

# Genetika onemocnění s komplexní dědičností

doc. RNDr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D., MBA

RECETOX, SCI MUNI

# Komplexní choroby

## Obsah

- charakteristika komplexních nemocí – příklady
- problematika studia komplexních chorob
- základy genetiky komplexních chorob – modely
- design genetických studií – statistická analýza
- metody molekulární genetiky při studiu těchto chorob

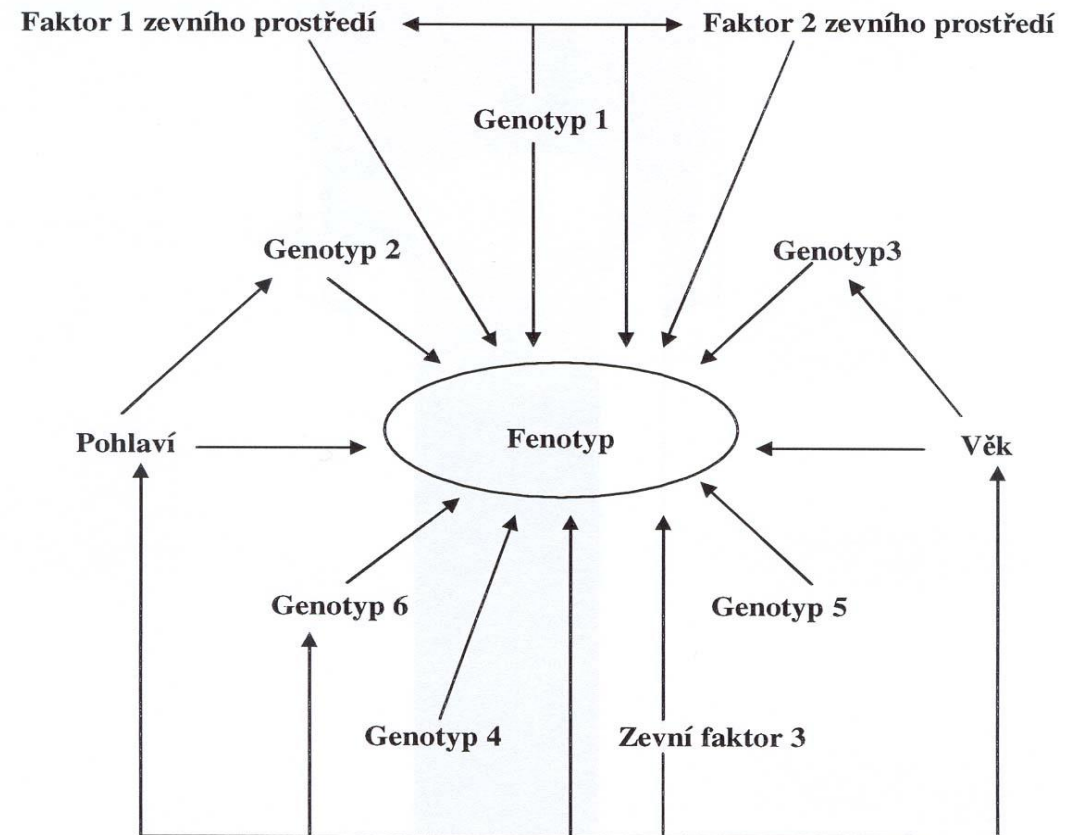
# Komplexní choroby

## Charakteristika

- multifaktoriální, často polygenní
- roli hrají interakce různých vlivů:

- **genetických,**
- **epigenetických,**
- **behaviorálních,**
- **psychosociálních a**
- **environmentálních**

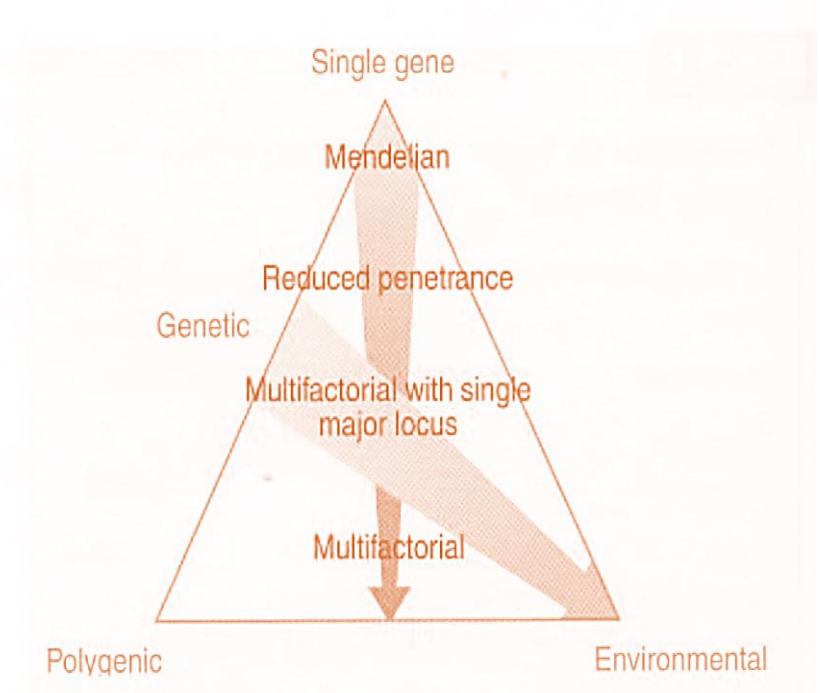
podílejících se na výsledném stavu – vzniku, rozvoji a průběhu onemocnění



