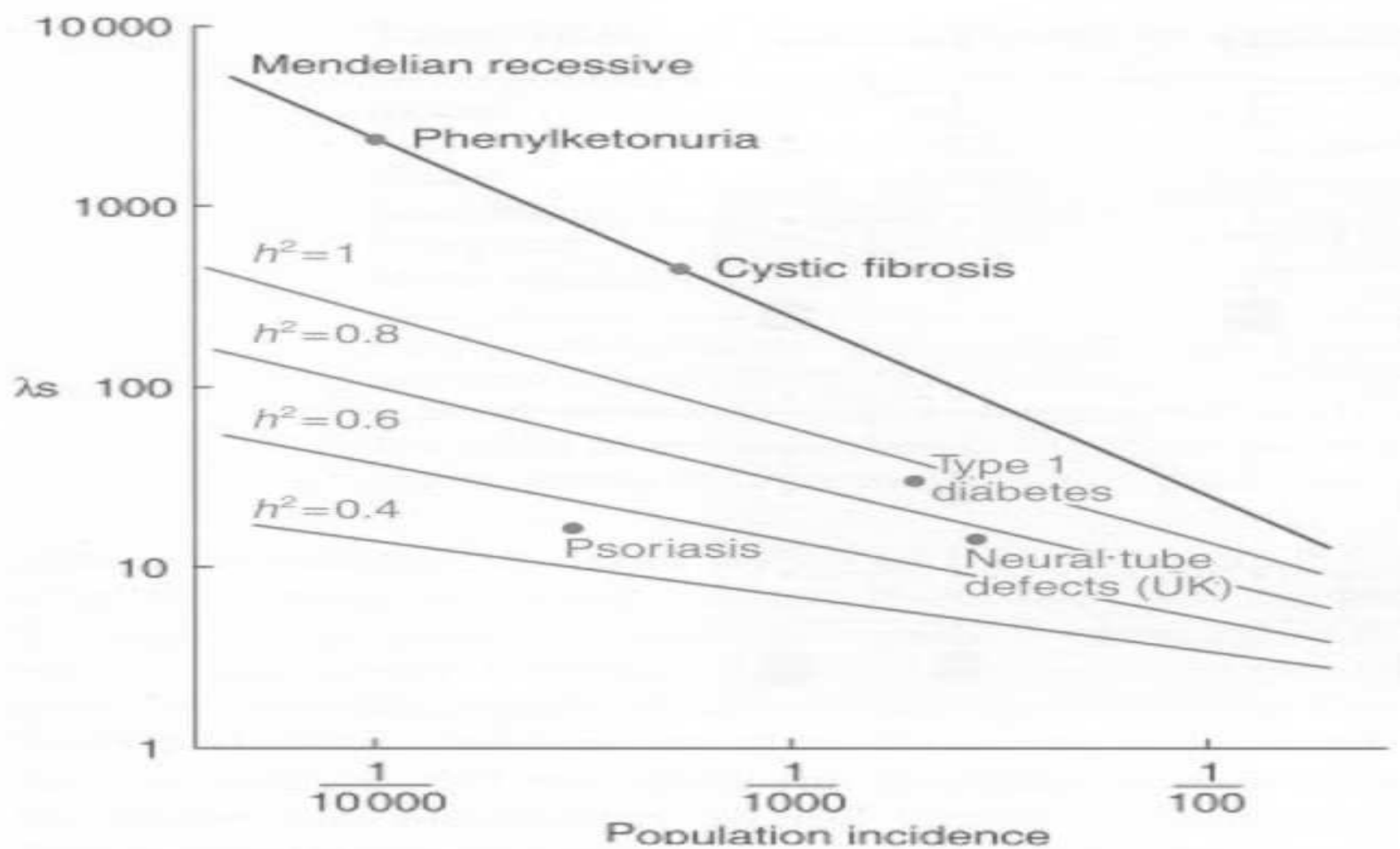
$$h^2 = V_G/V_P$$

[Variabilita fenotypu (V_P) = genetická variabilita (V_G) + variabilita zevních faktorů (V_E)]

čím je vyšší a blíží se jedné, tím vyšší je obecný příspěvek genetické složky ve fenotypu

Nejjednodušší způsob odhadu dědivosti (heritability) znaku je
⇒ dvojnásobek rozdílu korelačního koeficientu MZ a DZ dvojčat

Vztah mezi incidencí v populaci a incidencí u příbuzných postižených osob





Zvýšená incidence u dvojčat

- Základním přístupem je tradičně stanovení stupně fenotypové shody u MZ a DZ dvojčat → minimalizace relat. vlivů zevního prostředí



čím vyšší je fenotypová shoda MZ oproti DZ dvojčatům, tím vyšší je relativní genetický příspěvek studovaného komplexního znaku

- Např. u DM 1. typu – fenotyp. shoda MZ 23-36% x DZ 5%
u DM 2. typu – MZ 20-90% x DZ 9%
u astmatu – MZ 12,7-89% x DZ 6,5-33%
- Výhody: umožňují abstrahovat od variability prostředí



Genetická analýza komplexních chorob

- Důležité je definovat studovaný fenotyp

Komplexní choroby (astma, cukrovka)



konglomerát fenotypů nižších úrovní

⇒ Intermediární fenotypy – např. hladiny IgE, bronchiální hyperreaktivita u astmatu

Vágní stanovení fenotypu → komplikace při porovnávání různých nezávislých studií



Genetická analýza komplexních nemocí

- má vždy statistický charakter

⇒ zdědění jednotlivé patologické alely není ani nezbytné, ani dostatečné pro manifestaci komplexního fenotypu

Fenotyp

=

Zevní faktory

+

Genet. faktory

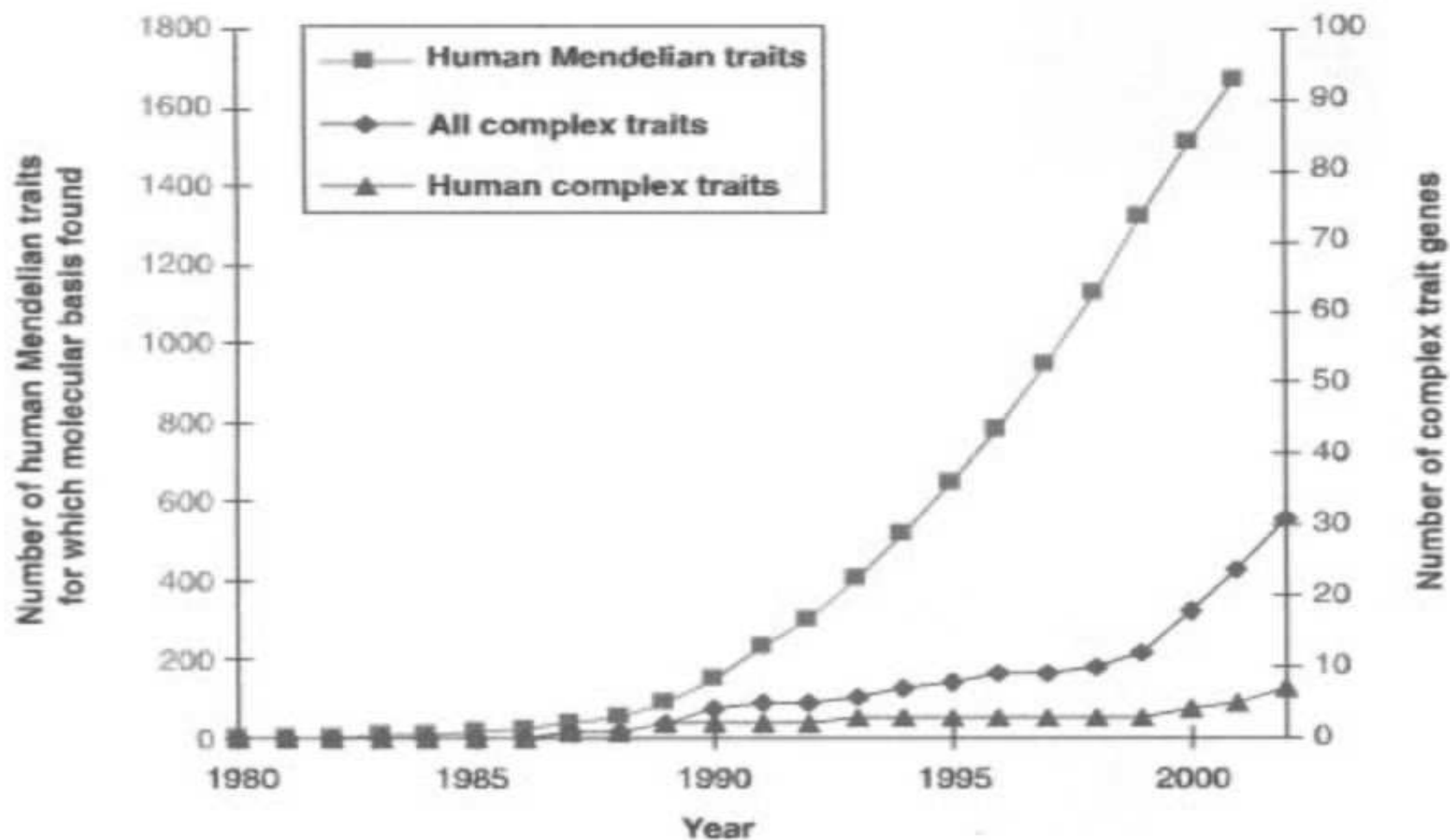
+

Geny + zevní faktory

- Dosud se nepodařilo charakterizovat žádnou komplexní polygenní chorobu ve formě úplného souboru „patologických“ alel a jejich interakcí (navzájem a se zevními faktory)



