

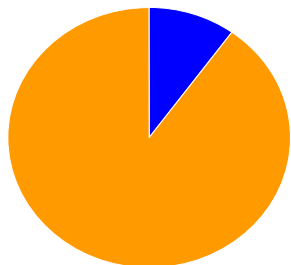


# KOMPLEXNÍ CHOROBY



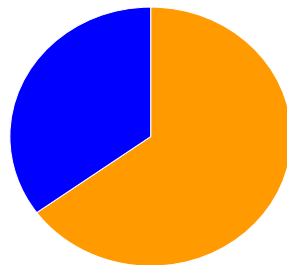
12. 11. 2007

# Geny a onemocnění



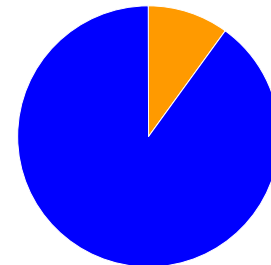
## Monogenní nemoci

- Huntingtonova ch.
- Spinocerebelární ataxie
- Tuberózní skleróza



## Komplexní nemoci

- Alzheimerova nemoc
- Kardiovaskulární choroby
- Autismus
- Parkinsonova nemoc



## Nemoci vyvolané zev. faktory

- Influenza
- Hepatitida
- Spalničky

 - Prostředí

 - Geny

# Genetika onemocnění s komplexní dědičností

- Dědičnost se podílí na **většině běžných onemocnění**
- U téměř 2 ze tří jedinců způsobuje během života morbiditu a předčasnou mortalitu nemoci, jako jsou IM, rakovina, duševní choroby, diabetes apod.

Frekvence různých typů dědičných onemocnění:

Typ dědičnosti	Incidence při porodu (na 1000)	Prevalence ve věku 25 let (na 1000)	Prevalence v populaci (na 1000)
Onemocnění způsobená genomovými a chromozomovými mutacemi	6	1,8	3,8
Onemocnění způsobená mutacemi jednoho genu	10	3,6	20
Onemocnění s multifaktoriální dědičností	~ 50	~ 50	~ 600

- Dědičný znak nebo postižení, které buďto je nebo není přítomno ⇒ **diskrétní (kvalitativní) znak**
- Měřitelné vlastnosti (fyziologické nebo biochemické veličiny – TK, výška, hladina cholesterolu, BMI)  
⇒ **kvantitativní znaky**

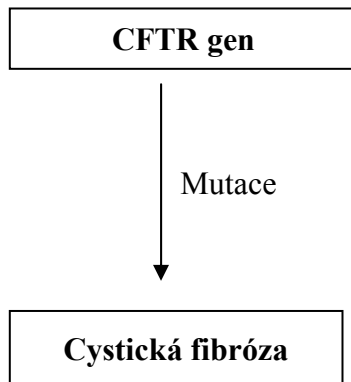
**Pochopení dědičné podstaty variability kvantitativních znaků je základem pro porozumění tomu, jak se geny podílejí na vzniku komplexních nemocí.**

# Problémy, kterými se budeme zabývat

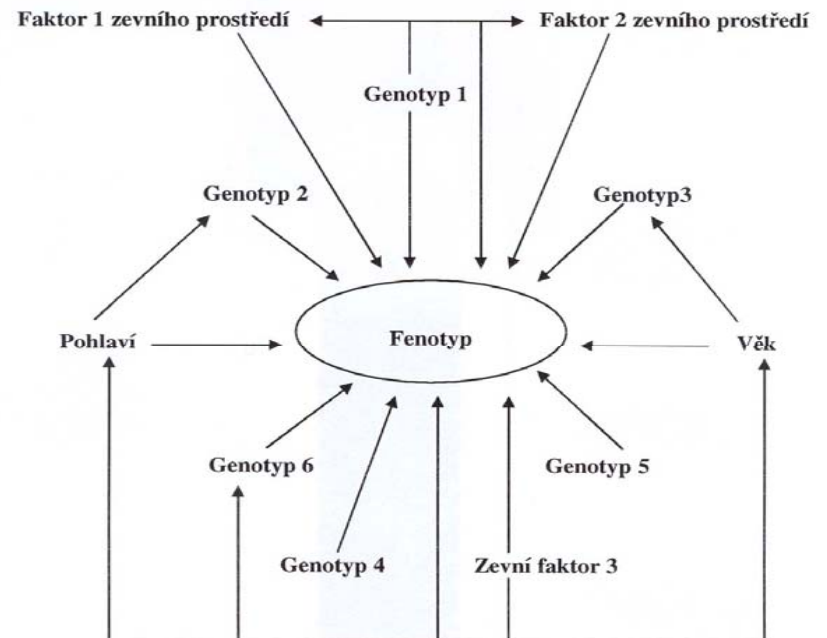
- **Jak zjistit, zda určité geny přispívají ke vzniku častých nemocí a k variabilitě v kvantitativních fyziologických znacích**
- **Popíšeme metody studia těchto chorob**
- **Vysvětlíme metody, které se používají k určení, kolik genů se na vzniku určitého fenotypu podílí a metody, jimiž je zjišťována lokalizace těchto genů v genomu**
- **Nakonec si ukážeme řadu příkladů komplexních nemocí**

# Komplexní nemoci

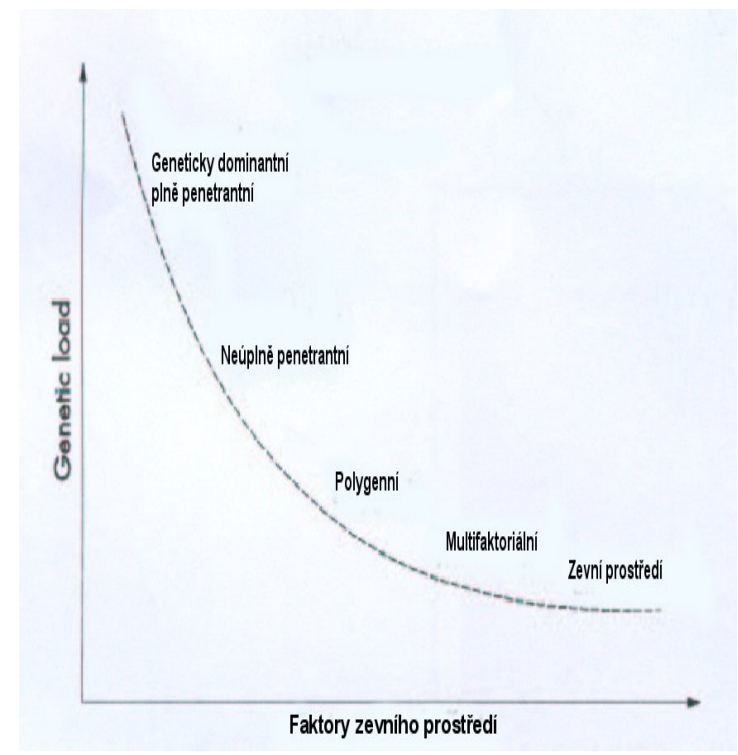
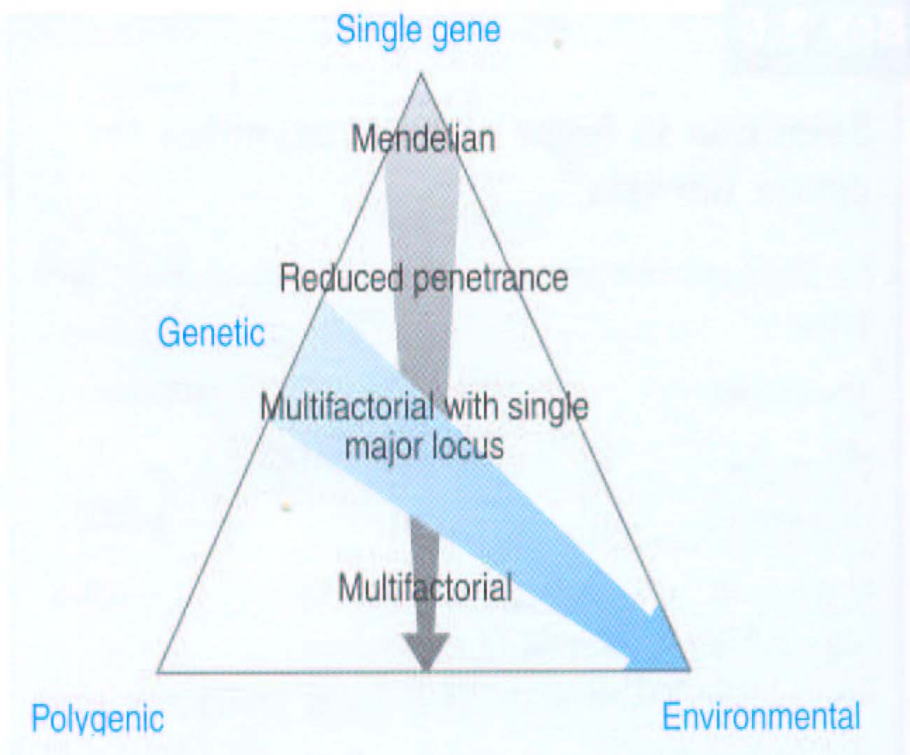
## Monogenní nemoc



## Komplexní choroba



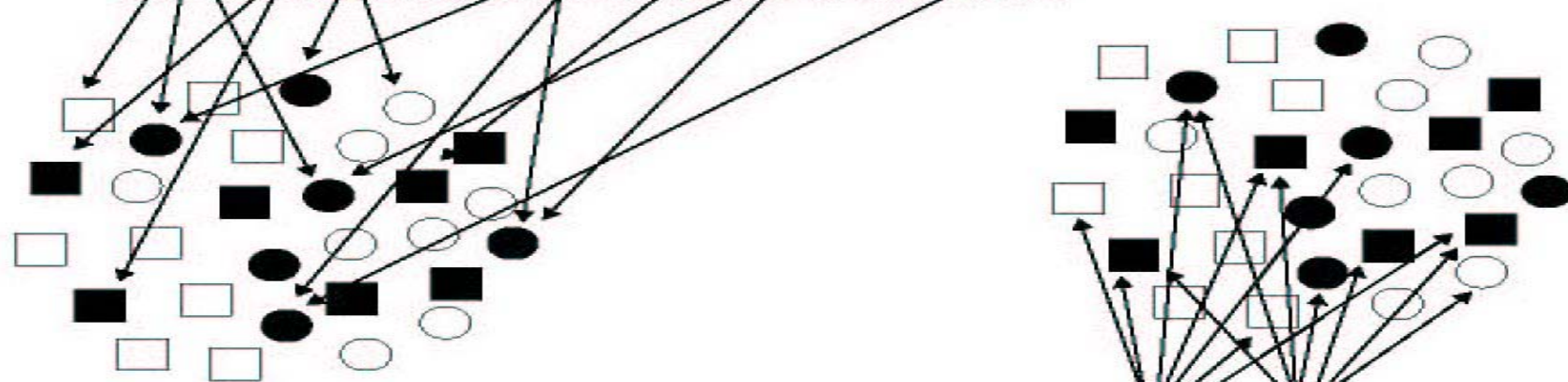
# Spektrum lidských chorob



(a)  
**Multilocus/multiallele hypothesis**

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

Alleles

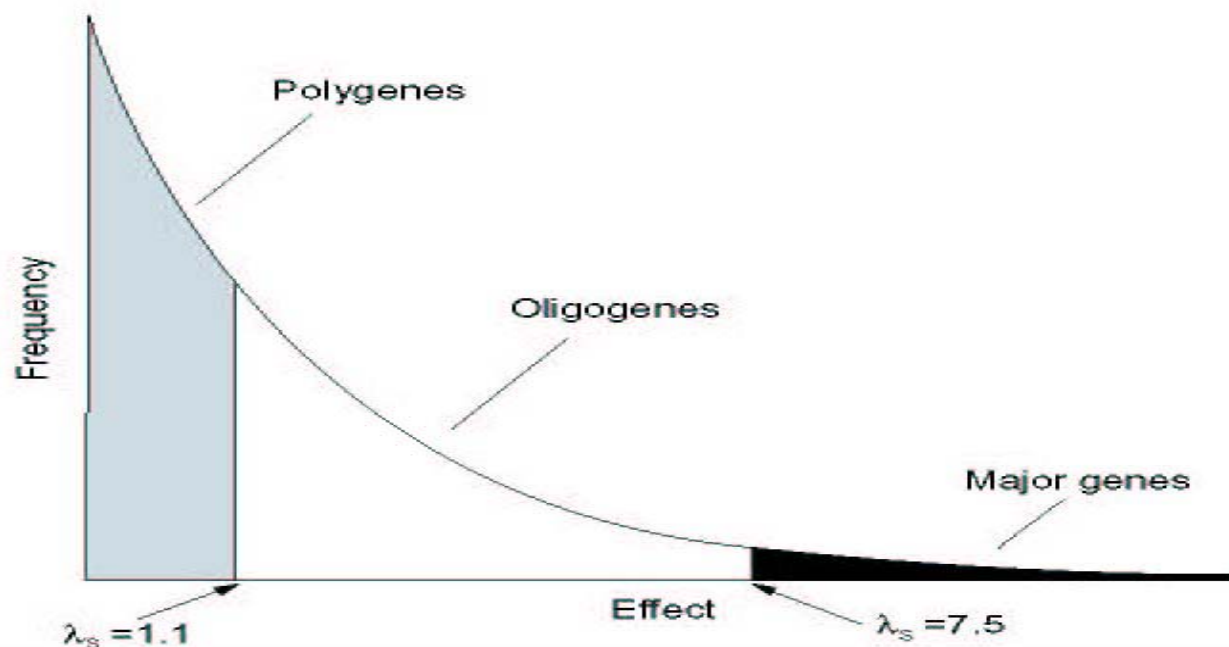


Alleles

Genes A B C D...