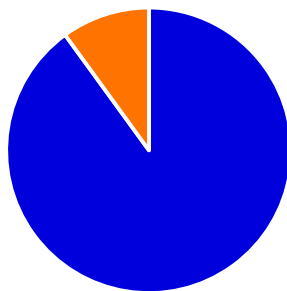
# Komplexní choroby

## Charakteristika

- pokud choroba má prokazatelně **familiární výskyt**, musíme očekávat **podíl genetického podkladu** na její manifestaci
- epidemiologickou charakteristikou komplexních chorob je **statistická kumulace v rodinách**

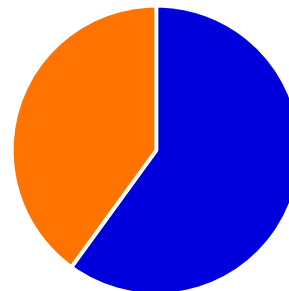


### Monogenní

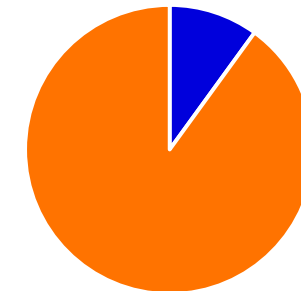


■ geny ■ další faktory

### Komplexní



### Nemoci způsobené zevnějšími vlivy



# Komplexní choroby

## Charakteristika

- fenotyp nevykazuje klasickou mendelistickou dominantní či recesivní dědičnost jako důsledek změn v jediném lokusu (tzv. jednolokusových)
- **predisponující „geny“** zvyšují pravděpodobnost onemocnění, ale nedeterminuje jednoznačně jeho přítomnost
  - je nutné spolupůsobení negenetických faktorů (**prostředí**) = dieta, fyzická aktivita, kouření, ....
  - a **interakce genů** mezi sebou
- stojí na vrcholu pomyslné pyramidy složitosti celé genetiky