Hledání genů Mendelistických a komplexních chorob



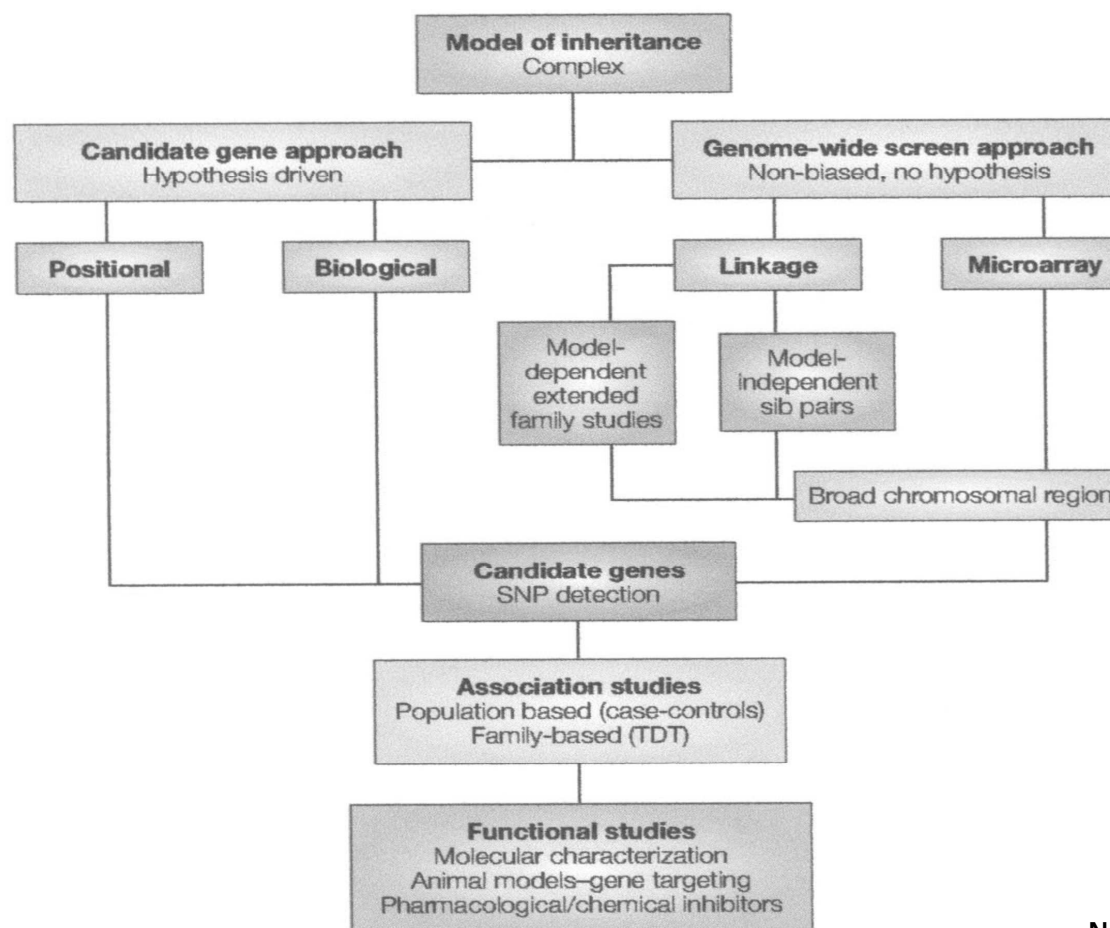


Molekulární základ komplexních nemocí u člověka

Trait	Gene	Molecular basis	Formal complementation?
		<i>Human</i>	
Type 1 diabetes	HLA-DQB	Aspartic acid at position 57 is protective	No
Type 1 diabetes	HLA-DQA	Multiple amino acid substitutions	No
Type 2 diabetes	CAPN10	Intronic haplotype	No
Crohn's disease	CARD15*	Multiple amino acid substitutions, single nucleotide insertion at nucleotide position 3020 causing frameshift and protein truncation	No
Alzheimer's disease	ApoE	Arginine substituted for cysteine at position 112	No
Asthma	ADAM33	Coding and noncoding haplotype pairs	No
Angiotensin I-converting enzyme levels	ACE	Multiple intragenic SNPs	No



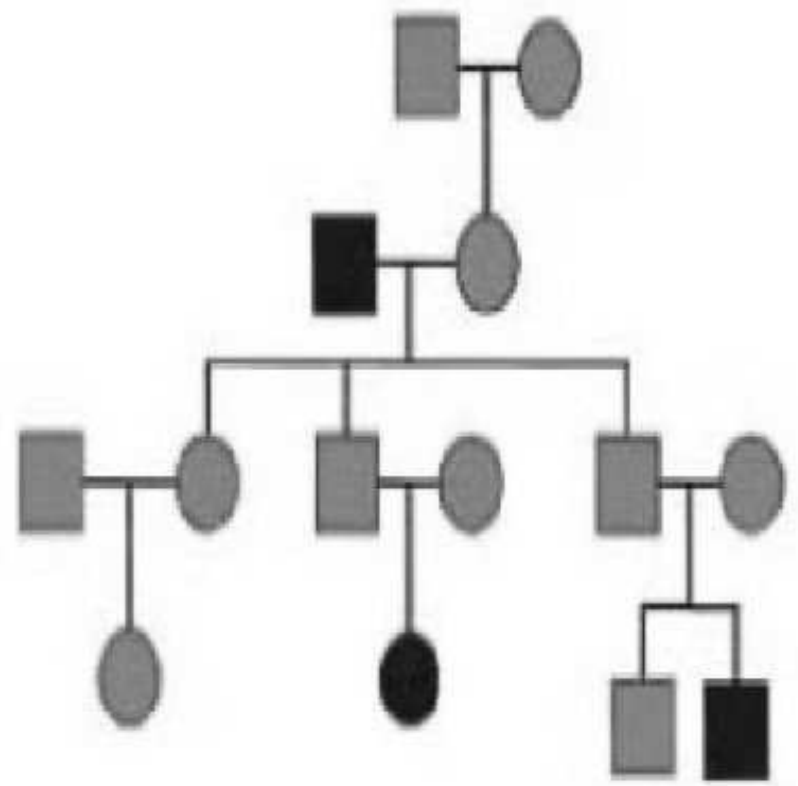
Metodologie genetického mapování komplexních znaků (nemocí)



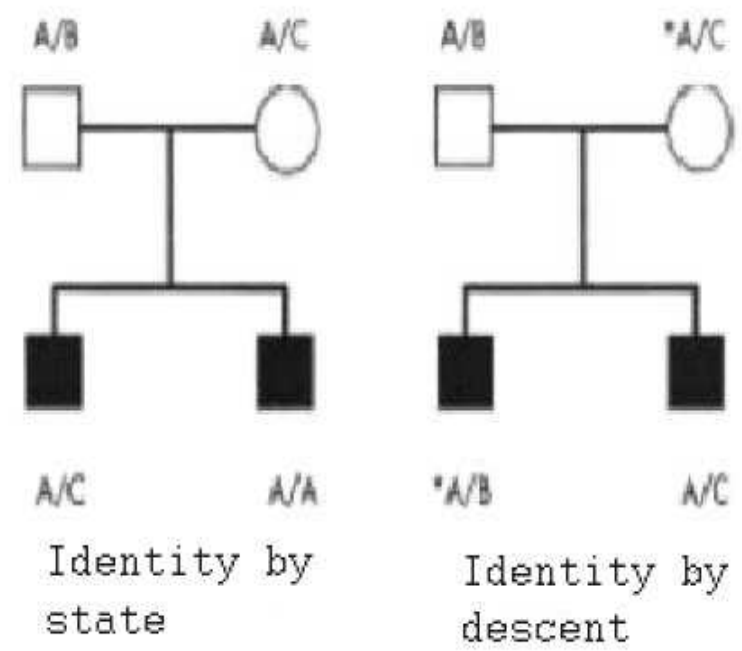
Vazebné studie (linkage studies)

parametrické neparametrické

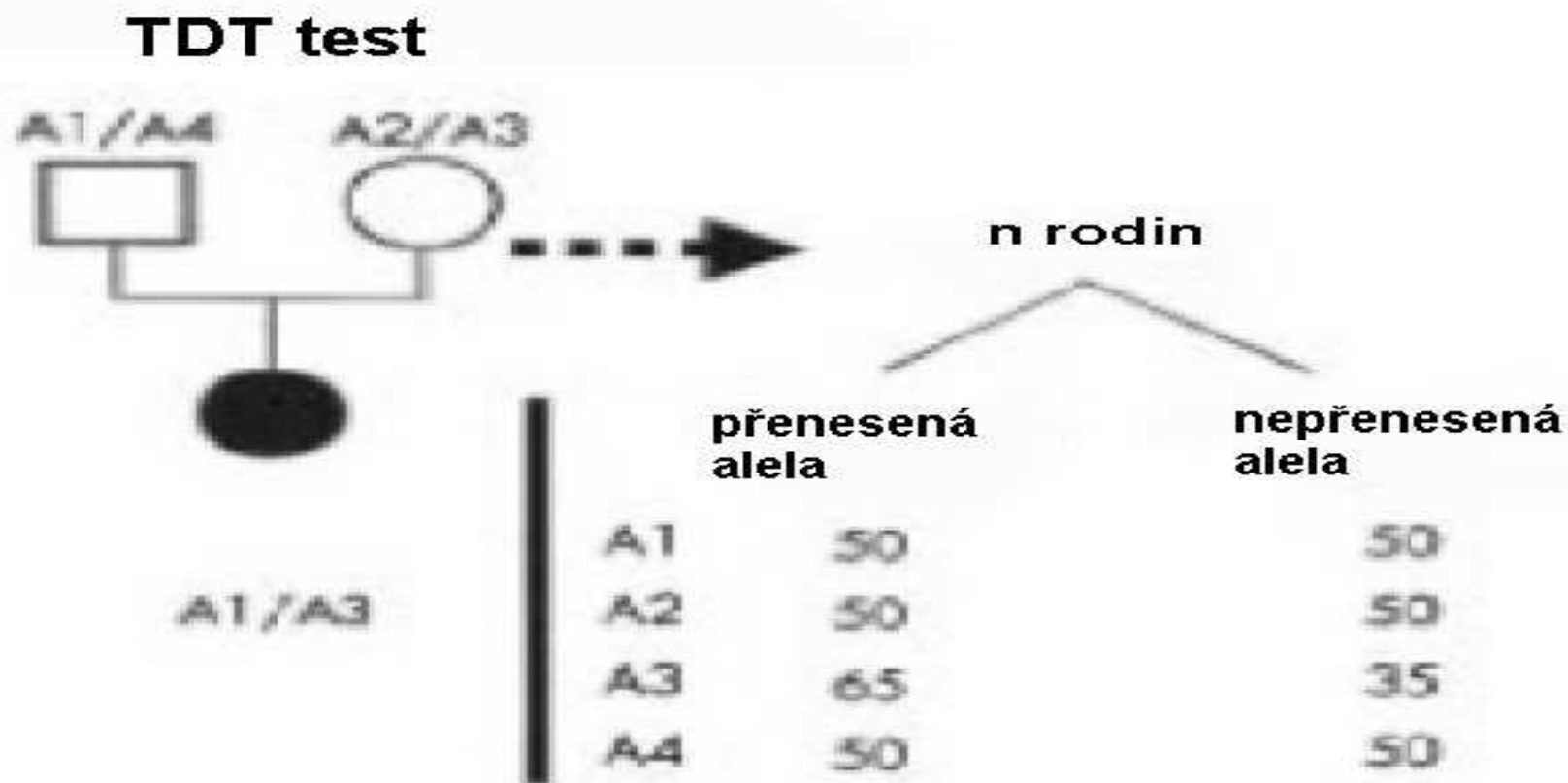
Klasická vazebná analýza v rodinách



Sdílení alel
(např. sib pair metod)