**Common disease/common variant hypothesis**

(b)



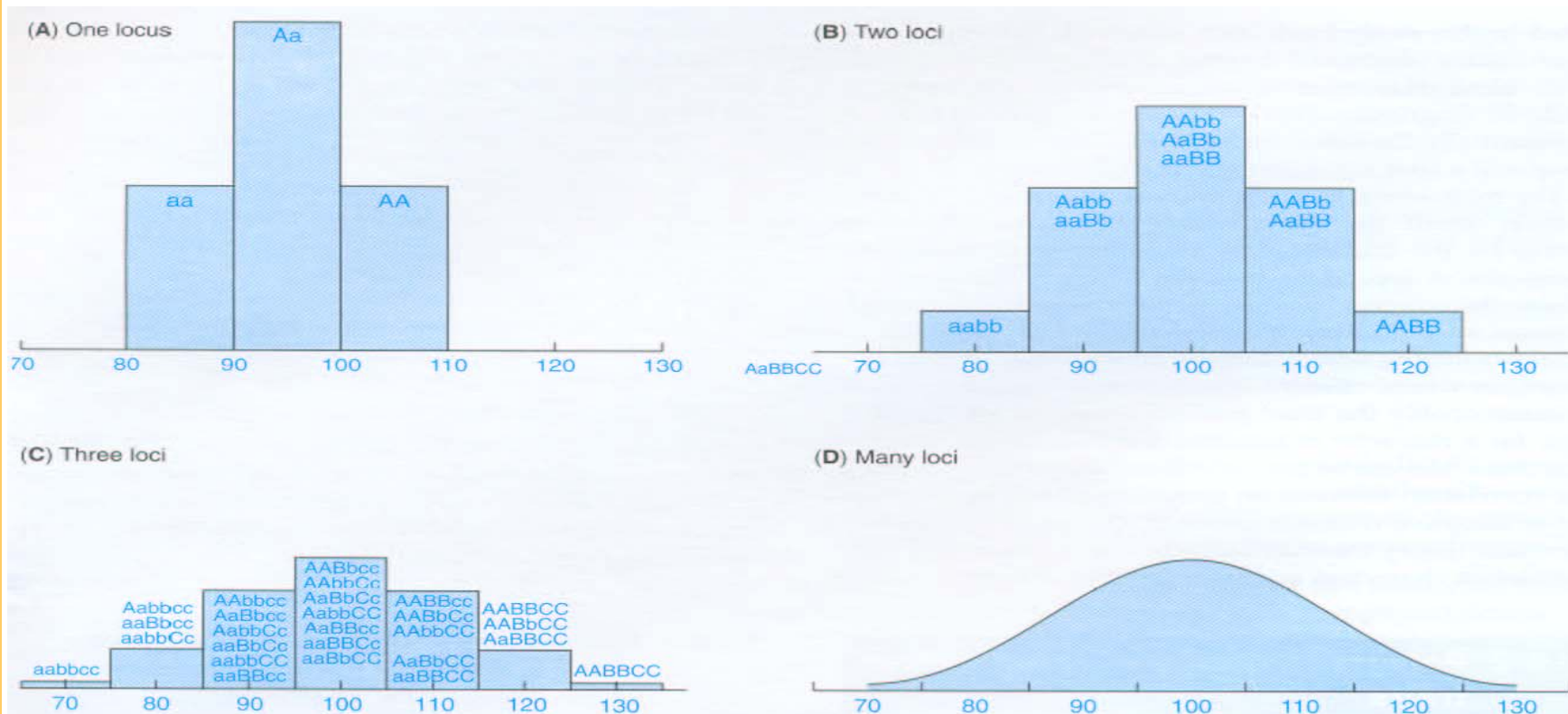


# Komplexní nemoci (znaky)

- 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

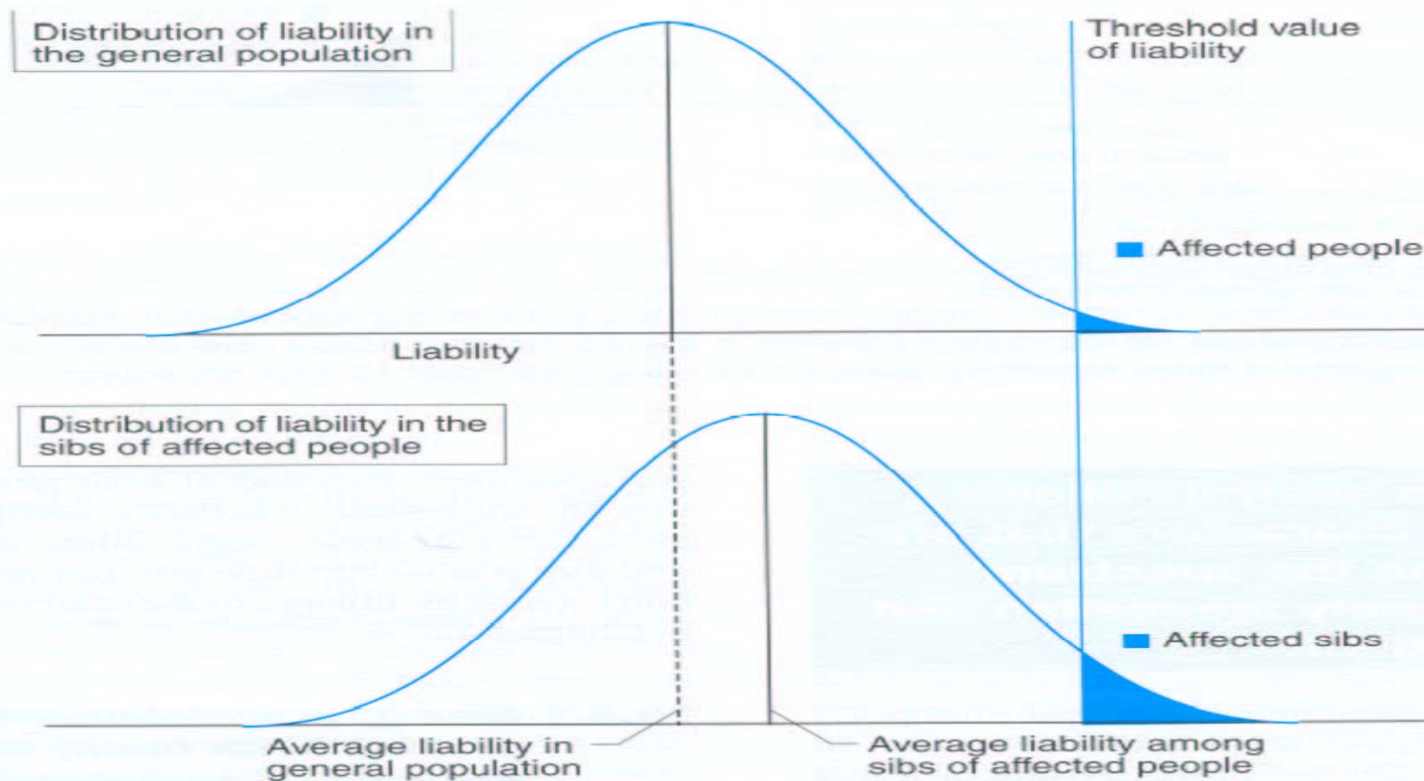
# Polygenní model

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

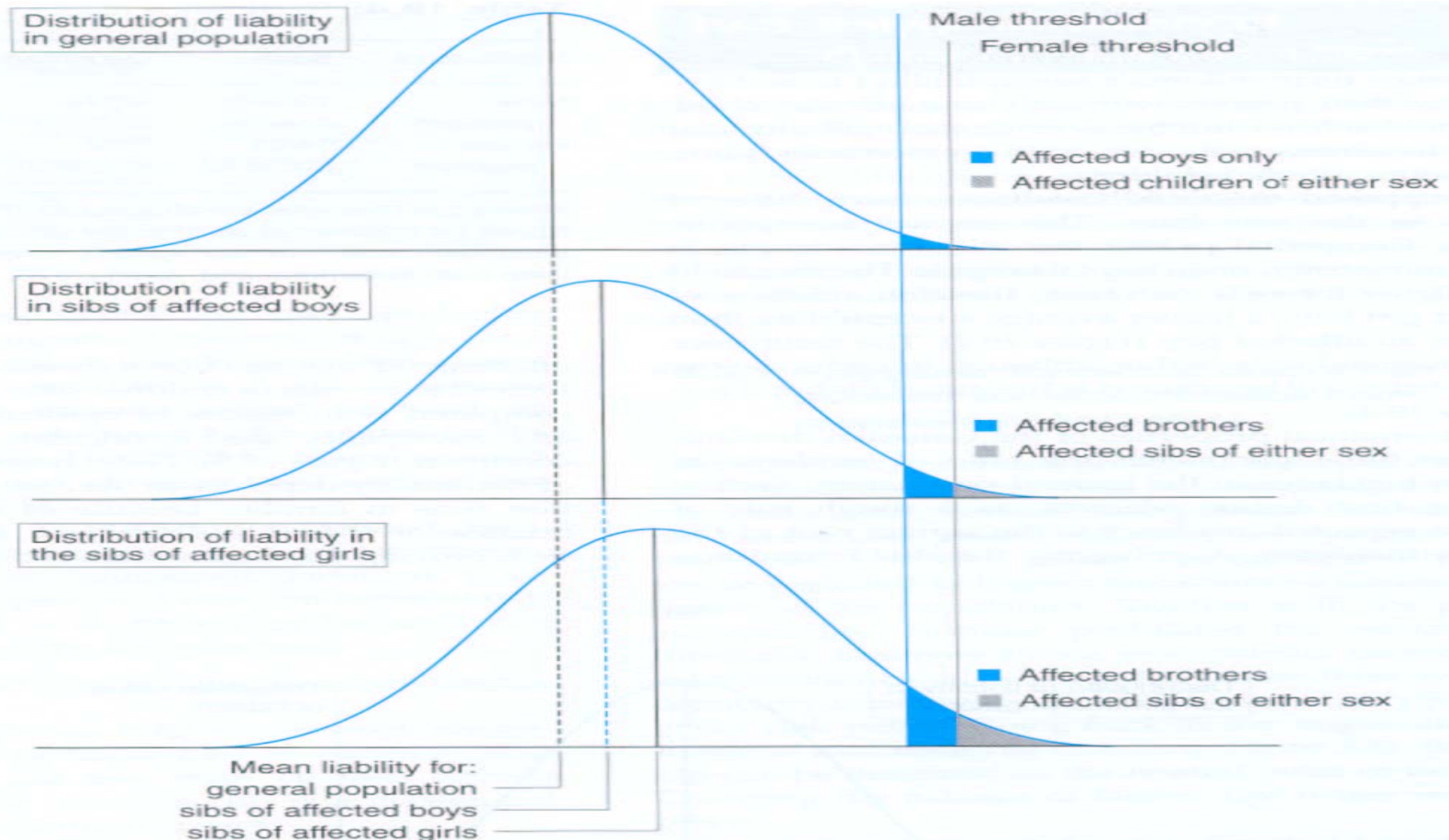


# Prahový model

- 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:

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

# Familiární výskyt nemocí

## Familiární agregace

- Je charakteristikou nemocí s komplexní dědičností, protože příbuzní sdílejí větší podíl genů navzájem mezi sebou než s nepříbuznými osobami
- Obráceně to platit nemusí – FA neznamena, že se na chorobě musí podílet dědičnost
  - ⇒ rodina nesdílí jenom stejné geny, ale i vnější prostředí, kulturní návyky, vzorce chování apod.
- Nutno **posoudit podíl genetických a negenetických faktorů**





# Konkordance a diskordance

- Mají-li 2 příbuzní jedinci v rodině stejnou nemoc – **konkordantní**
- Je-li jeden postižený a druhý ne – **diskordantní**
  - ⇒ lze vysvětlit jiným vlivem dalších faktorů nutných k nastartování patologického procesu
- Naopak – konkordantní fenotyp může vzniknout i při rozdílných predisponujících genotypech
  - ⇒ nemoc u jednoho z nich je **genokopíí** nebo **fenokopíí** druhého

# Konkordance a sdílení alel mezi příbuznými

- Čím blíže jsou si 2 rodinní příslušníci, tím více alel zděděných od společných předků mají totožných
  - Pokud geny přispívají ke vzniku onemocnění významně, stoupá konkordance pro dané onemocnění s rostoucím stupněm příbuznosti
    - extrémní případ: MZ dvojčata
    - příbuzní 1. řádu: rodič + dítě (společná 1 alela s každým z rodičů)  
pár sourozenců vč. fraternálních (DZ) (25% má stejnou dvojici alel nebo žádnou alelu, 50% má stejnou 1 alelu)
- ⇒ s každým lokusem je tedy průměrný počet mezi sourozenci sdílených alel  
 $0,25 (2 \text{ alely}) + 0,5 (1 \text{ alela}) + 0,25 (\text{alel}) = 1 \text{ alela}$

- Pokud tedy geny k nemoci predisponují, lze očekávat, že  $\lambda_r$  bude nejvyšší pro MZ dvojčata, nižší pro příbuzné 1. stupně a dále klesá úměrně počtu sdílených alel

Vztah k probandovi	Podíl s probandem sdílených alel
Monozygotická dvojčata	1
Příbuzní prvního stupně	1/2
Příbuzní druhého stupně	1/4
Příbuzní třetího stupně	1/8

## Podíl relativního rizika ( $\lambda_r$ )

⇒ vyjadřuje, kolikrát vyšší pravděpodobnosti onemocnění čelí definovaný příbuzný nemocného jedince ve srovnání s obecným rizikem populace

$$\lambda_r = \frac{\text{prevalence nemoci u příbuzných „r“ postižené osoby}}{\text{prevalence nemoci v populaci}}$$

r – znamená obecně příbuzný („relative“), v praxi se měří např.  $\lambda_s$  („sibs“),  $\lambda_p$  („parents“)

## Podíly relativního rizika $\lambda_r$ příbuzných probandů s vybraným onemocněním

- Čím vyšší je hodnota  $\lambda$ , tím větší je familiární agregace a tím snažší je genetická analýza daného komplexního znaku.
- Hodnota  $\lambda_r = 1$  znamená, že příbuzný nemá větší pravděpodobnost vzniku nemoci než kterýkoliv jedinec v populaci

Onemocnění	Vztah	$\lambda_r$
Schizofrenie	MZ dvojčata	48
	Sourozenci	12
Autismus	MZ dvojčata	2000
	Sourozenci	150
Manio-depresivní (bipolární) porucha	MZ dvojčata	60
	Sourozenci	7
Diabetes mellitus I. typu	MZ dvojčata	80
	Sourozenci	12
Crohnova choroba	MZ dvojčata	840
	Sourozenci	25
Roztroušená skleróza	MZ dvojčata	800
	Sourozenci	24

MZ = monozygotická

Údaje upraveny a převzaty z Rimoin DL, Connor JM. Pyeritz RE. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics, 3. vyd., Edinburgh, Churchill Livingstone 1997; a King RA, Rotter JI, Motulsky AG. The Genetic Basis of Common Diseases. Oxford, England, Oxford University Press 1992.