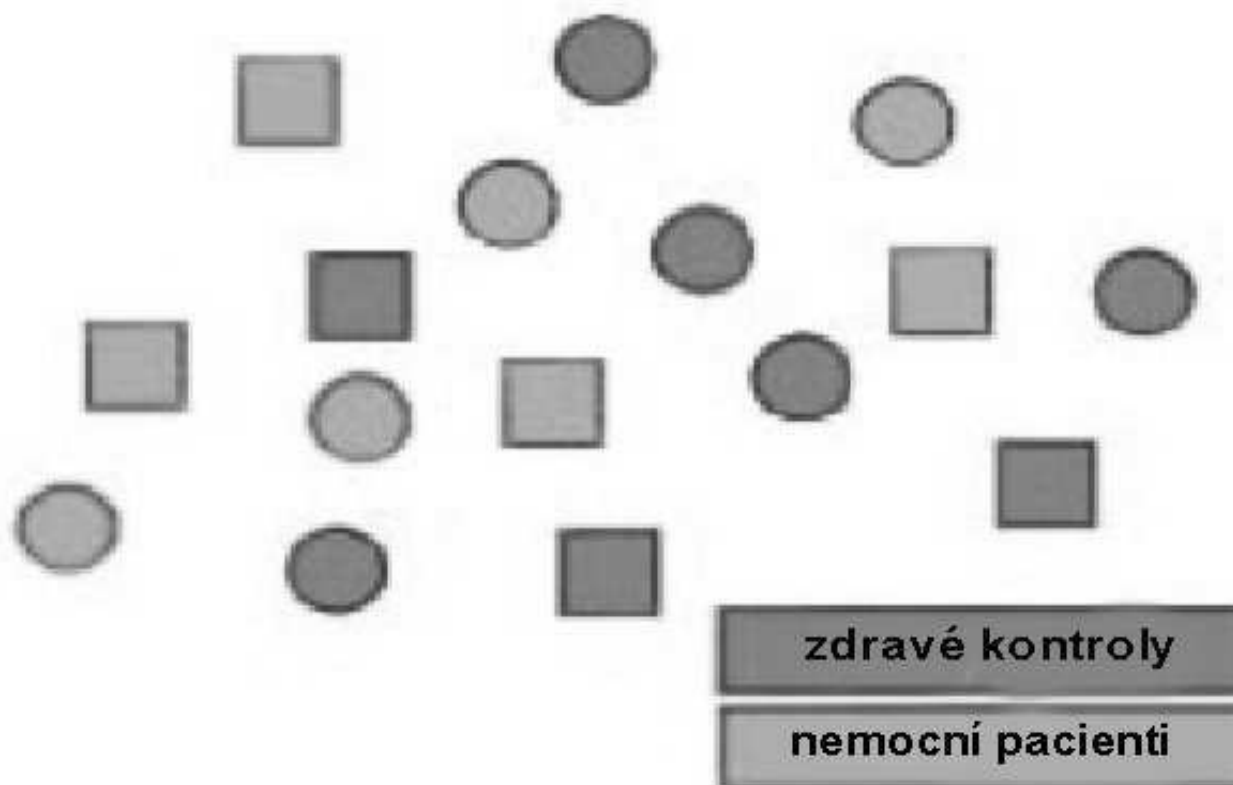


TDT analýza (transmission disequilibrium test)



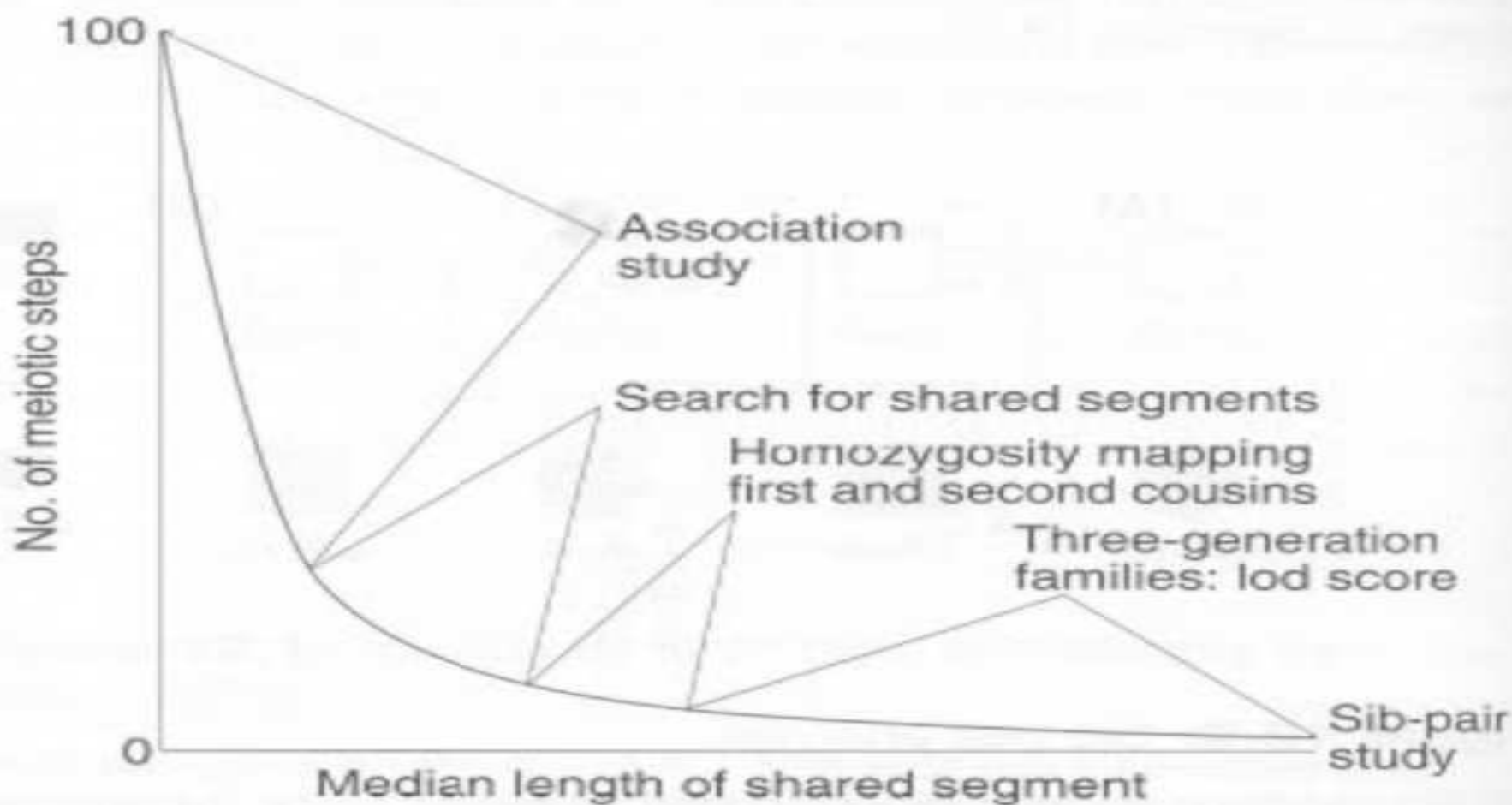


Asociační studie





Rodinné a asociační studie – dva konce kontinua





Asociace je principem zcela odlišná od vazby

Linkage (vazba) - je vztah mezi lokusy

**Asociace – je statistický údaj o společném výskytu alel či fenotypů
(vztah mezi alelami či fenotypy)**



**Alela A je asociována s chorobou D, když osoby, které trpí D mají A více
(nebo méně často) než lze předpokládat z výskytu frekvencí D a A v
populaci.**

!!! Problematika výběru kontrolní skupiny!!!



Možné příčiny „pozitivní“ asociace

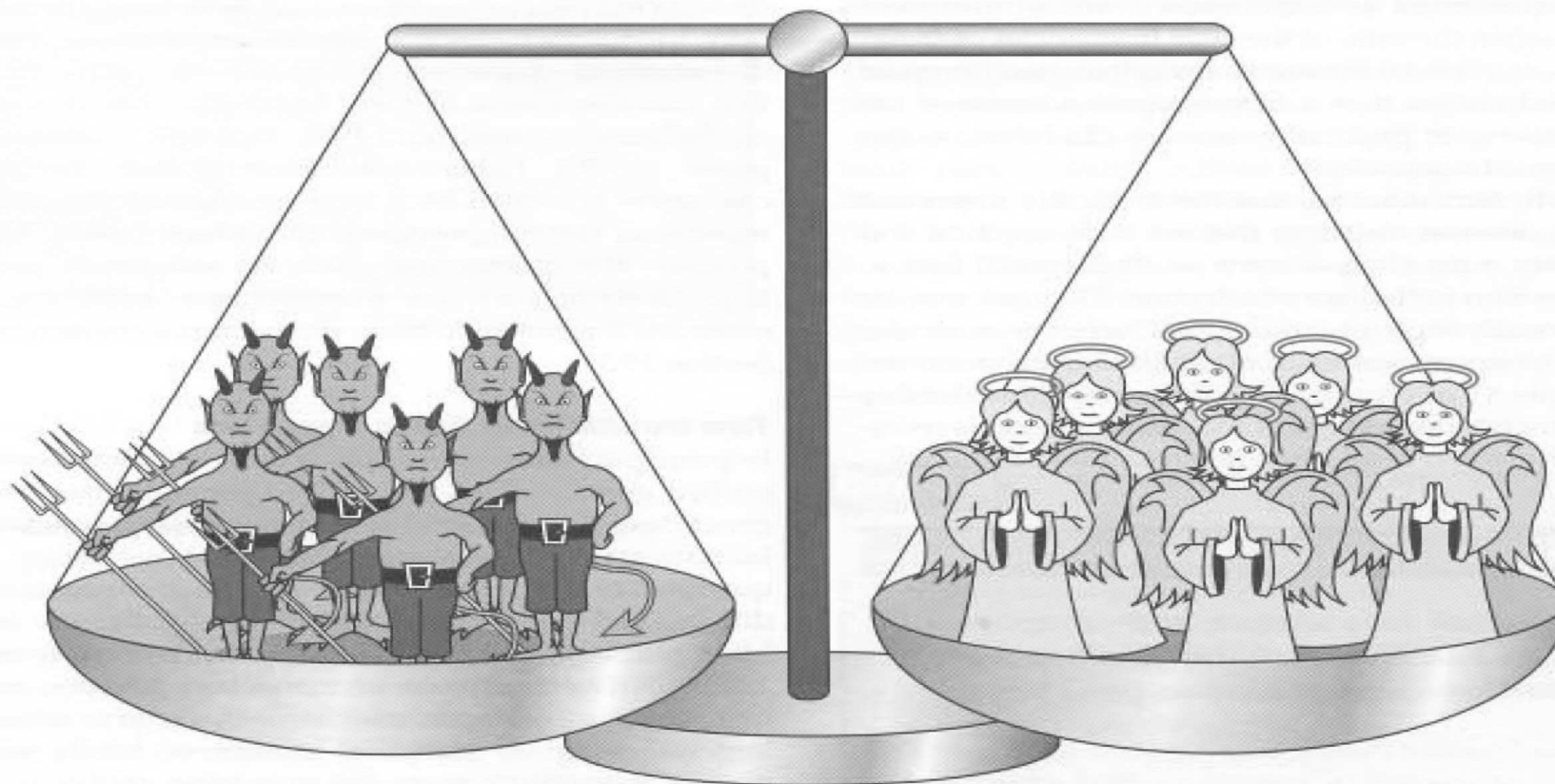
- **Kauzální souvislost**
- **Přirozená selekce**
- **Populační stratifikace**
- **Statistický artefakt**

**!Hodnoty pravděpodobností asociačních studií musí být korigovány:
ne $p=0.05$ (event. 0.01) ale $p=0.05/n$ (Bonferonni correction)**

- **Linkage disequilibrium**

Problematika studia komplexních nemocí

Polygennost → více faktorů - tzv. „malé“ faktory



Heterogenita (klinického fenotypu - genetická – populační)

	Allelic heterogeneity	Locus heterogeneity	Phenocopy
Definition	When two or more alleles of a single locus are independently associated with the same trait	When two or more DNA variations in distinct genetic loci are independently associated with the same trait	The presence of a disease phenotype that has a non-genetic (random or environmental) basis
Diagram			
	Trait heterogeneity	Phenotypic variability	
Definition	When a trait, or disease, has been defined with insufficient specificity such that it is actually two or more distinct underlying traits	Variation in the degree, severity or age of onset of symptoms exhibited by persons who actually have the same trait or disease process	
Diagram			

Interakce faktorů

	Gene-gene interaction	Gene-environment interaction
Definition	When two or more DNA variations interact either directly (DNA-DNA or DNA-mRNA interactions), to change transcription or translation levels, or indirectly by way of their protein products, to alter disease risk separate from their independent effects	When a DNA variation interacts with an environmental factor, such that their combined effect is distinct from their independent effects
Diagram	<p>Allelic variant I of locus A Allelic variant II of locus B</p> <p>No disease Disease X</p>	<p>Allelic variant I of locus A Environmental factor K</p> <p>No disease Disease X</p>



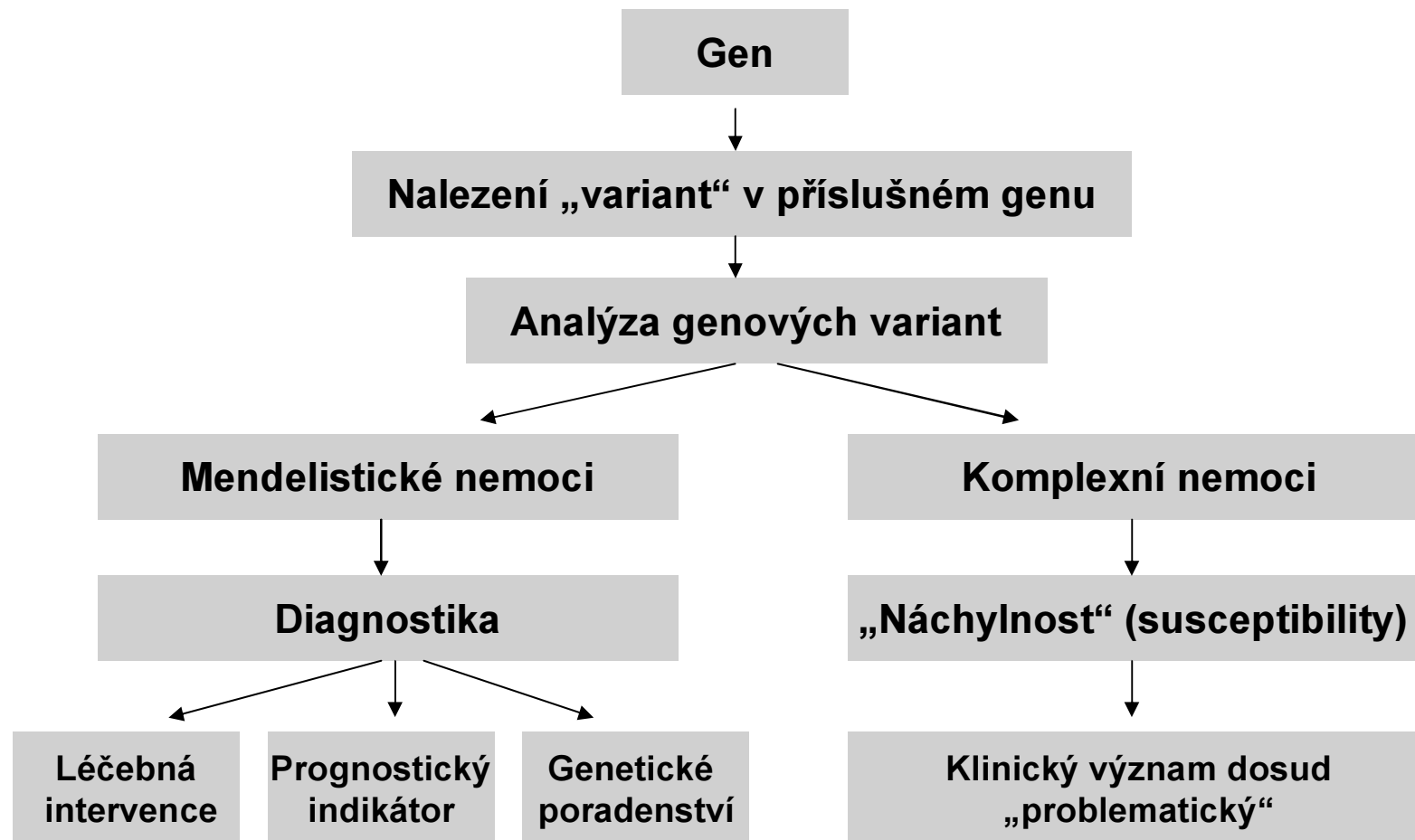
Inkompletní penetrance – zděděné příslušné sady patologických alel ještě nemusí nutně vést ke klinicky manifestnímu onemocnění

Pleiotropie– tytéž geny mohou mít různé účinky na jednotlivé složky atopického fenotypu

Imprinting – modifikace maternálních a paternálních genů během gametogeneze tak, že mají odlišnou expresi v zygotě



Genetická analýza komplexních nemocí vs. monogenních chorob





Vyjádření „rizika“ u komplexních nemocí

- **Riziko = pravděpodobnost vývoje onemocnění**
Numericky: 0 – 1

Znaky (genetické, environmentální,...), které zvyšují tuto pravděpodobnost

⇒ **rizikové faktory:**

- **Výsledky různých studií daného RF by měly být konzistentní**
- **Asociace by měla být silná a specifická (nezávislá na jiných faktorech)**
- **Odpověď dávka/efekt**
- **Biologická věrohodnost**

Odds ratio (OR)

		Condition:		Total
		Yes	No	
Exposure	Yes	41 (A)	11 (B)	52 (A+B)
	No	5 C	9 D	14 C+D
Total		46 A+C	20 B+D	66 A+B+C+D

$$OR = \frac{A/C}{B/D} = \frac{AD}{BC} = \frac{(41)(9)}{(11)(5)} = 6.71$$



Výpočet relativního rizika (RR)

Relativní riziko = poměr incidence onemocnění v exponované skupině ku incidenci v neexponované skupině

		Condition:		Total
		Yes	No	
Exposure	Yes	349 (A)	1437 (B)	1786 (A+B)
	No	1706 C	6898 D	7974 C+D
Total		1425 A+C	8335 B+D	9760 A+B+C+D

$$RR = \frac{A/A+B}{C/C+D} = \frac{(349)(1786)}{(1076)(7974)} = 1.45$$



Alergické choroby – příklad komplexních chorob

- **Celosvětově řazeny mezi závažnou skupinu civilizačních nemocí - komplexní nemoci**
 - **„Alergie“ - z řečtiny (allos ergeia) =
změněná schopnost reakce
(von Pirquet, 1906)**
- „anafylaktická reakce“ - už z r. 2140 př. n. l.
(faraon Menes po bodnutí hmyzem)**