# Studie dvojčat

- „experiment přírody na lidech“
- 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

- **Výhody:** umožňují abstrahovat od variability prostředí

# Porovnání konkordance u MZ a DZ dvojčat

- **Vyšší konkordance u MZ dvojčat** oproti DZ dvojčatům je silným argumentem pro přítomnost **genetických faktorů** (zejména u onemocnění s časným výskytem)

Onemocnění	Konkordance (%)	
	MZ	DZ
Netraumatická epilepsie	70	6
Roztroušená skleróza	17,8	2
Diabetes mellitus 1. typu	40	4,8
Schizofrenie	53	15
Osteoartróza	32	16
Revmatoidní artritida	12,3	3,5
Psoriáza	72	15
Rozštěp rtu s/bez rozštěpu patra	30	5
Systémový lupus erythematodes	22	0

Údaje převzaty a upraveny z Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics, 3. vyd., Edinburgh, Churchill Livingstone 1997; a King RA, Rotter JL, Motulsky AG The Genetic Basis of Common Diseases. Oxford, England, Oxford University Press 1992; Tsuang MT. Recent advances in genetic research on schizophrenia. J Biomed Sci 1998;5:28-30.

# Omezení studií dvojčat

- MZ dvojčata i přes totožný genotyp **nemají stejnou genovou expresi** (např. náhodná X-inaktivace u žen)
- Ve skupinách lymfocytů se MZ budou lišit díky **somatickým chromozomálním přestavbám** v lokusech pro Ig a T-buněčný receptor
- **Nitroděložní prostředí** nemusí být pro obě stejné
- **Expozice faktorům zevního prostředí** nemusí být stejná (zejména u chorob s pozdní manifestací)
- Posun zjištění – 1 postižené dvojče přivede 2. (volunter based ascertainment = zjištění na základě dobrovolnosti) místo toho, aby byla nejprve zjištěna jako dvojčata a pak vyšetřena (population based ascertainment)



# 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

# Odhad heritability ze studií dvojčat

- Rozptyl hodnot fyziologických měření u množiny párů MZ dvojčat (100% genů) je porovnán s rozptylem hodnot měření u dvojic DZ dvojčat (50% genů)

rozptyl u DZ dvojčat – rozptyl u MZ dvojčat

$$h^2 = \frac{\text{rozptyl u DZ dvojčat} - \text{rozptyl u MZ dvojčat}}{\text{rozptyl u DZ dvojčat}}$$

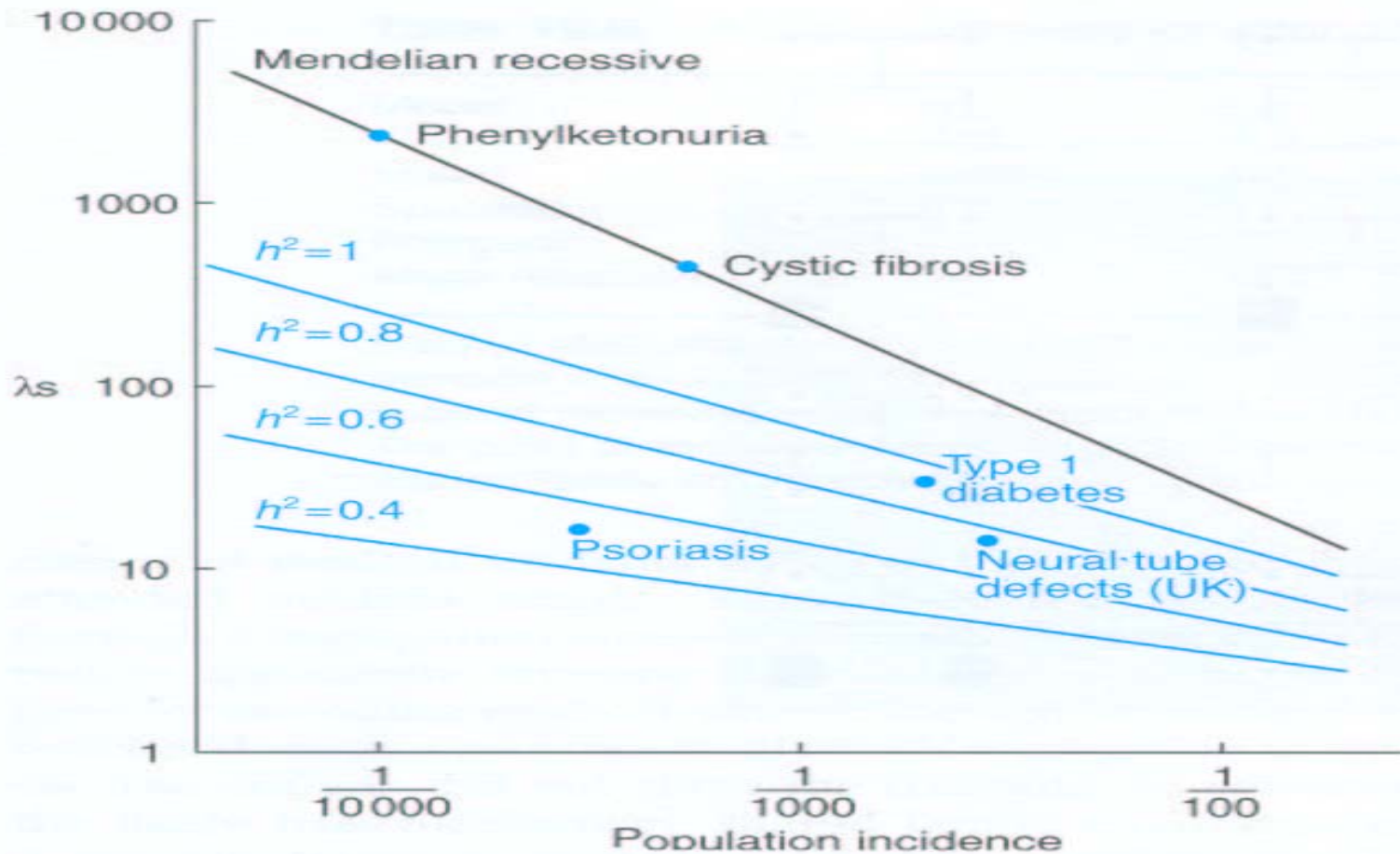
rozptyl u DZ dvojčat

- Je-li variabilita znaku určena zejména prostředím, je rozptyl u DZ dvojčat blízký rozptylu u MZ a čítec a tím i hodnota  $h^2$  se bude blížit 0.
- Pokud je variabilita dána pouze genetickým složením, rozptyl u MZ dvojčat je nulový a  $h^2$  je rovno 1.

# Heritabilita běžných komplexních nemocí (znaků)

<b>Astma</b>	<b>60 %</b>
<b>Krevní tlak</b>	<b>40-70%</b>
<b>Kostní denzita</b>	<b>60-80%</b>
<b>Degenerace plotének</b>	<b>60-80%</b>
<b>IDDM</b>	<b>70%</b>
<b>Obezita</b>	<b>50-90%</b>
<b>Osteoartritida</b>	<b>50-70%</b>
<b>Revmatoidní artritida</b>	<b>60%</b>
<b>Ulcerativní kolitida</b>	<b>50%</b>