Alergie

= imunopatologický stav neúčelné obrany organismu,



vyjádřen nepřiměřenou specifickou odpovědí na antigenní podnět



navozující zánětlivé změny ve tkáních a vedoucí k poruše funkce orgánů



GENY



**ATOPIE
BHR**

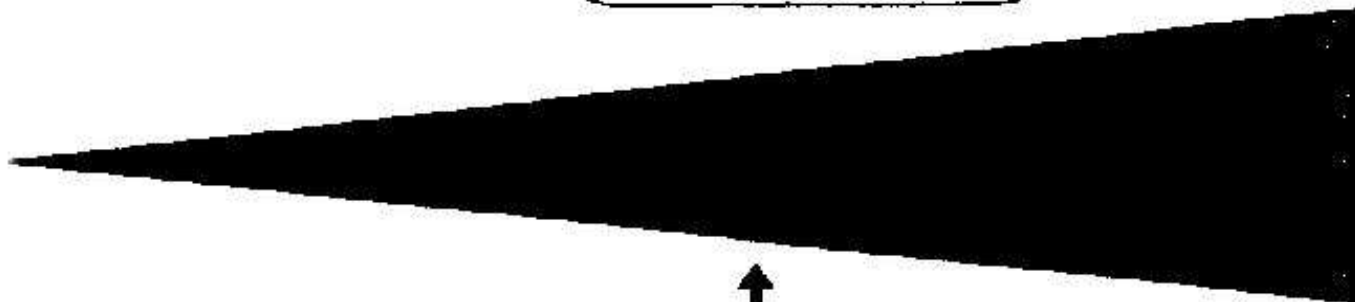
PROSTŘEDÍ

Alergeny
Viry
Polutanty



ASTMA

Mírné



Závažné



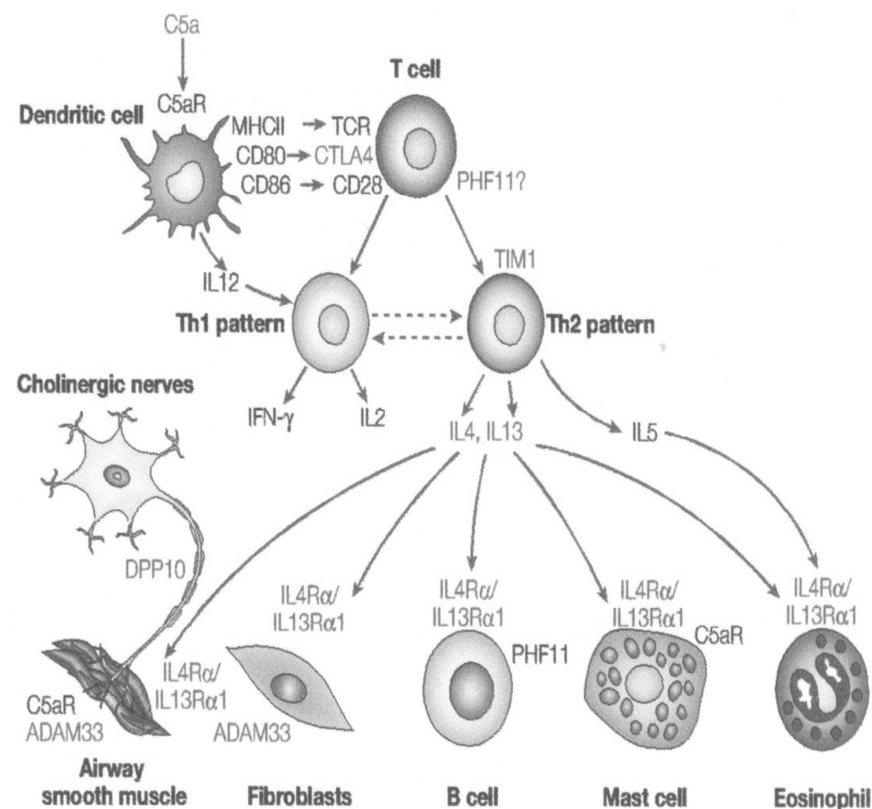
**GENY
PROSTŘEDÍ**



Kandidátní geny a patogeneze astmatu

- 2q14: IL-1
- 5q31: IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13,
GM-CSF, CD14 receptor
- 5q32: B2-adrenergní receptor
(polymorfismus 16 a 27)
- 6p21: HLA komplex, TAP geny,
TNF alfa (polymorfismus -308)
TNF beta (polymorfismus NcoI)
- 10: 5-LO
- 11q13: Receptor pro IgE
- 12q: Interferon gamma
- 12q: Syntetáza oxidu dusnatého
(ecNOS)
- 13q: Esteráza D protein
- 14q: TCR alfa/gamma komplex

+ řada dalších oblastí na různých
chomozomech





Celogenomové analýzy u alergických nemocí

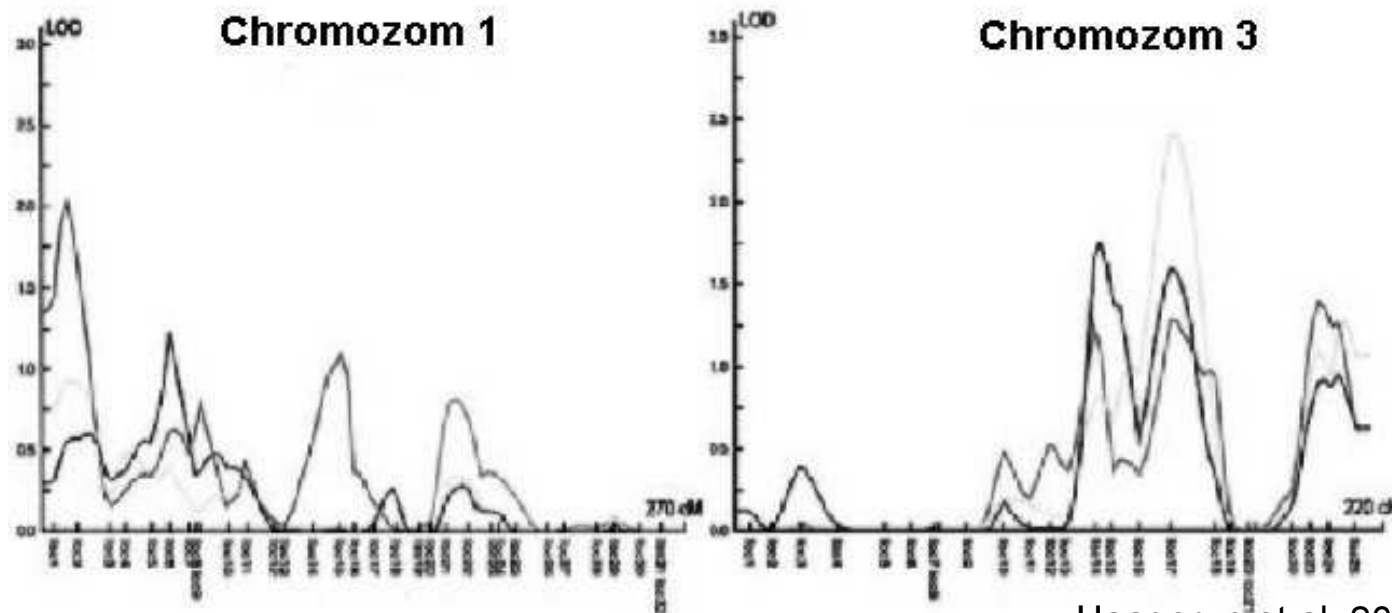
- dosud 12 celogenomových studií
(<http://cooke.gsf.de/asthmagen>)
- Detekce oblastí chromozomů s možnou vazbou na výskyt alergických chorob nebo intermediárních znaků (IgE, eosinofily, kožní testy apod.)
- celogenomová signifikance – vzácná, většinou „podezřelé“ oblasti
- některé výsledky se opakují, některé rozdílné (jiná populace, jiná metoda, jinak definovaný fenotyp)

Oblasti chromozomů „podezřelé“ z účasti na genetice astmatu

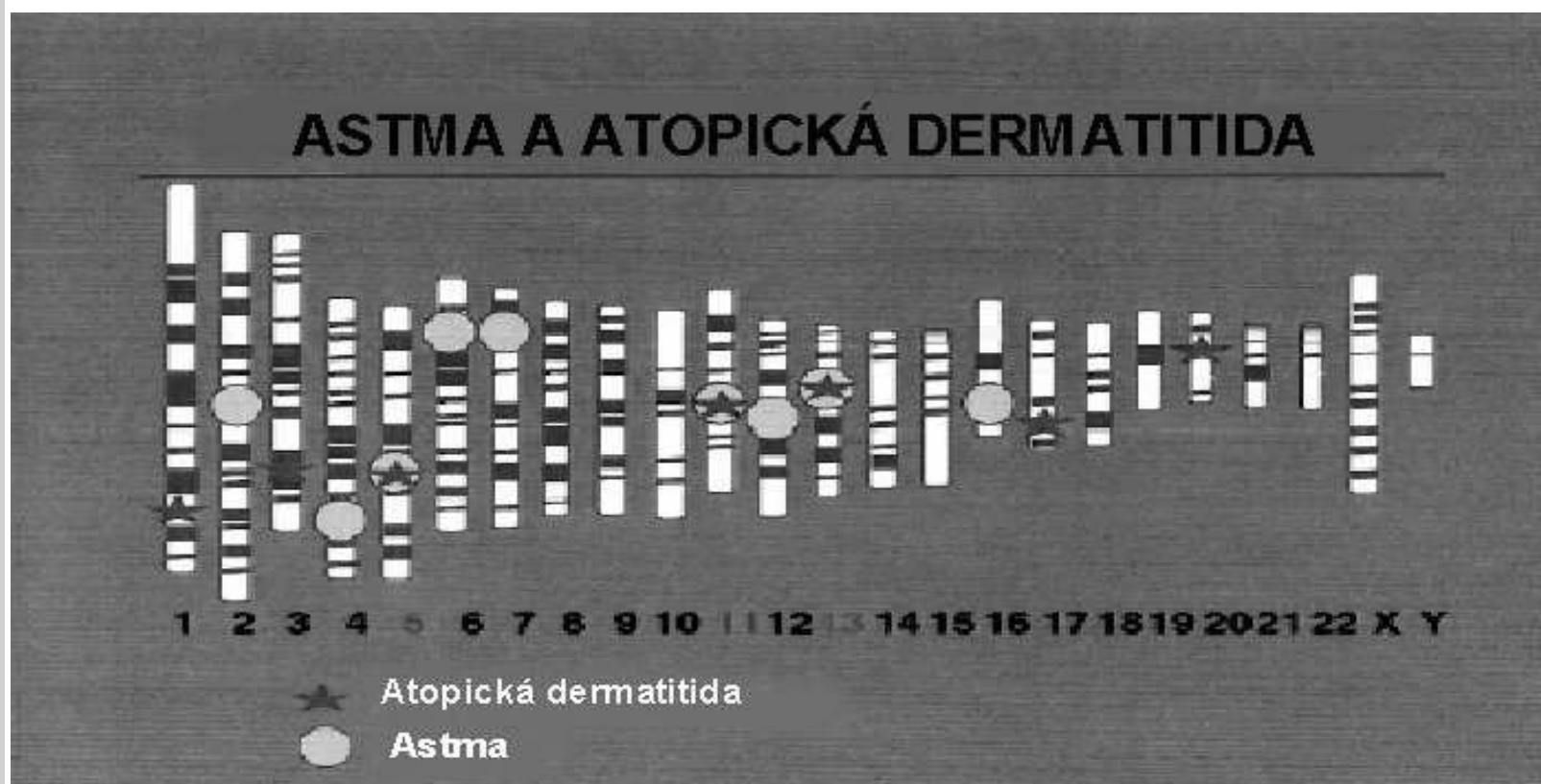
Cytogenetický lokus

1p31
2p
2q33
3p
3q21
4q24 q27
4q35
5p15
5q31 q33
6p23 p21
7p15 p14
7q35
9q31
11p15
11p13
11q13
12q15 q24
13q21
13q31
14q11
16p12
16q22 q24
17p12–17q11
17q12–21
19q13
21q21
Xq28 (Yq28)