# Vztah mezi incidencí v populaci a incidencí u příbuzných postižených osob



# 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

+

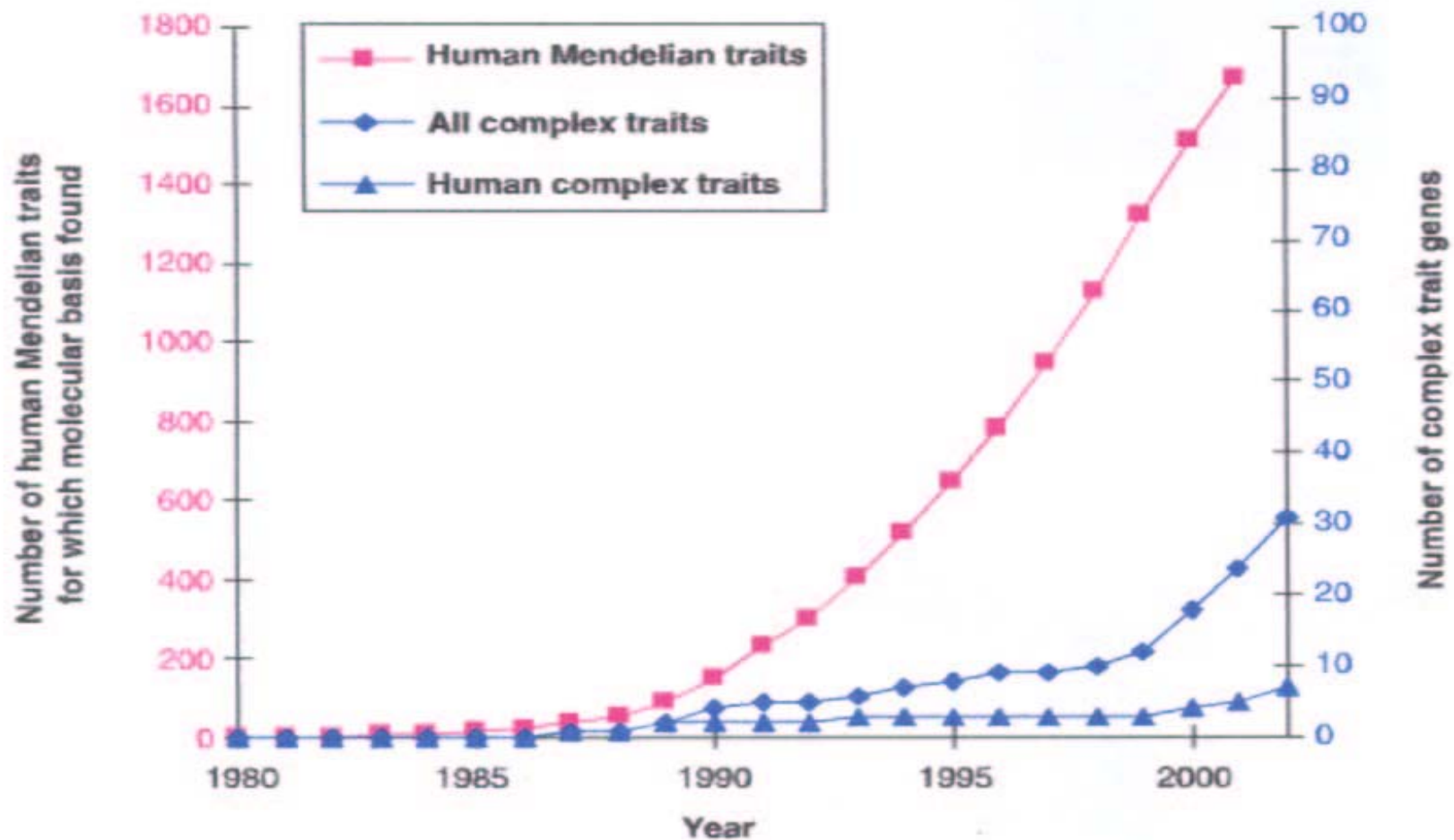
Genet. faktory

+

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

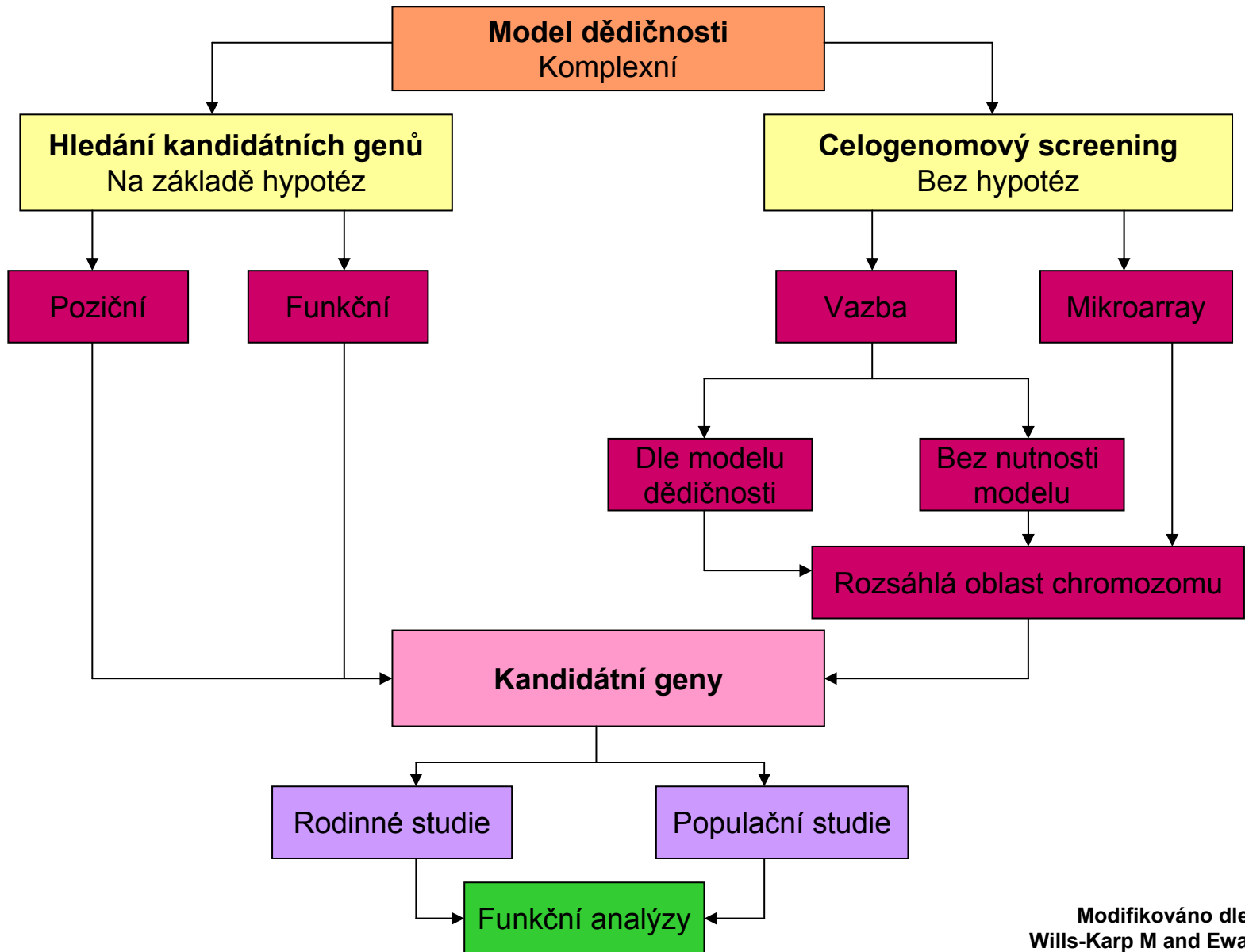


# Molekulární základ komplexních nemocí u člověka

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

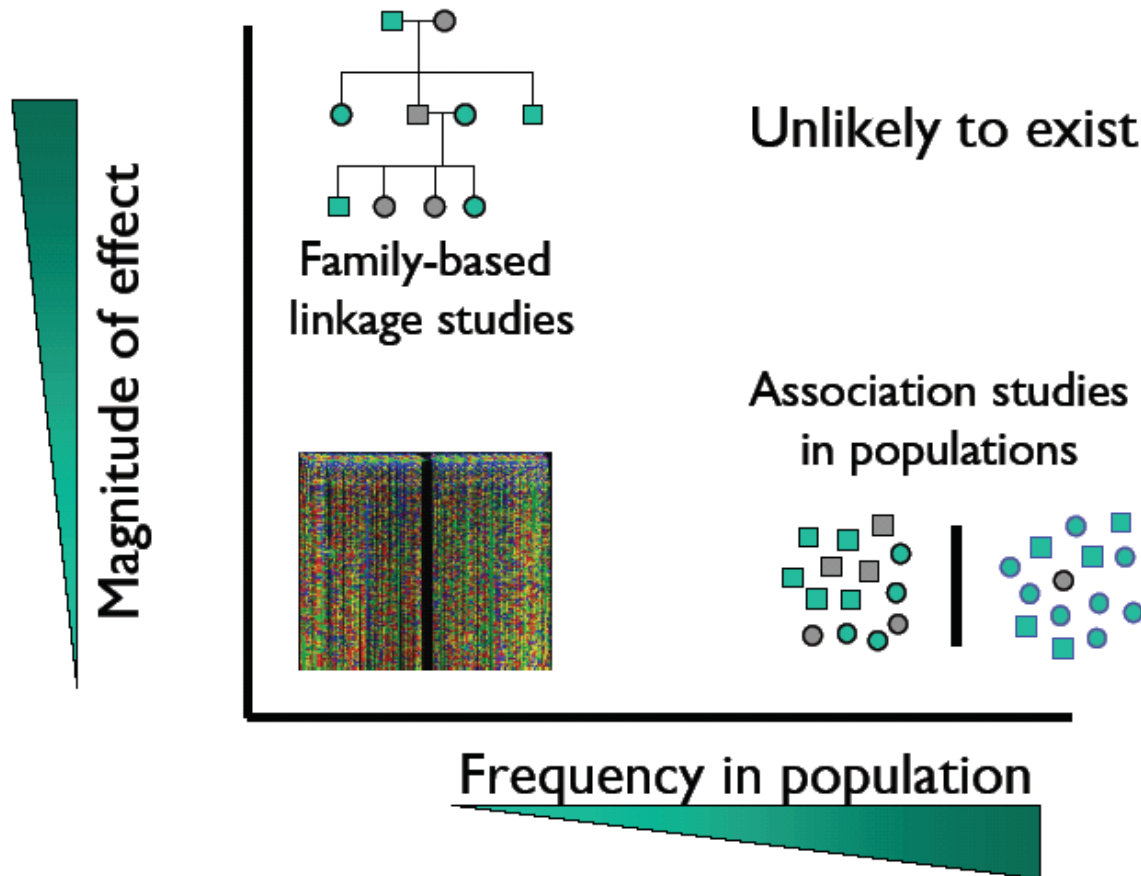


# Metodologie genetického výzkumu komplexních nemocí



# Allelic architecture and mapping strategy

---



# Metodologie genetického mapování komplexních znaků (nemocí)

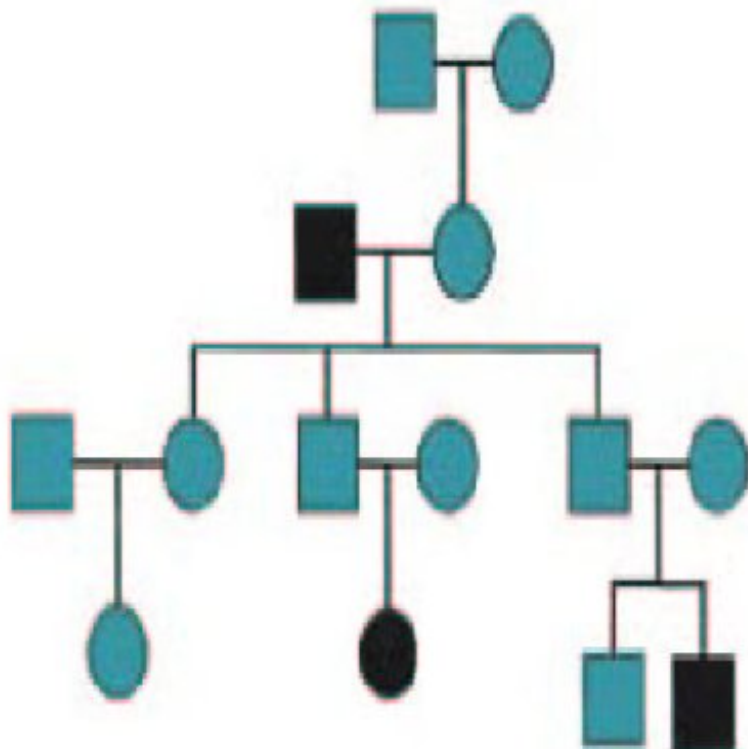
- Studie na modelových organizmech
- **Vazebné studie** – parametrické  
↘ neparametrické  
TDT analýza
- **Asociační studie** – retrospektivní („case-control“)  
↘ prospektivní

Celogenomová analýza x studium jednoho (několika) polymorfizmů

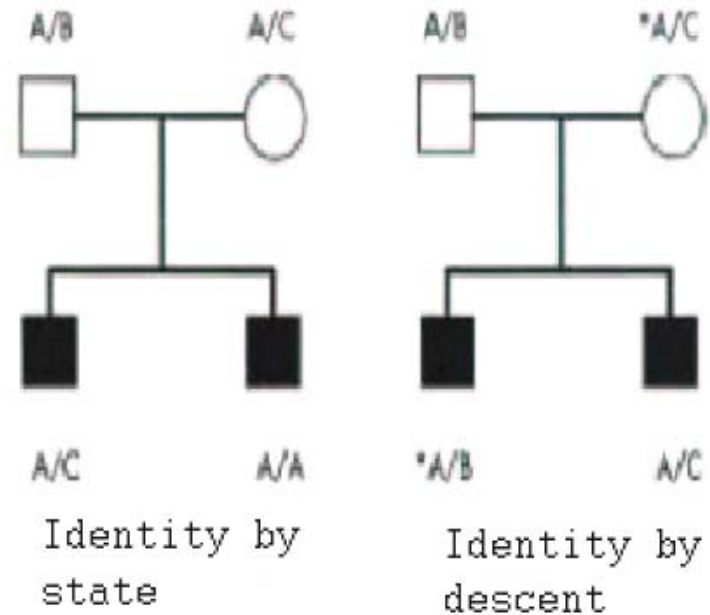
# Vazebné studie (linkage studies)

parametrické                      neparametrické

Klasická vazebná analýza v rodinách



**Sdílení alel**  
(např. sib pair metod)



# LOD skóre

- **Statistická metoda vyhodnocující genetické markery v rodinách** s cílem určit, zda jsou 2 lokusy vázány. Lod skóre je logaritmus šance (odds), že tato vazba existuje.
- **Konvenčně je LOD skóre 3** (šance 1000:1 ve prospěch existence vazby) přijímáno jako **důkaz vazby** a lod skóre – (minus) 2 (100:1 proti) jako důkaz, že lokusy nejsou vázány.

# LOD Score Analysis

The likelihood ratio as defined by Morton (1955):

$$\frac{L(\text{pedigree}|\theta = x)}{L(\text{pedigree} | \theta = 0.50)}$$

where  $\theta$  represents the recombination fraction and where  $0 \leq x \leq 0.49$ .

---

When all meioses are “scorable”, the LR is constructed as:

$$\text{L.R.} = \frac{(\theta^R (1-\theta)^{NR})}{(\theta = 0.5)^N}$$

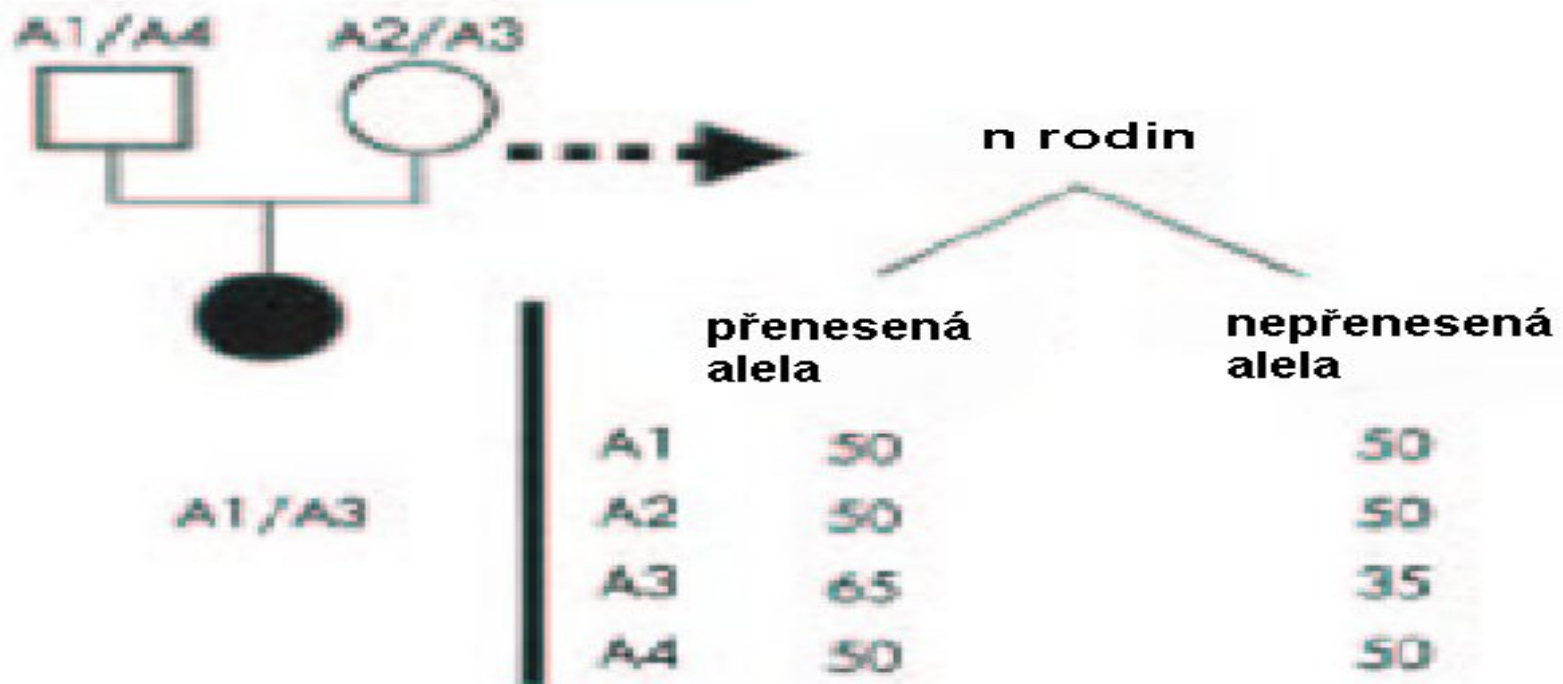
$z(\theta)$  is the lod score at a particular value of the recombination fraction

$z(\theta)$  is the maximum lod score, which occurs at the MLE of the recombination fraction

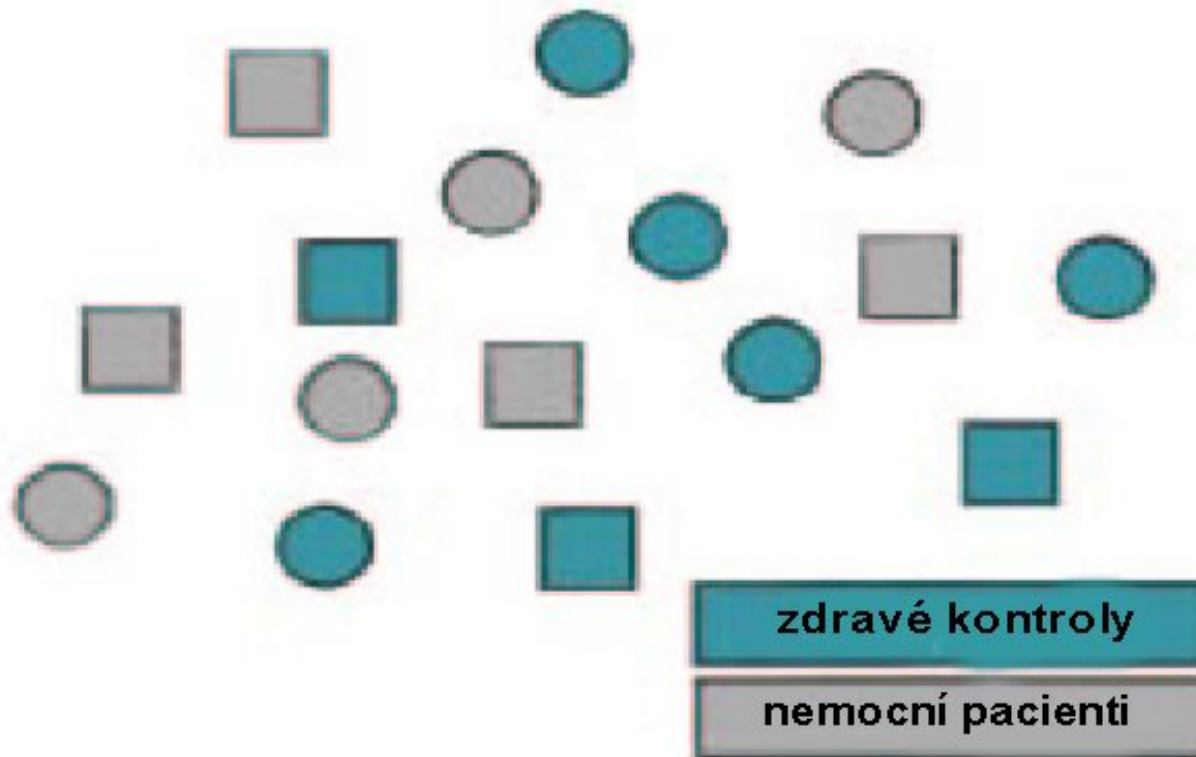
The LOD score ( $z$ ) is the  $\log_{10}$  (L.R.)