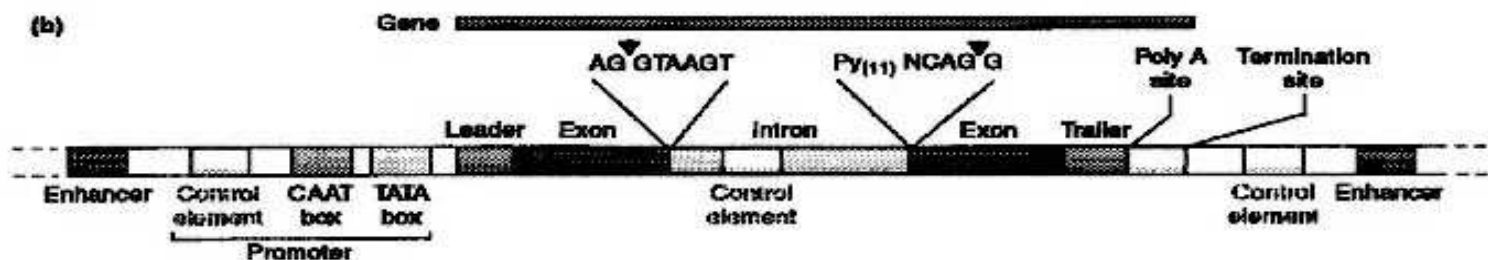
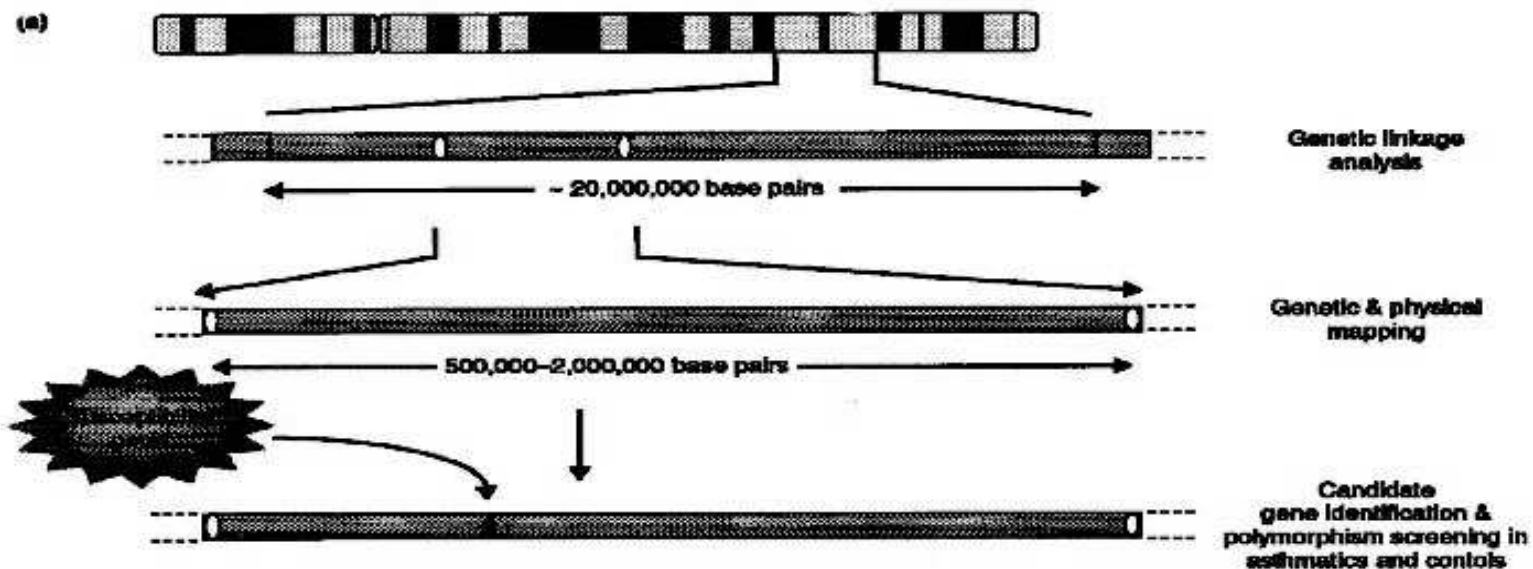
- Atopie
- Alergické astma
- Celkové IgE



Astma a další alergické nemoci



Celogenomové analýzy a poziční klonování



Gen pro ADAM33

(A Disintegrin And Metalloproteinase 33)

- první gen asociovaný s astmatem a BHR nalezený na základě celogenomové vazebné analýzy (Eerdewegh et al. 2002)
- exprese: fibroblasty a hladká svalovina bronchů
- funkce:
 - zinek-dependenční metaloproteináza, zakotvená v plazmatické membráně
 - mj. interakce s membránově vázanými enzymy a receptory, extracelulární komunikace
 - účast v remodelaci dýchacích cest u astmatu

gen: chromozom 20p13

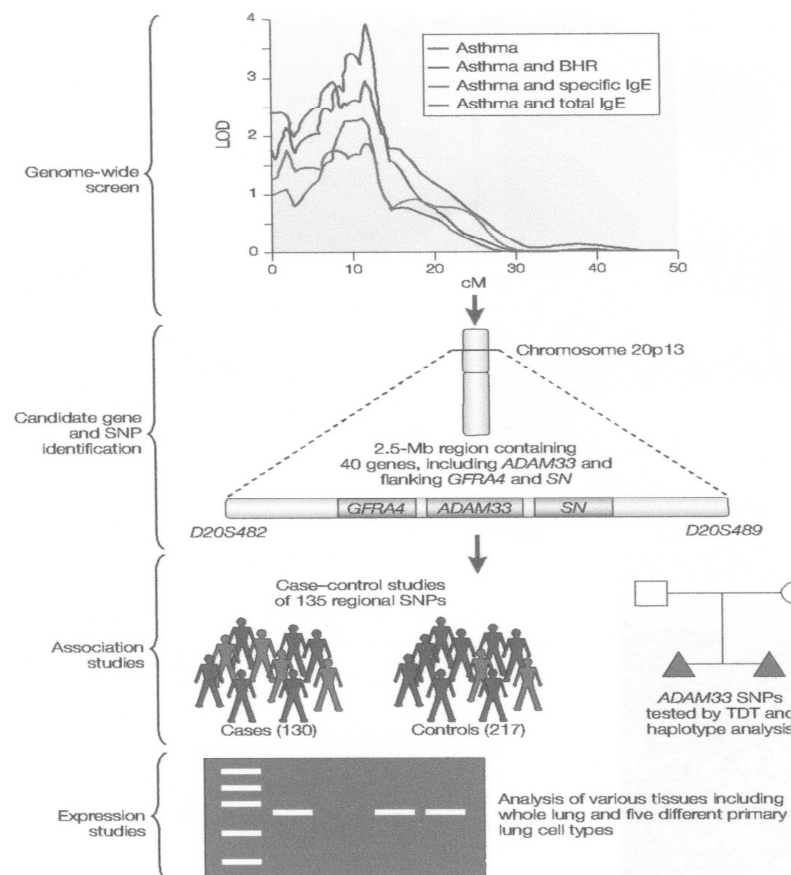


TABLE II. Asthma-related phenotypes associated with SNPs in *ADAM33*

Population	Phenotype	S1 (V→1)	S2	ST+4	ST+7	T1 (M→T)	T2 (P→S)	V-1	V4
Dutch	Positive ST	$P = .037^*$	$P = .014^\dagger$		$P = .046^*$			$P = .050^*$	
	Total serum IgE								
African American	Positive ST			$P = .022^\ddagger$					$P = .017^\ddagger$
	Total serum IgE								
US white	Positive ST		$P = .031^*$			$P = .0033^*$	$P = .0037^*$		
	Total serum IgE								
US Hispanic	Positive ST			$P = .032^*$		$P = .0099^*$	$P = .0092^*$	$P = .020^\ddagger$	
	Total serum IgE								

ST, Skin test.

*Common allele is recessive.

†Codominant model.

‡Common allele is dominant.



Gen pro DPP10 (DiPptidyl Peptidase 10)

- Allen et al (2003) - vazebnou analýzou na chromozomu 2q
- Potvrzení TDT analýzou 144 rodin
- Sekvenování oblasti o 1,5 MB → 105 SNP



**nejsilnější asociace s WTC122
nejběžnější alela asociována s astmatem a fenotypy
(také haplotypy s touto alelou)**

- Case-control studie 1047 dětí z Mnichova



asociace s prick testy, atopií a astmatem

- Funkce: - modulace zánětlivého procesu v dýchacích cestách ?
- regulace neuronální (parasymatická ganglia) ?



Gen pro PHF11

(Plant Homodomain (PHD) Finger protein-11)

- Cookson et al. (2003) identifikovali PHF11 na chromozomu 13q
↓
podobným přístupem jako u DPP10
- 49 SNP, 4 del/ins a (GGGC) repetice → 3 (intron 5, 9 a 3' oblast)
↓
asociace s Ln IgE a astmatem
- Funkce: - negativní regulace transkripce ?

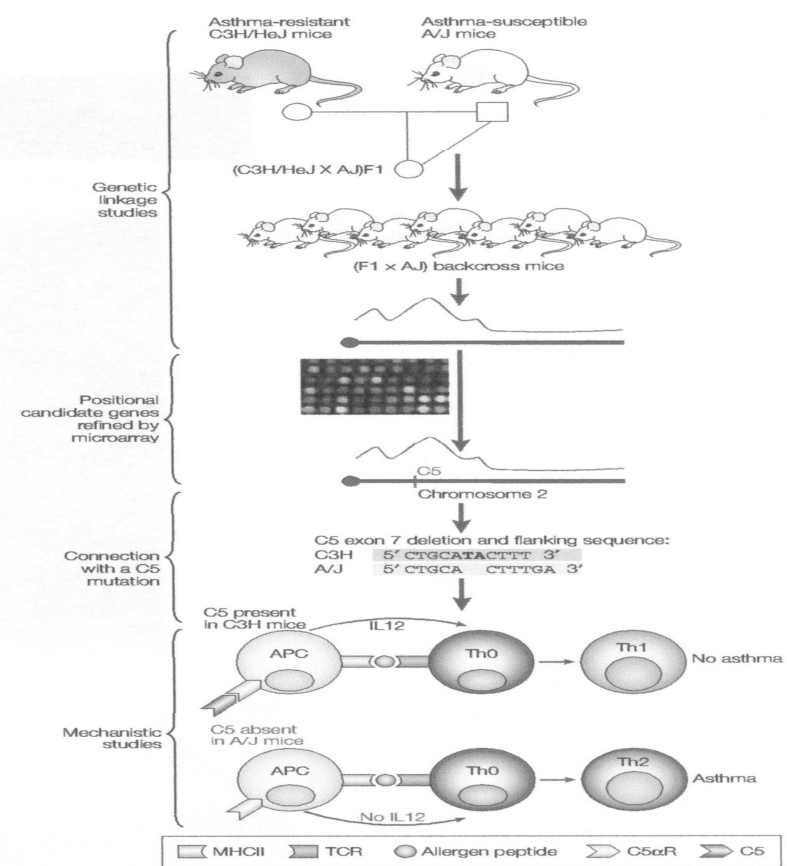
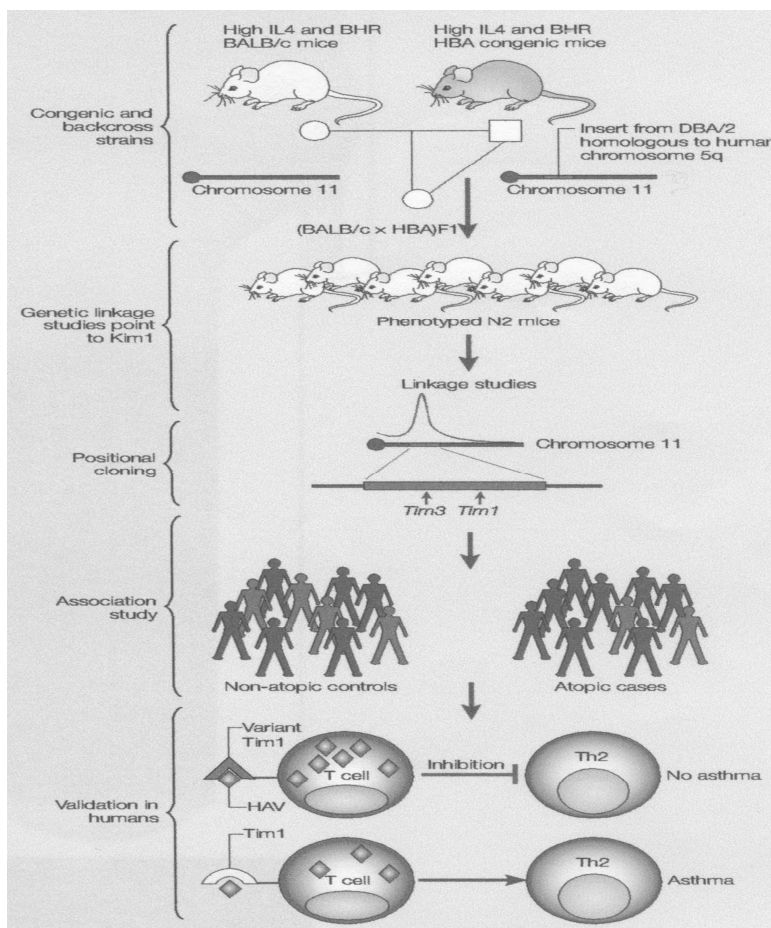


Gen pro Tim 1

(T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing molecules)

Gen pro C5

(complement factor 5 gene)





Výzkumné hypotézy & cíle genetického výzkumu v naší laboratoři

- **Asociace „kandidátních“ genů s vybranými patologickými stavy metodou „case-control“**
- **Role genetické variability (polymorfizmů) v těchto lokusech při:**
 - predispozici/náchylnosti k onemocnění
 - modulaci penetrance (např. klinické manifestace), progresu či závažnosti
 - tkáňové/orgánové preferenci
- **Interakce alelických variant v genu/genech s jiným genem/geny či zevními faktory**



Přístupy ke studiu genetického pozadí na našem pracovišti

- **Metoda pozičního klonování
(genetické mapování)**
- **Metoda hledání kandidátních
genů**

Patologický stav (nemoc)



způsobený

Defekt



kódovaný

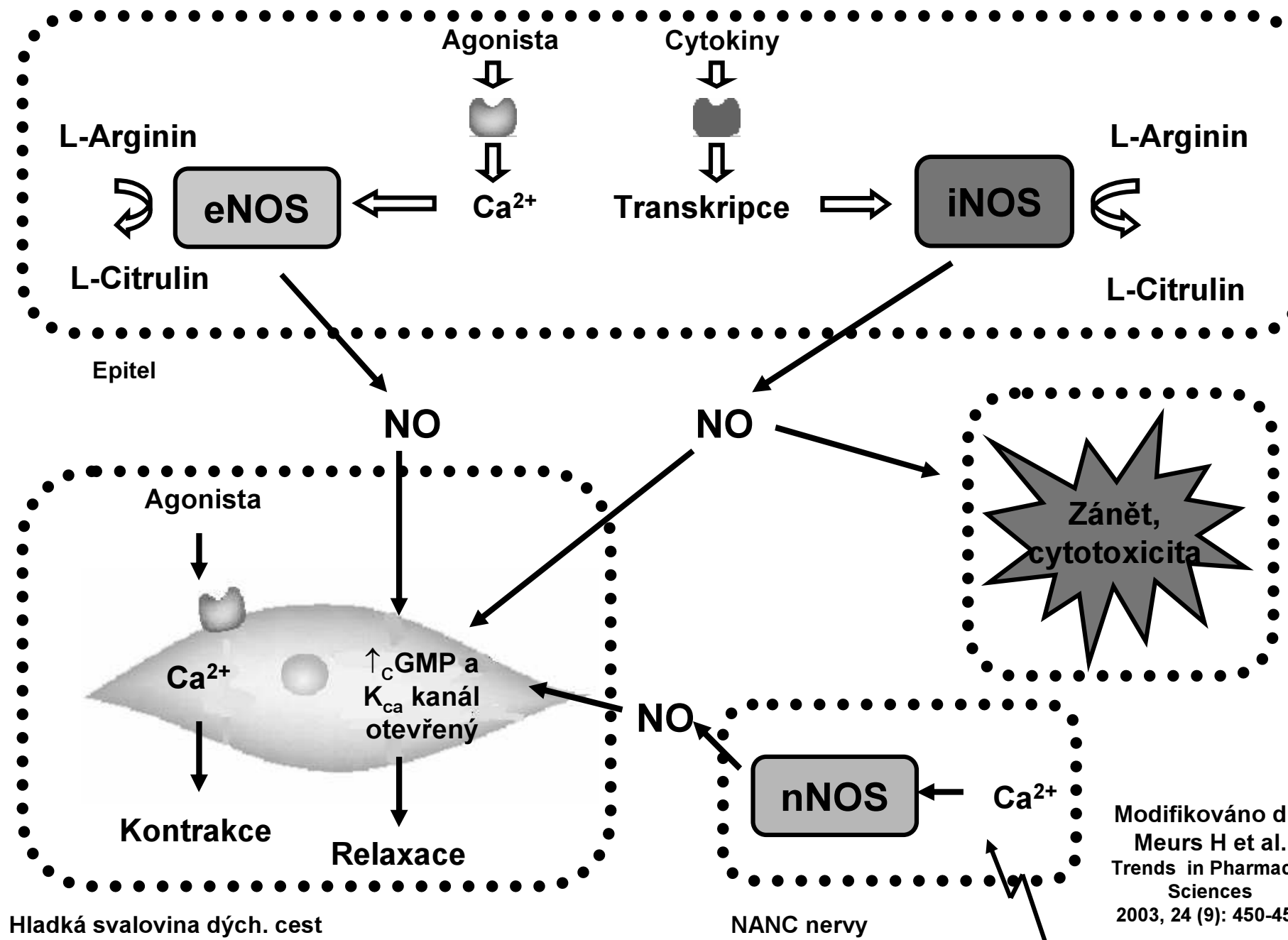
Gen



obsahuje

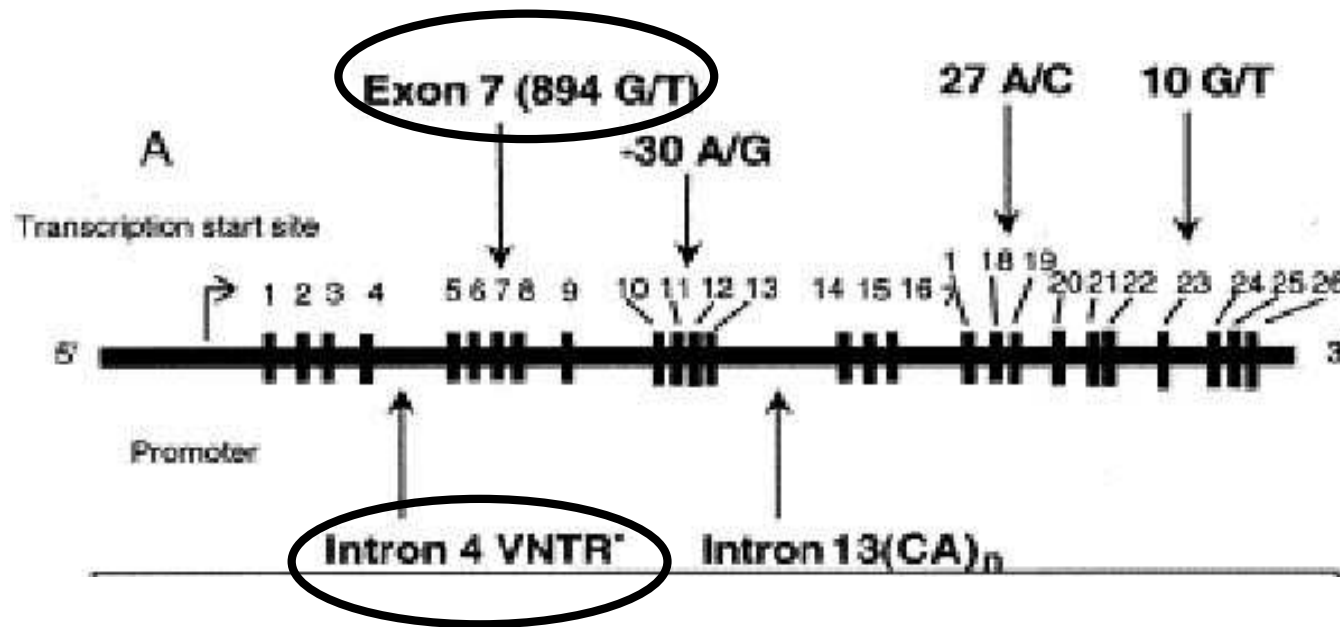
Polymorfismus

Oxid dusnatý a NOS

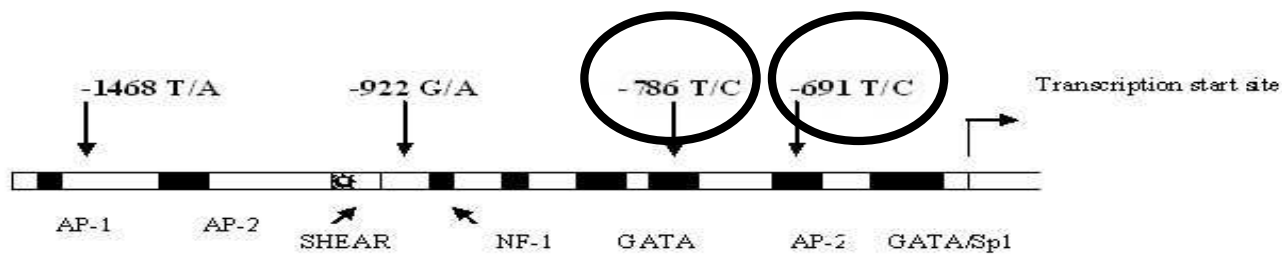


Modifikováno dle
Meurs H et al.
Trends in Pharmacol
Sciences
2003, 24 (9): 450-455