# TDT analýza (transmission disequilibrium test)

## TDT test



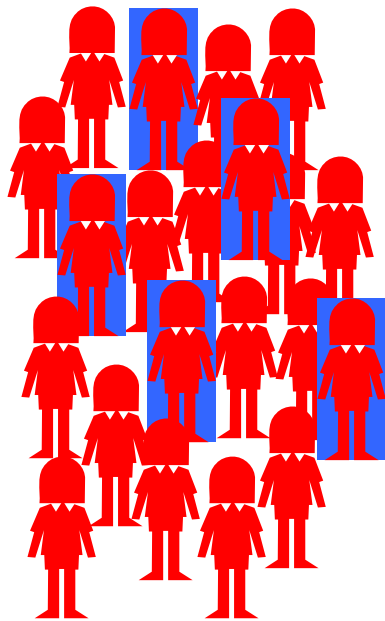
## Asociační studie





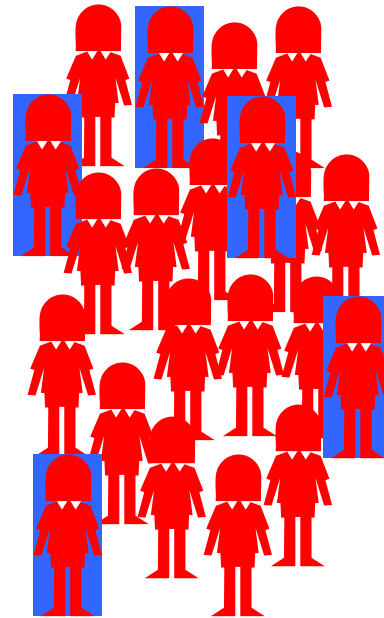
# Analýza kandidátních genů

**Pacienti**



**5/20**

**Kontroly**

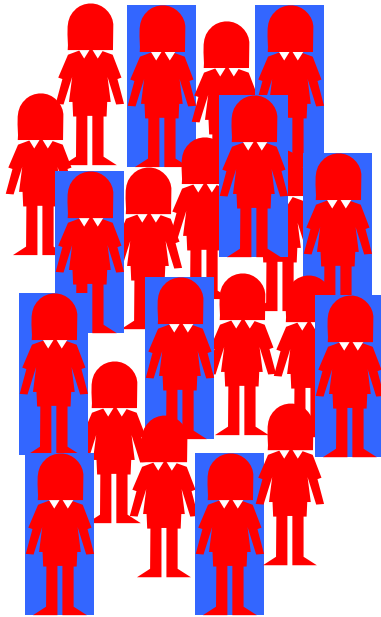


**5/20**

**Gen není důležitý**

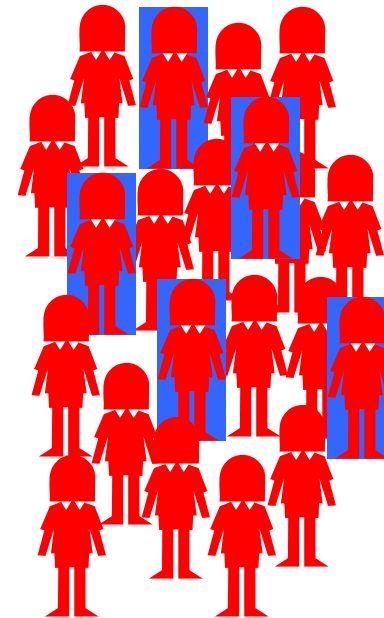
# Analýza kandidátních genů

**Pacienti**



**10/20**

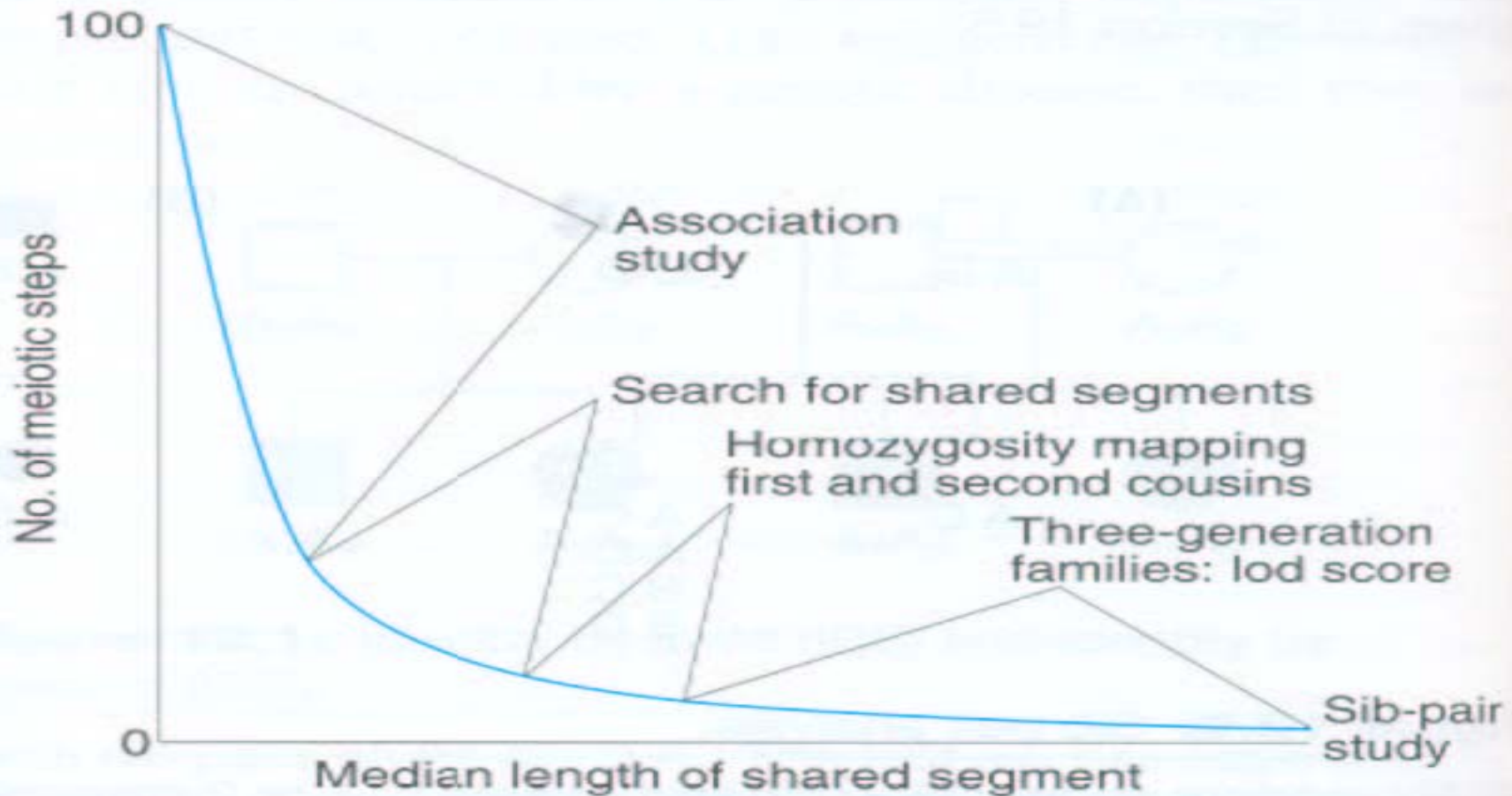
**Kontroly**



**5/20**

**Gen může být důležitý**

## 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**

- **Posun zjištění (ascertainment bias)**

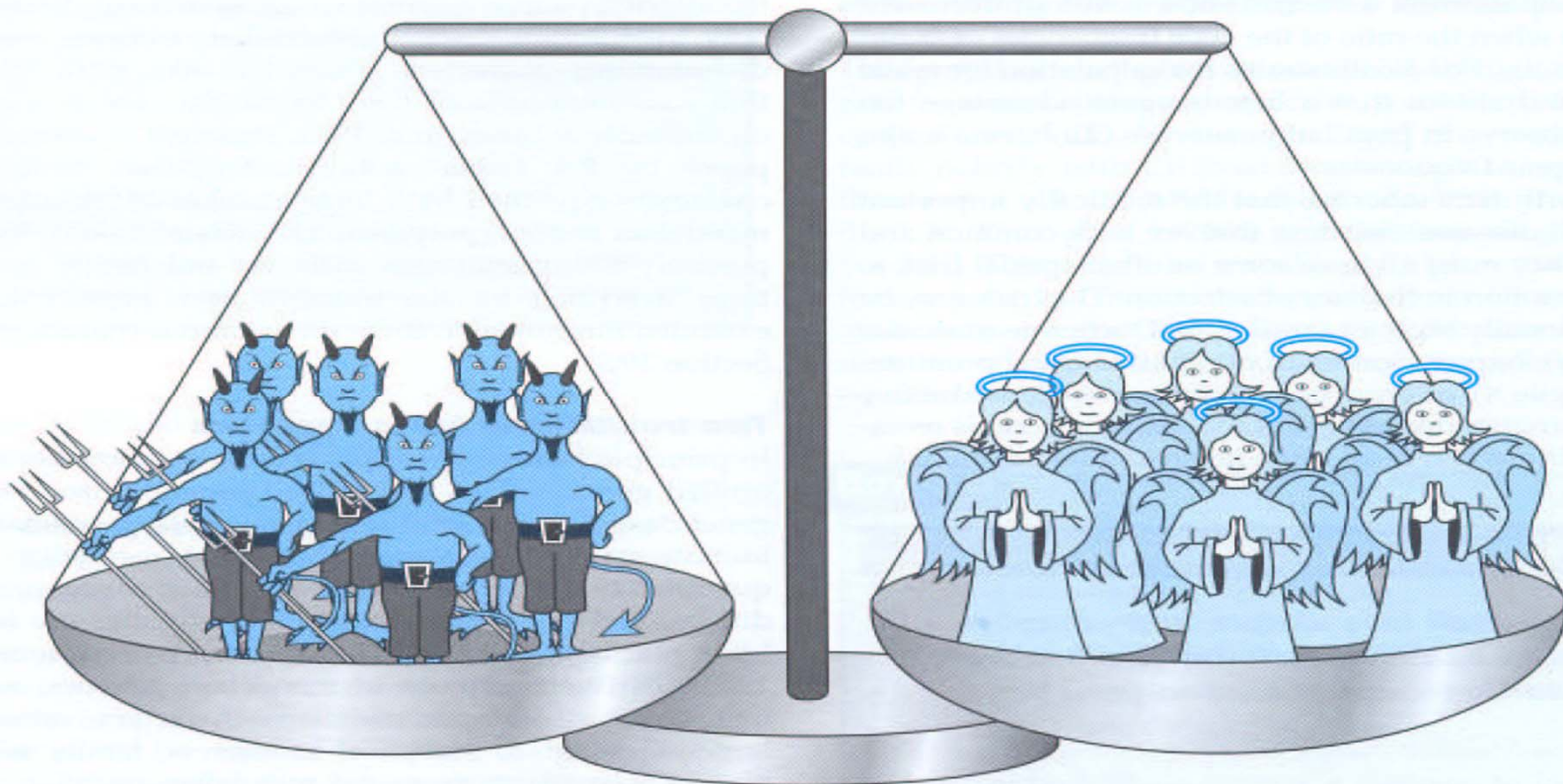
- tj. rozdíl v pravděpodobnosti, s jakou budou nahlášeni postižení příbuzní pacientů ve srovnání s postiženými příbuznými kontrol

- **Posun hlášení (recall bias)**

- větší motivace příbuzných probanda k vyplnění dotazníku, protože je jim dané onemocnění bližší

# Problematika studia komplexních nemocí

**Polygennost** → více faktorů - tzv. „malé“ faktory



# Heterogenita (klinického fenotypu - genetická – populační)

	Allelic heterogeneity	Locus heterogeneity	Phenocopy
<b>Definition</b>	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
<b>Diagram</b>			
	Trait heterogeneity	Phenotypic variability	
<b>Definition</b>	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	
<b>Diagram</b>			



# Interakce faktorů

	Gene-gene interaction	Gene-environment interaction
<b>Definition</b>	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
<b>Diagram</b>	<p>Allelic variant I of locus A</p> <p>Allelic variant II of locus B</p> <p>No disease</p> <p>Disease X</p>	<p>Allelic variant I of locus A</p> <p>Environmental factor K</p> <p>No disease</p> <p>Disease X</p>

## **Genokopie**

**Genotyp determinující velmi podobný fenotyp determinovaný odlišným genotypem**

## **Fenokopie**

**Fenotyp, který je obvykle podmíněn specifickým genotypem, je u fenokopie podmíněn interakcí nějakého faktoru zevního prostředí s normálním fenotypem**