Gen pro syntázu oxidu dusnatého (eNOS)



7q35 - 36



* Estrogen-responsivní element

Polymorfizmy v NOS3 promotoru

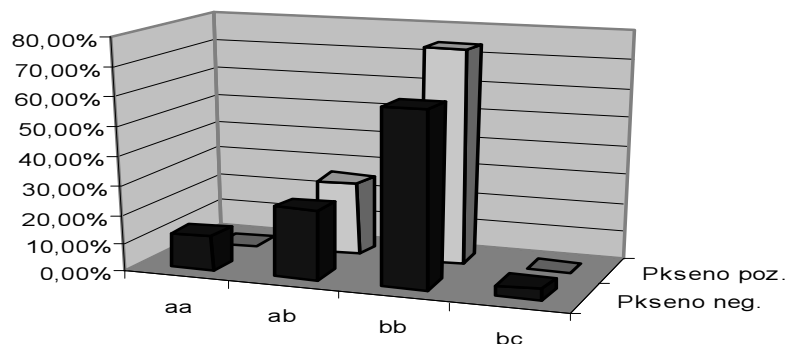


Výsledky analýzy polymorfizmů v genu pro eNOS (NOS3) – 27-bp repetice

27-bp rep.	Pk seno neg	Pk seno poz
aa	12.00%	0%
ab	24.00%	25.90%
bb	60.00%	74.10%
bc	4.00%	0%
	p = 0.004	

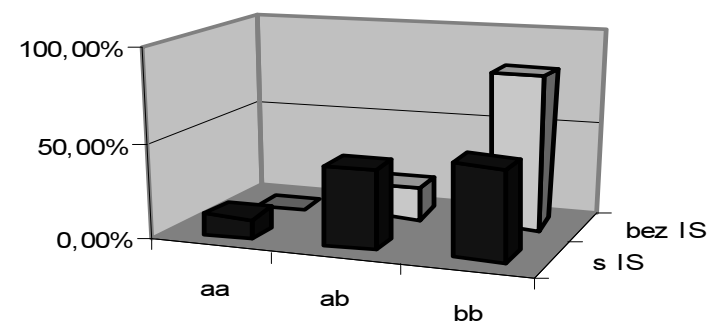
27-bp rep.	s IS	bez IS
aa	10,5%	0
ab	42,1%	17,9%
bb	47,4%	82,1%
P=0,0018; OR=5,11; 95% CI: 1,61-16,3		

NOS3 gen (27-bp repeat ve 4. intronu)



Izakovičová Hollá L. et al.
Clin Exp Allergy 2002; 32 (8): 1193-1198

NOS3 (27-bp repeat)



Schuller M et al.
Allergy 2002; 57 (4): 368-369



Výsledky analýzy polymorfizmů v genu pro nNOS (NOS1)

- C/T záměna v exonu 29 (5266)

NOS1 genu



asociována s astmatem v japonské populaci

- studie 688 osob v české populaci

368 s astmatem I. typu

320 kontrol

Geometrické průměry hladin IgE

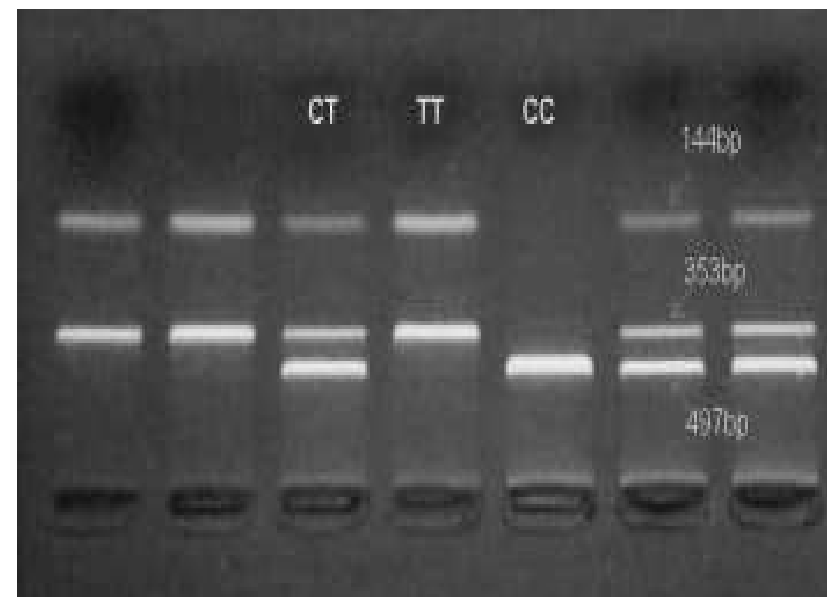
NOS1 (5266C/T)	Ln IgE (mean ± SD)
CC	4,34 ± 1,40
CT	4,58 ± 1,53
TT	5,01 ± 1,61
P < 0.05	

Holla LI et al.
Allergy 2004, 59 (5): 548-552

CD14 receptor

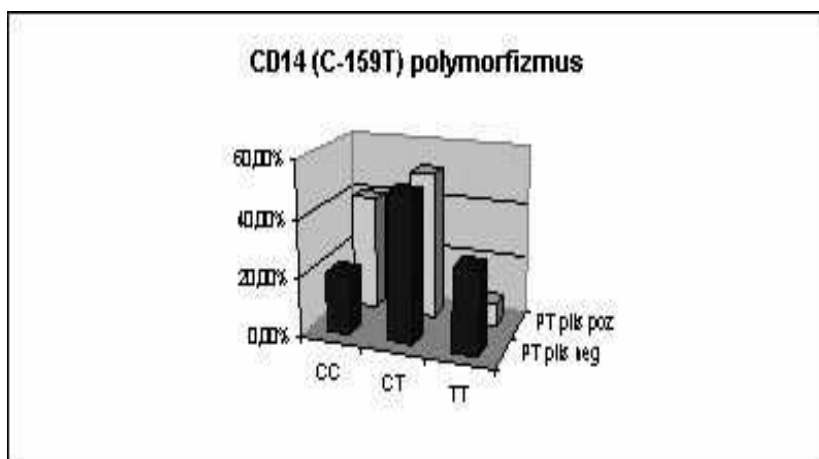
- Receptor rozpoznávající LPS
 - protein-2 typy: mCD14+sCD14
 - 1 gen
 - ↓
- poziční kandidátní gen atopie
(5q31)
- několik polymorfizmů
 - ↓
- 159C/T a -1359G/T
- inverzní korelace sCD14 a IgE
(Baldini et al. 1999)

-159C/T polymorfizmus

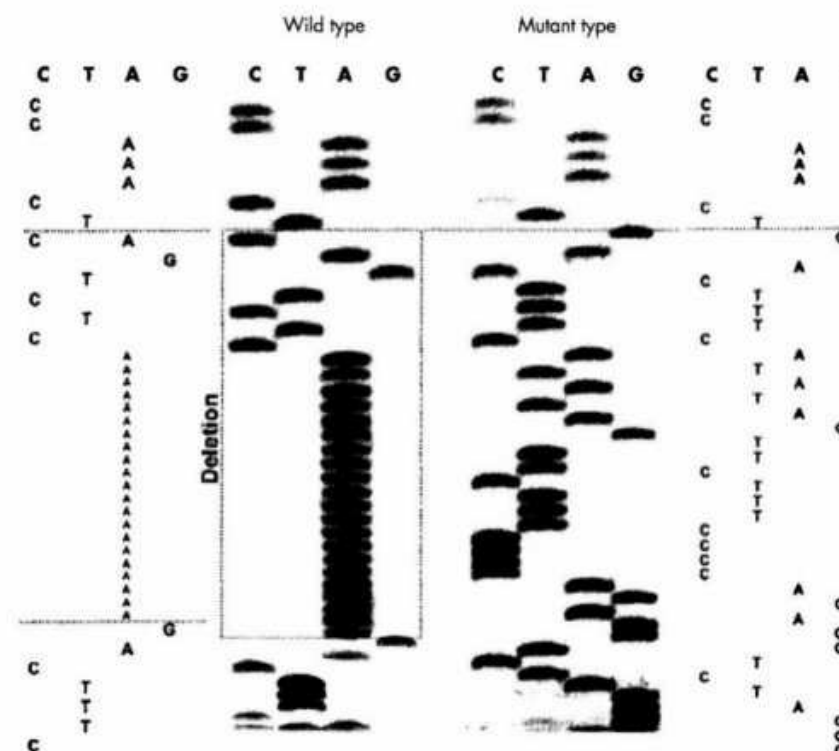


Analýza polymorfizmu v CD14 receptoru v české populaci

C-159T	PT plis neg	PT plis poz
CC	20.8%	40.5%
CT	50.5%	51.4%
TT	28.7%	8.1%
p= 0.002		




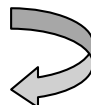

mutace (EMBL : AJ491310)



New mutation [28 bp deletion] in the promoter of the CD14 gene (del from -1310 to -1337).



Přehled výsledků

- **Nalezení nových polymorfizmů:** CD14
- **„Case-control“ rozdíly:** NOS3 (-786C/T)
gen „vnímavosti“ ? 
- **Vztah k závažnosti onemocnění:** NOS3 (27-bp repeat ve 4. intronu)
gen „závažnosti“ ? 
- **Vztah k intermediárním fenotypům:** NOS1(5266C/T), NOS3 (27-bp rep.)
geny „atopické predispozice“ ? 

Nová data poukazují na důležitost haplotypového přístupu při analýze komplexních nemocí



Další multifaktoriální (komplexní) choroby

- Diabetes mellitus
- Hypertenze
- Schizofrenie
-

Výsledky genetického výzkumu se netýkají jen relativně malého počtu nešťastníků postižených některou z více či méně vzácných monogenních chorob, ale desítek miliónů lidí na světě.



obtížný interdisciplinární problém



Cíle genetického výzkumu u komplexních nemocí

- **Zlepšit porozumění patofyziologii uvedených chorob**
- **Přispět k diagnostice onemocnění**
- **Nalézt parametry rizika progresu nemoci či stupně její závažnosti**
- **nové poznatky by měly napomoci upřesnění diagnostických a/nebo léčebných postupů u alergických nemocí (individualizovaný přístup k terapii)**



Děkuji Vám za pozornost