## **Inkompletní penetrance**

**zděděné příslušné sady patologických alel ještě nemusí nutně vést ke klinicky manifestnímu onemocnění**

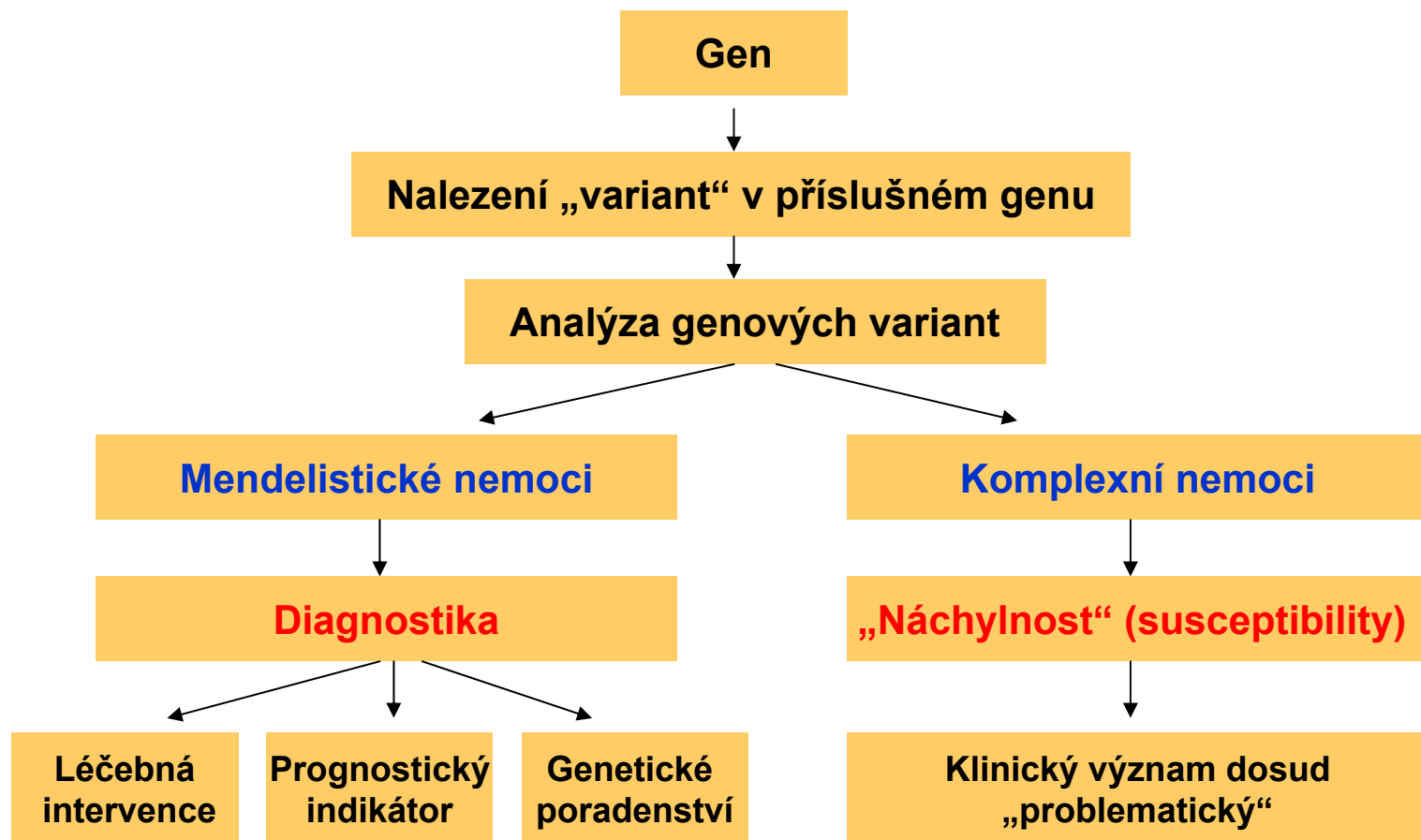
## **Pleiotropie**

**Mnohočetné fenotypové efekty jednoho genu nebo jednoho páru genů**

## **Imprinting**

**modifikace maternálních a paternálních genů během gametogeneze tak, že mají odlišnou expresi v zygotě (fenomén odlišné exprese alel v závislosti na rodičovském příspěvku)**

# 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

# Síla asociace

- Síla asociace je vyjádřena **podílem nadějí (odds ratio)** vypočítaným z frekvence dané alely u pacientů a kontrol

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

- Je-li frekvence studované alely shodná u pacientů i kontrol, je podíl nadějí = 1

		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

- Jinou, ale podobnou mírou asociace je vyjádření **relativního rizika (RR)**, které porovnává riziko vzniku nemoci při nosičství určité alely s rizikem bez nosičství této alely

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

- U vzácných onemocnění se přibližně rovná i podílu nadějí  
( $b < d$  a  $a < c$ )

		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

# 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**

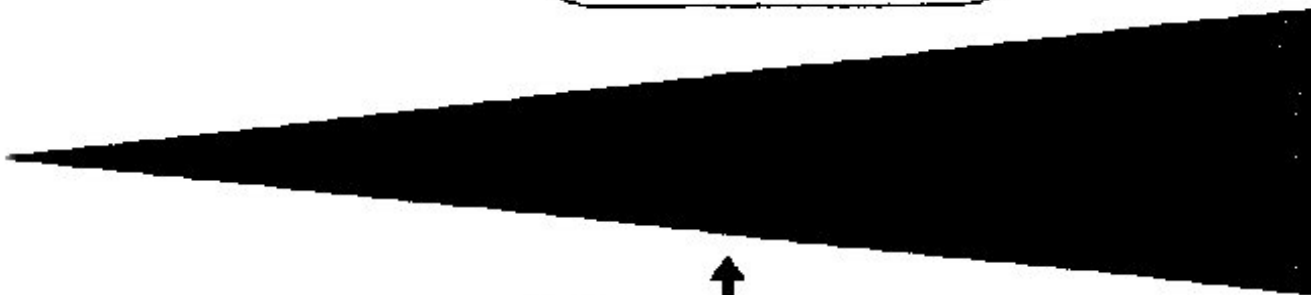
**PROSTŘEDÍ**

Alergeny  
Viry  
Polutanty



**ASTMA**

**Mírné**



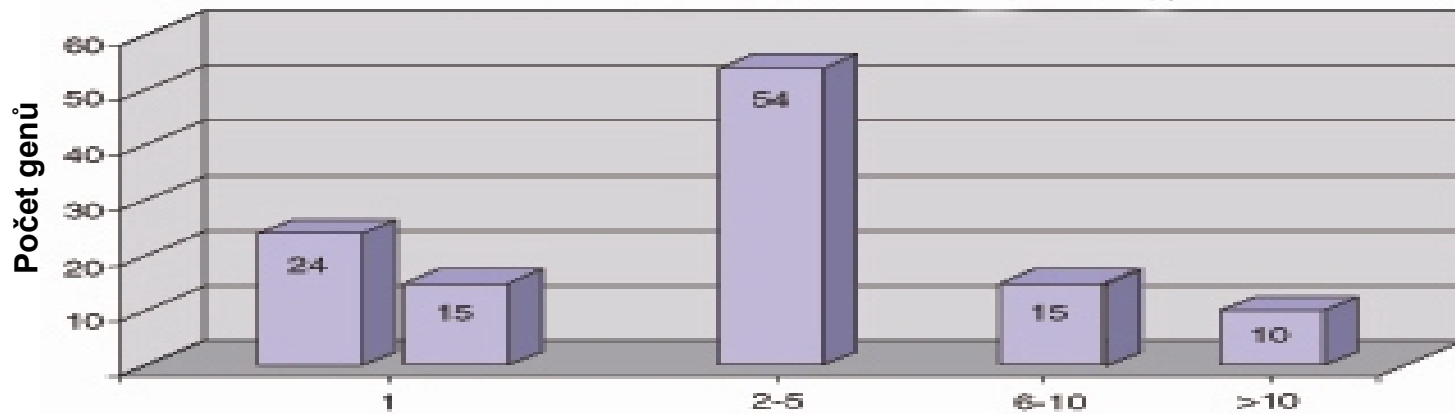
**Závažné**



**GENY  
PROSTŘEDÍ**



# Genetika astmatu 2006



Počet studií s pozitivními asociacemi

CHIA (0)  
 VCAM1 (0)  
 CLCA1 (0)  
 DAP (3)  
 SELP (0)  
 CHRM3 (0)  
 ST2 (0)  
 ICOS (0)  
 IL8RA (0)  
 MUC7 (0)  
 PGDS (0)  
 IL15 (0)  
 IRF2 (0)  
 IRF1 (0)  
 IL3 (0)  
 CYFIP2 (0)  
 SDF1 (0)  
 C3AR1 (0)  
 PTGER2 (0)  
 AACT (0)  
 IL12RB1 (0)  
 SSCE (0)  
 TIMP1 (0)  
 CXCR3 (0)

COX2 (1)  
 AGT (1)  
 HMNT (3)  
 STAT4 (1)  
 CCR3 (2)  
 TLR9 (3)  
 IL8 (1)  
 EDNRA (1)  
 UGRP1 (3)  
 EDN1 (1)  
 IKAP (2)  
 FLAP (2)  
 MCP1 (3)  
 IFNGR2 (1)  
 IL13RA1 (1)

KCNS33  
 ACP1  
 IL1RN  
 IL1A  
 IL1B  
 DPP10  
 CCR5  
 IL5RA  
 TLR6  
 TLR10  
 TLR2  
 CSF2  
 IL5  
 IL12B  
 TIM1  
 TM3  
 HLA-G  
 HLA-DQA1  
 HLA-DPB1  
 TAP1  
 PAFAH  
 EDN1  
 IFNGR1  
 CCL24  
 CCL26  
 CFTR  
 NOS3

NAT2  
 DEFB1  
 TLR4  
 C5  
 GATA3  
 ALOX5  
 CRTH2  
 IL18  
 AICDA  
 VDR  
 IFNG  
 PHF11  
 CYSLTR2  
 TCRA/D  
 CMA1  
 PTGDR  
 CARD15  
 NOS2A  
 CRHR1  
 CCL11  
 TBX21  
 STAT3  
 ITGB3  
 ACE  
 C3  
 GSTT1  
 MIF

GSTM1  
 IL10  
 CTLA4  
 SPINK5  
 LTC4S  
 LTA  
 GRPA  
 NOD1  
 CC16  
 GSTP1  
 STAT6  
 NOS1  
 CCL5  
 TBXA2R  
 TGFB1

IL4  
 IL13  
 CD14  
 ADRB2  
 HLA-DRB1  
 HLA-DQB1  
 TNF  
 FCER1B  
 IL4RA  
 ADAM33

# Celogenomové analýzy u alergických nemocí

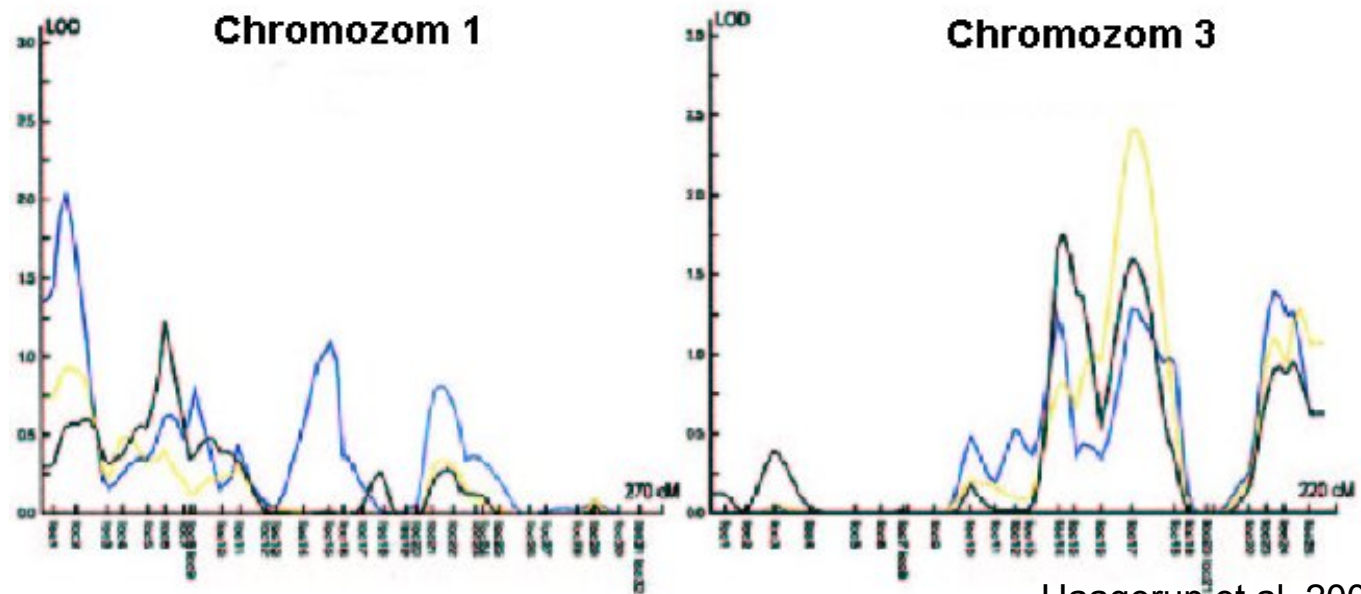
- dosud 12 celogenomových studií  
(<http://cooke.gsf.de/asthmagen>)
- Detekce oblastí chromozomů s možnou vazbou na výskyt alergických chorob nebo intermediárních znaků (IgE, eosinofily, kožní testy apod.)
- celogenomová signifikance – vzácná, většinou „podezřelé“ oblasti
- některé výsledky se opakují,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

# Oblasti chromozomů „podezřelé“ z účasti na genetice astmatu

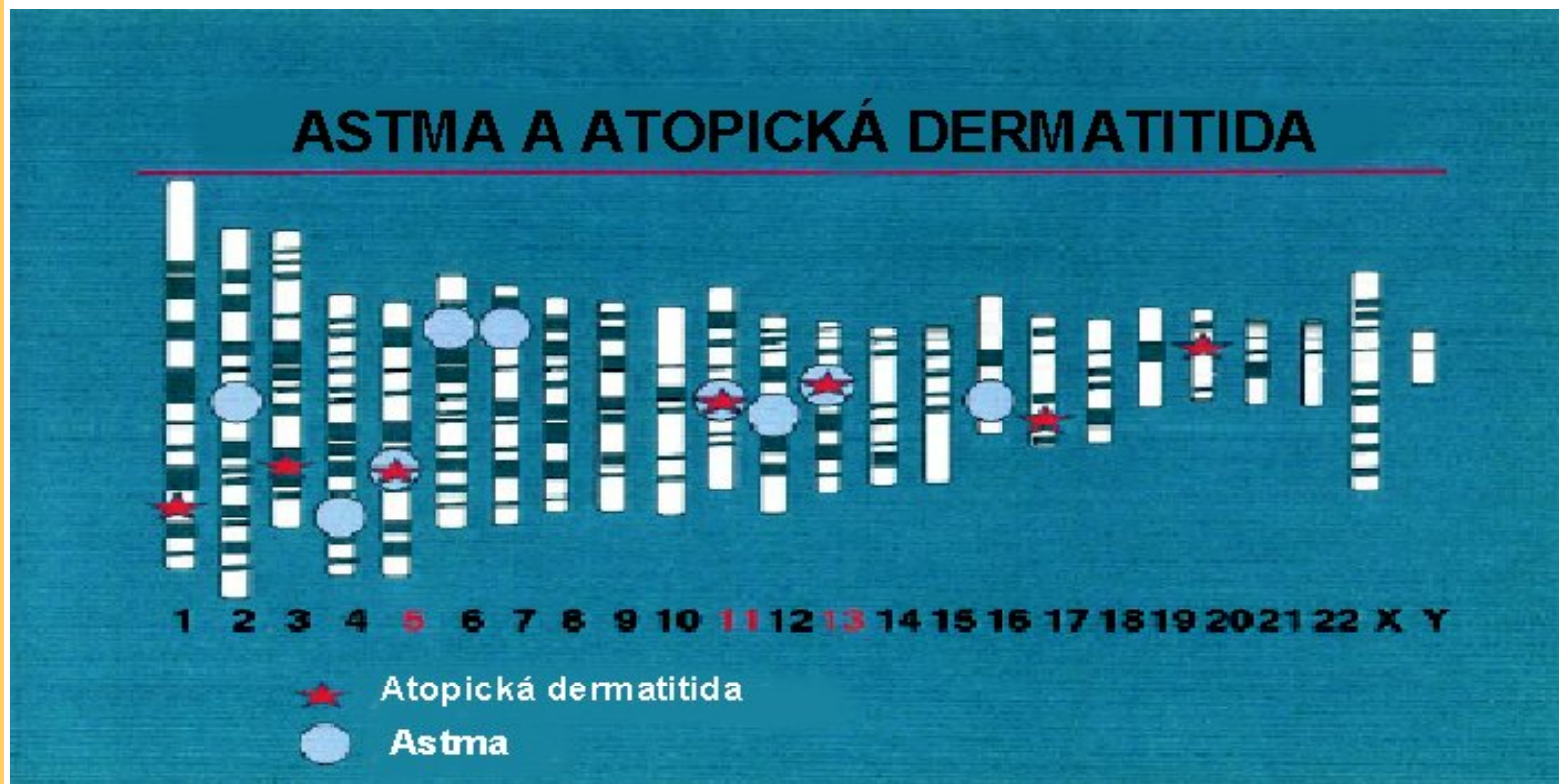
## Cytogenetický lokus

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



# 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-dependentní 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**

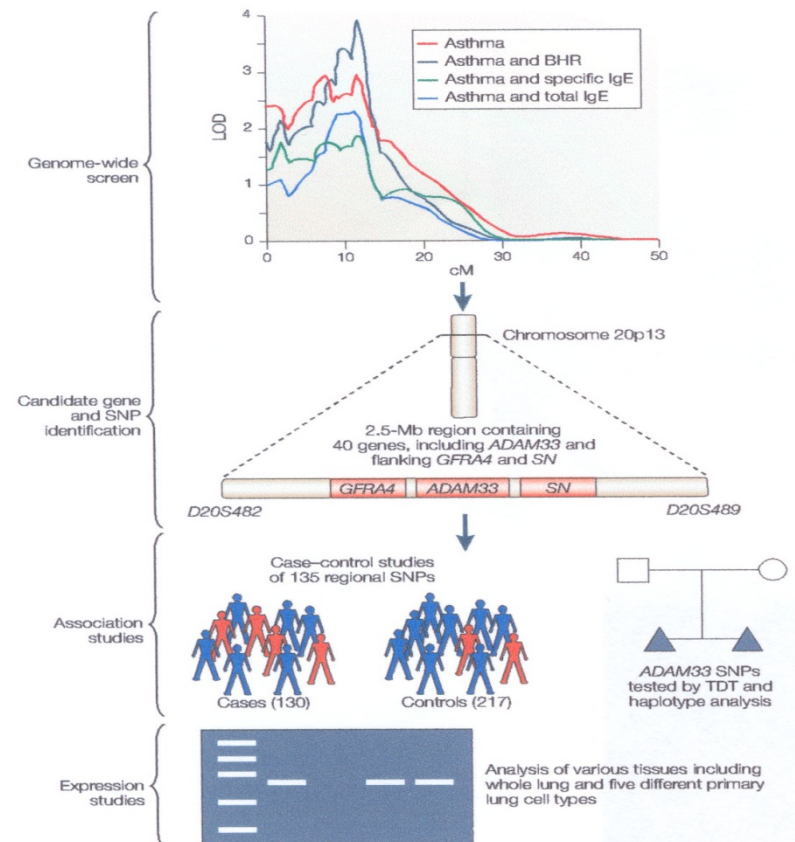


TABLE II. Asthma-related phenotypes associated with SNPs in *ADAM33*

Population	Phenotype	S1 (V→I)	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

## ( **P**lant **H**omodomain (PHD) **F**inger protein-11)

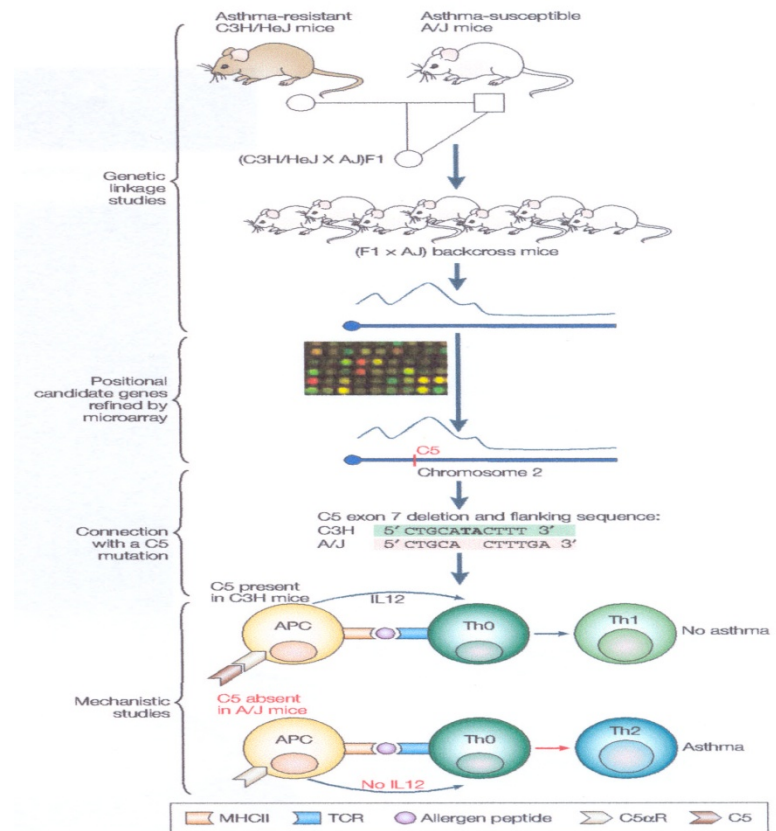
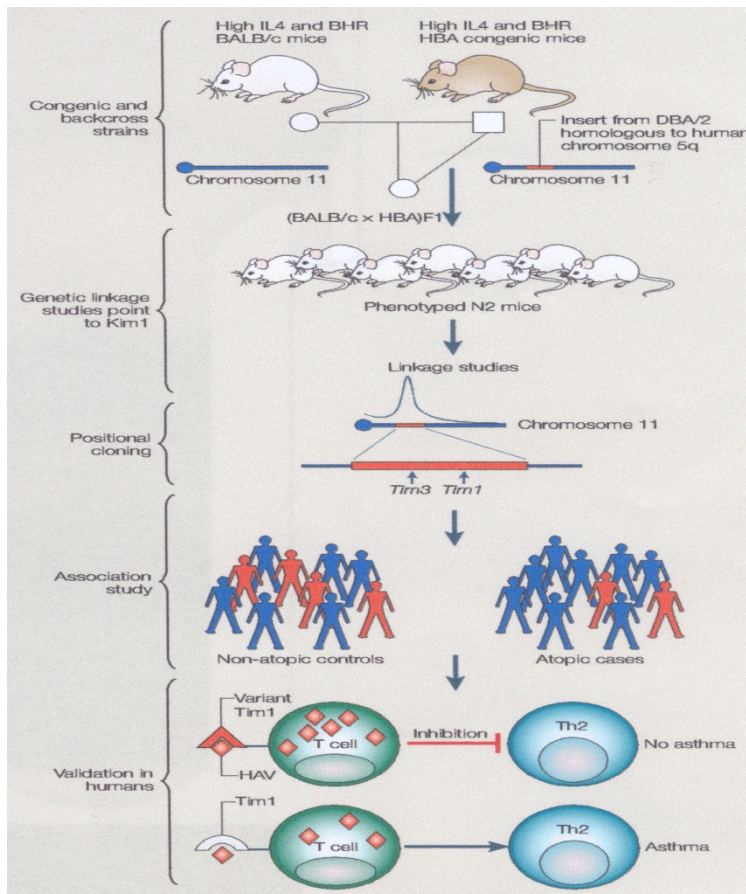
- Cookson et al. (2003) identifikovali PHF11 na chromozomu 13q  
↓  
podobným přístupem jako u DPP10
- 49 SNP, 4 del/ins a (GGGC) repetice → 3 (intron 5, 9 a 3' oblast)  
↓  
asociace s Ln IgE a astmatem
- **Funkce:** - negativní regulace transkripce ?

# Gen pro Tim 1

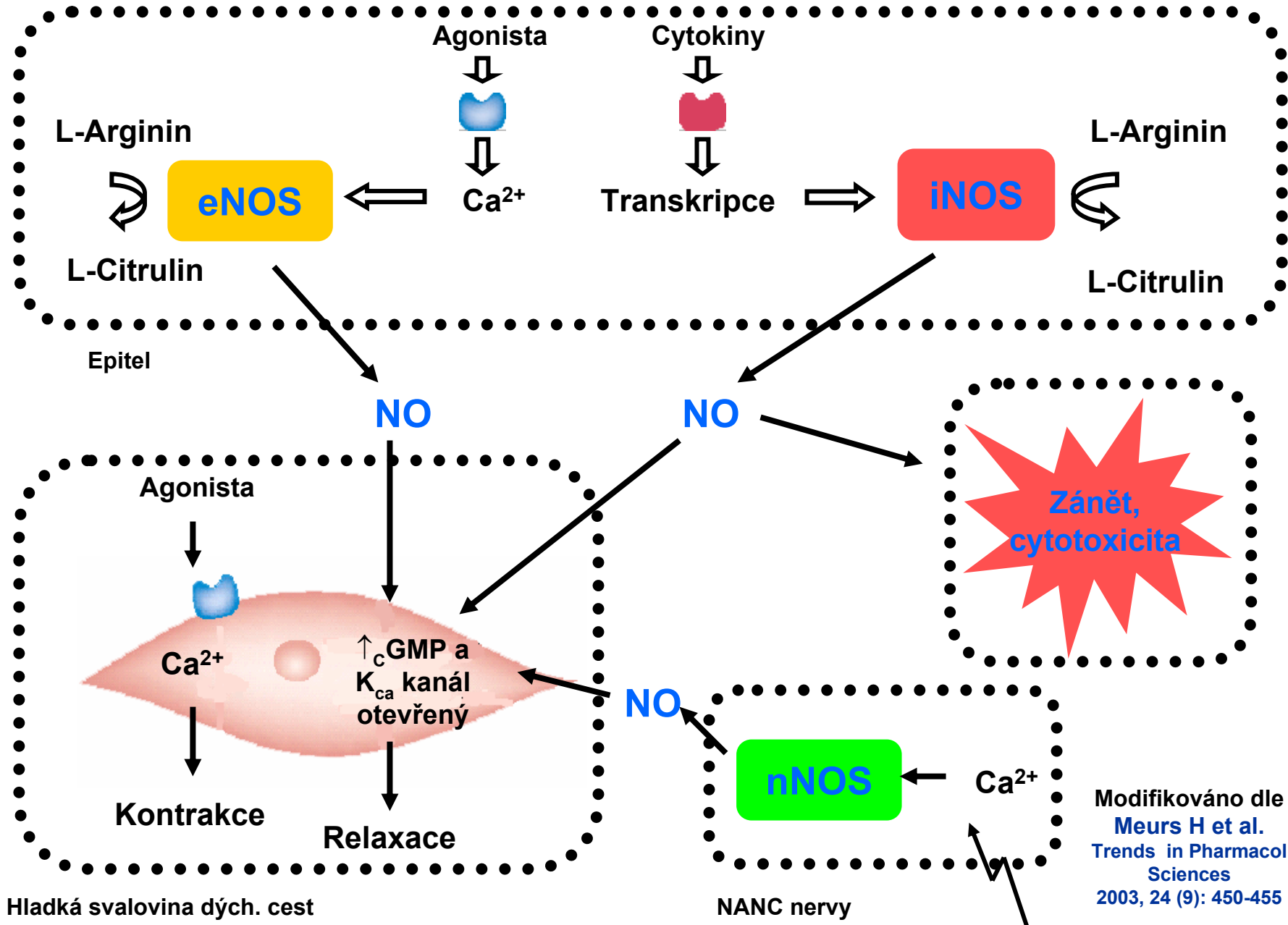
(T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing molecules)

# Gen pro C5

(complement factor 5 gene)

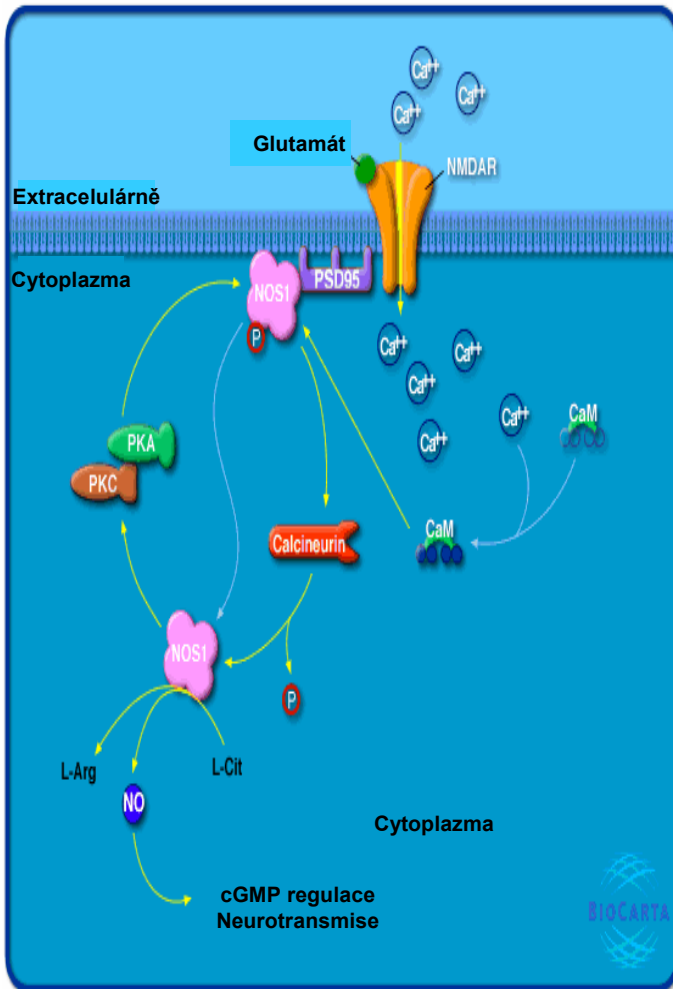


# Oxid dusnatý a NOS



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

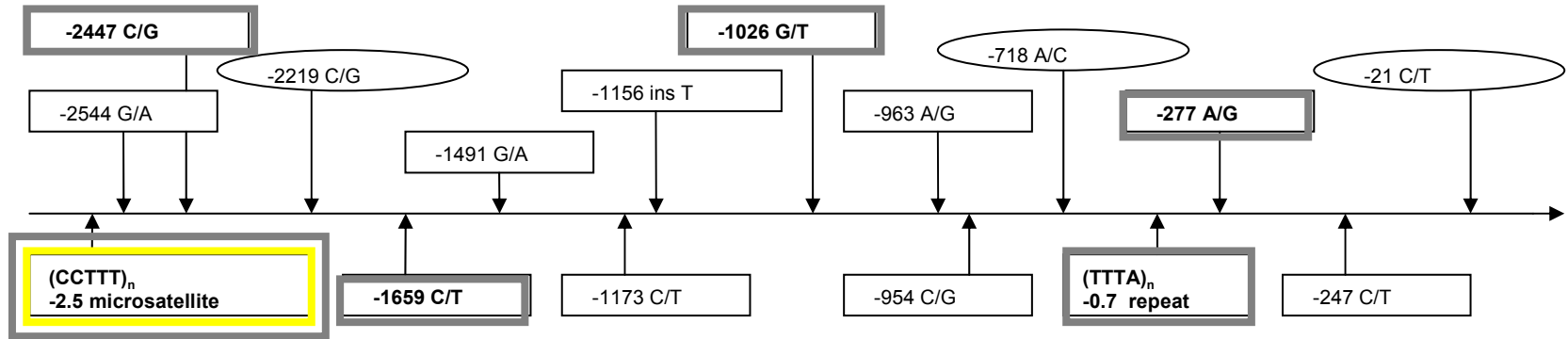
# Gen pro NOS1



- CA repeat (exon 29) s AB (Grasseman et al., 1999)
- CA repeat (exon 29) s AB (Grasseman et al., 2000)
- 3391C/T s početem eozinofilů  
+ 5266C/T s IgE (Immervoll et al., 2001)
- AAT repeat (intron 20) s FE<sub>NO</sub> (Grasseman et al., 2001)
- AAT repeat (intron 20) s atopií (Ali et al., 2001)
- 5266C/T s IgE (Holla LI et al., Allergy 2004)
- GT repeat v intronu 2 s AB (Shao et al., 2004)
- 5266C/T s IgE  
AAT repeat (intron 20) s IgE (Leung et al., 2005)
- NOS1 deficientní myši mají nižší „upregulaci“ NOS2 po LPS (nižší počty eozinofilů, nižší Fe<sub>NO</sub> – Iijima et al., 2005)

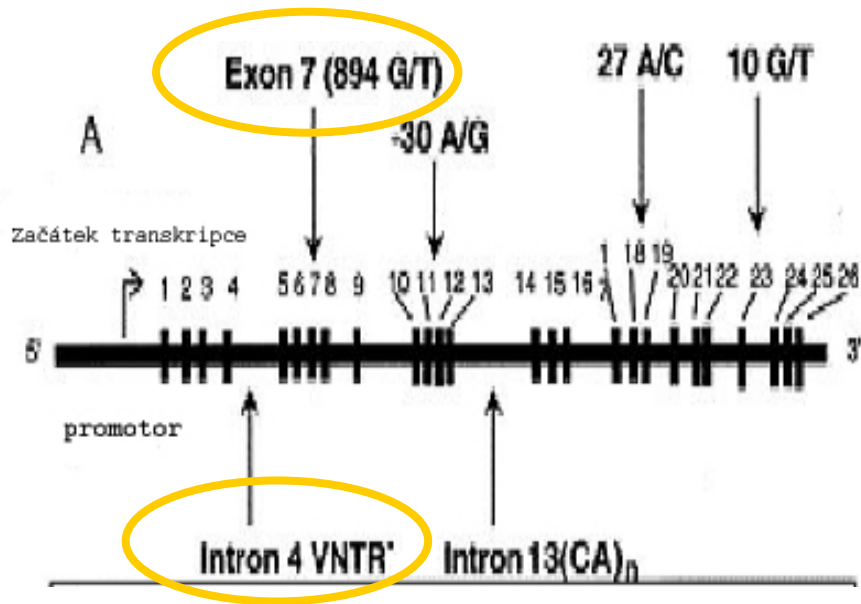
# Gen pro NOS2

## Promotor



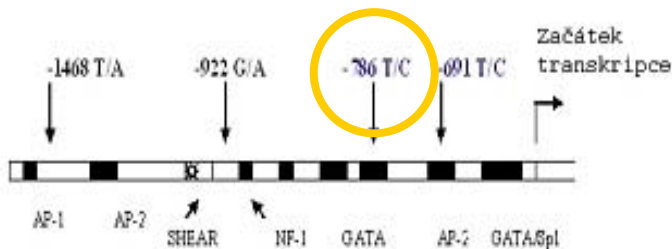
- -2.5 kb (CCTTT)<sub>n</sub> repeat  
(Konno et al., 2001) s atopií a AB  
a
- +231C/T v exonu 10 (Asp346Asp)  
(Grasemann et al., 2000) s atopií
- -1659C/T, -0.7 rep, -277A/G - pozitivita na peří  
a
- Ser608Leu (exon 16) – závažnost astmatu  
(12 vs. 41%, p = 0.0005; OR=5.00, 95% CI: 1.88-13.33)
- -2447C/-1659C/-1026G/-0.7del/-277A/Ser608  
haplotyp - protektivní pro AB

# Gen pro NOS3



- VNTR v intronu 4 s **AB** (Lee et al., 2000)
- VNTR v intronu 4 s IgE + pozitivitou kožních testů (Holla LI et al., CEA 2002)
- VNTR v intronu 4 s terapií u respir. alergií  
alela 4 rep: **8.9%** vs. **31.6%**  
(Schuller et al., Allergy 2002)
- VNTR v intronu 4 s **AB** (Yanamandra et al., 2005)

## Promotor



☞ Estrogen-responzivní element

-786C/T s **AB** u mužů v české populaci  
(Holla et al., Int Arch Allergy 2006)

-786T/-691C/27-bp 5 repeat/774C/894G/11T  
**protektivní pro astma v české populaci**

- ↑ exprese NOS3: ↓ počty lymfo, eozinofilů v BAL  
↓ BHR (Ten Broeke et al., 2006)

# Asociace dalších vybraných komplexních nemocí

**Table 3 • Some polymorphic, moderate to low risk variants**

Disease*	Locus	Change	Frequency	Relative risk
Alzheimer's disease	<i>APOE</i> – <i>APOE4</i>	C112R	0.09–0.22	4.0–15.0
	<i>APOE</i> – <i>APOE2</i>	C158R	0.04–0.08	0.5
Thrombosis	factor V Leiden	R506Q	0.00–0.08 (Eur)	5.0–10.0
Hemochromatosis	<i>Hfe</i>	H63D	0.02–0.22	4.0
NIDDM	<i>PPAR</i> γ	P12A	0.85 (Eur)	1.25
IDDM	<i>INS</i>	<i>VNTR</i> (promoter)	0.85 (Eur)	1.5–2.5
HIV	<i>CCR5</i>	Δ32	0.01–0.14 (Eur)	high (resistance), moderate (nonprogression)
Crohn's disease	<i>NOD2/CARD15</i>	1007fs	0.02 (Eur)	6.0
		G908R	0.01 (Eur)	6.0
		R702W	0.04 (Eur)	3.0
Breast cancer	<i>BRCA2</i>	N372H	0.25 (Eur)	1.3
Colon cancer	<i>APC</i>	I1307K	0.03 (AJ)	2.0
Neural tube defects	<i>MTHFR</i>	C677T (A→V)	0.30 (Eur)	2.0
		A1298C (E→A)	0.30 (Eur)	2.0
FMF	<i>MEFV</i>	P369S	0.02 (AJ)	7.0
		E148Q	0.06 (AJ)	3.0
Graves disease	<i>CTLA4</i>	T17A	0.35 (Eur)	1.5–2.0
Creutzfeld-Jakob	<i>PRNP</i>	M129V	0.65 (Eur)	3.0
Autoimmune diseases	<i>HLA B, DR, DQ</i>	numerous amino acid substitutions	polymorphic	low to moderate

\*AJ, Ashkenazi Jews; Eur, European; FMF, familial Mediterranean fever; IDDM, insulin-dependent diabetes mellitus; NIDDM, non-insulin-dependent diabetes mellitus.

**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**

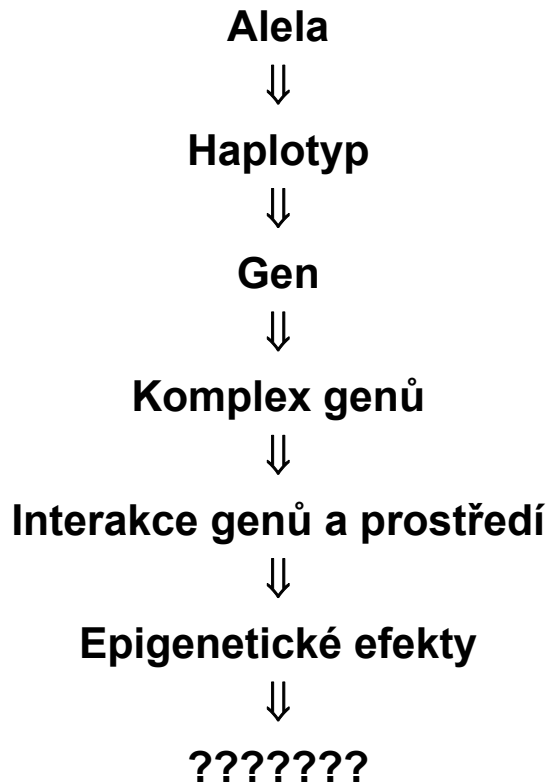
# Cíle genetického výzkumu u komplexních nemocí

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



# Perspektivy výzkumu

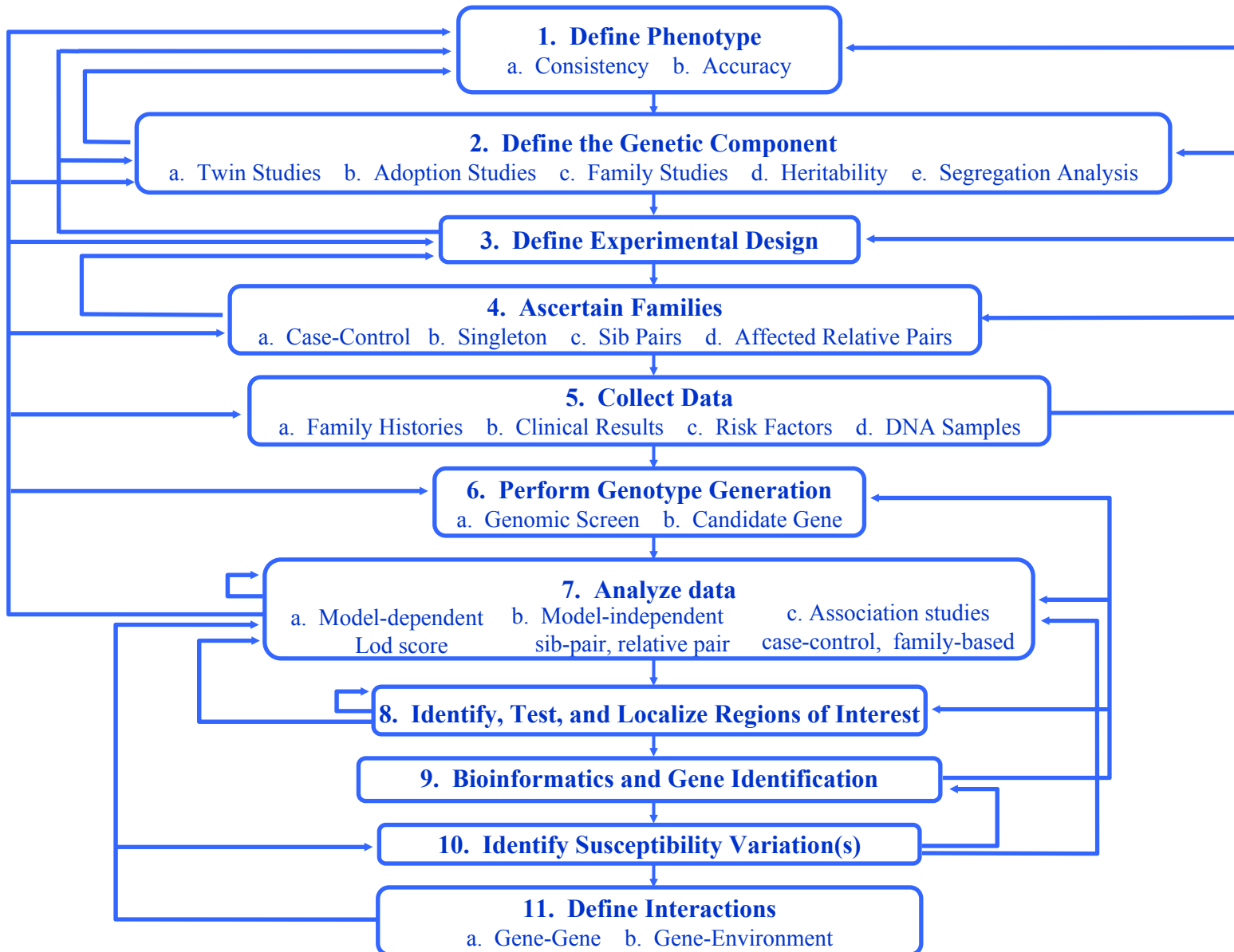
**Komplexní nemoci = komplexní asociace**



# Otázky k hodnocení významu genetických faktorů u komplexních nemocí

1. **Jak důležité jsou genetické vlivy** u nejčastějších forem multigenních nemocí?
2. **Jaký je vliv prostředí** na vznik nemoci?
3. Které jsou **nejslibnější přístupy k determinaci genetických faktorů** pro nemoc?
4. **Které geny již byly vybrány** jako možní kandidáti?
5. **Které cesty přispívají ke genetické vnímavosti** pro danou nemoc?
6. **Jak mnoho genů** se podílí na vnímavosti k nemoci?
7. Jsou nejčastější formy multigenní nemoci asociovány s častou nebo vzácnou genetickou variabilitou v populaci? (hypotéza častá variace/častá nemoc vs. genetický heterogenní model)?
8. **Proč alely, které jsou asociovány s nemocí, nebyly z populace eliminovány?**
9. Jak důležité jsou pro danou nemoc **interakce geny-prostředí a geny-geny?**
10. Jaké jsou **důsledky pro farmakogenetiku?**

# Disease Gene Discovery In Complex Disease



# The Genome Sequence is not *THE* answer!





**Děkuji Vám za pozornost**