# Komplexní choroby

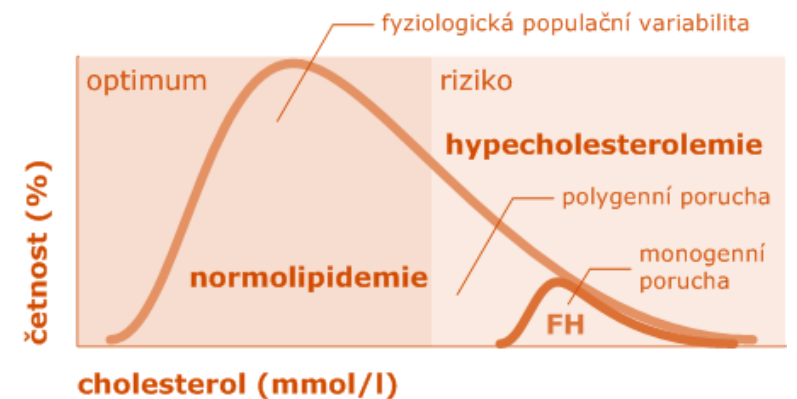
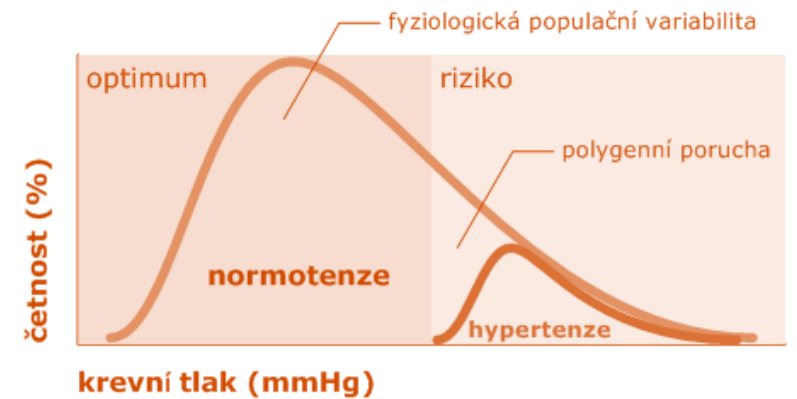
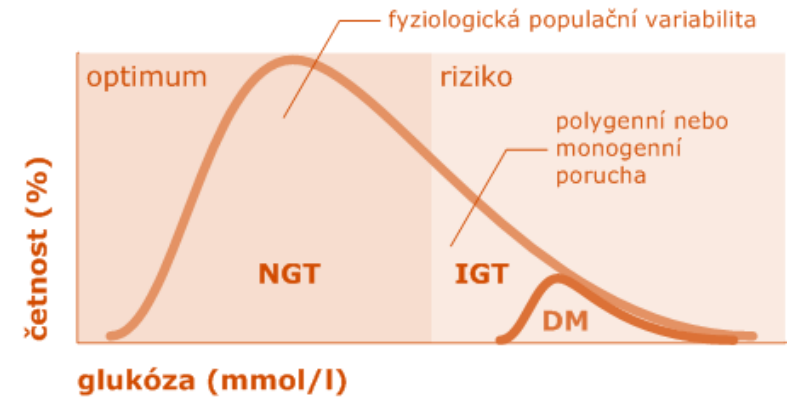
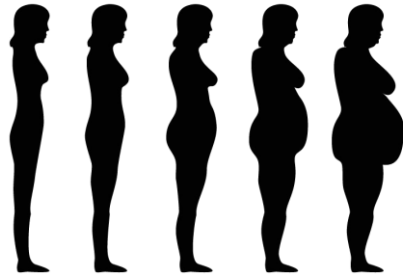
## Charakteristika

- 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

# Komplexní choroby

## Příklady

- diabetes
- esenciální hypertenze
- dyslipidémie
- alergie
- obezita – hypotéza typu „thrifty genotype“
  - selekce alel, které favorizují přírůstek váhy a skladování tuků



# Komplexní choroby

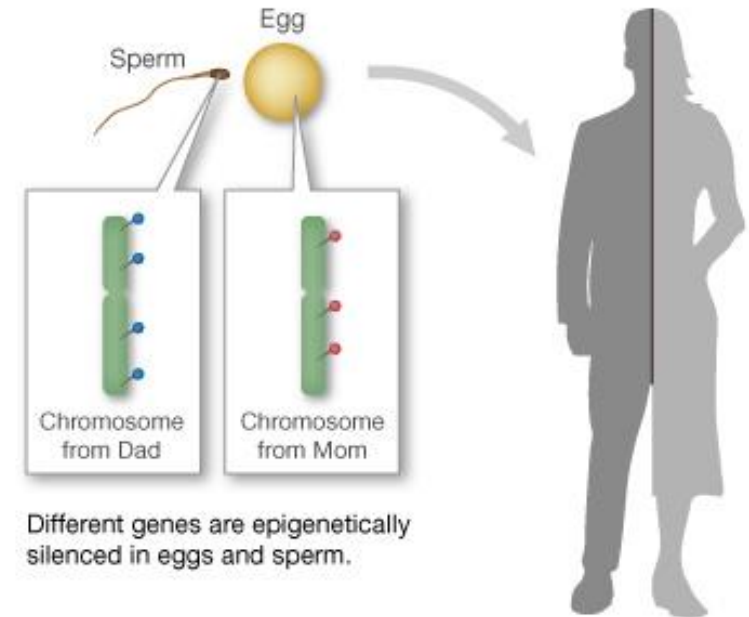
## Problematika studia komplexních chorob

### – neúplná penetrance patologického fenotypu

- u určité části osob, přestože zdědí nevýhodný genotyp (zde ve smyslu souboru vícero genů) se patologický fenotyp nerozvine

### – imprinting

- modifikace maternálních a paternálních genů během gametogeneze tak, že mají odlišnou expresi v zygotě
- většinou pouze maternální nebo paternální alela daného genu je exprimována, druhá je utlumena





# Komplexní choroby

## Problematika studia komplexních chorob

### – spolupůsobením dalších mechanismů přenosu

- mitochondriální dědičnost

### – existence fenokopí

- patologický fenotyp může být přítomen u lidí, kteří nejsou nosiči zmíněného genotypu
- navozeno vnějšími faktory - např. kortikoidy indukovaný DM

### – genetická heterogenita klinický obraz není specifický, ale může se rozvinout v důsledku záměn:

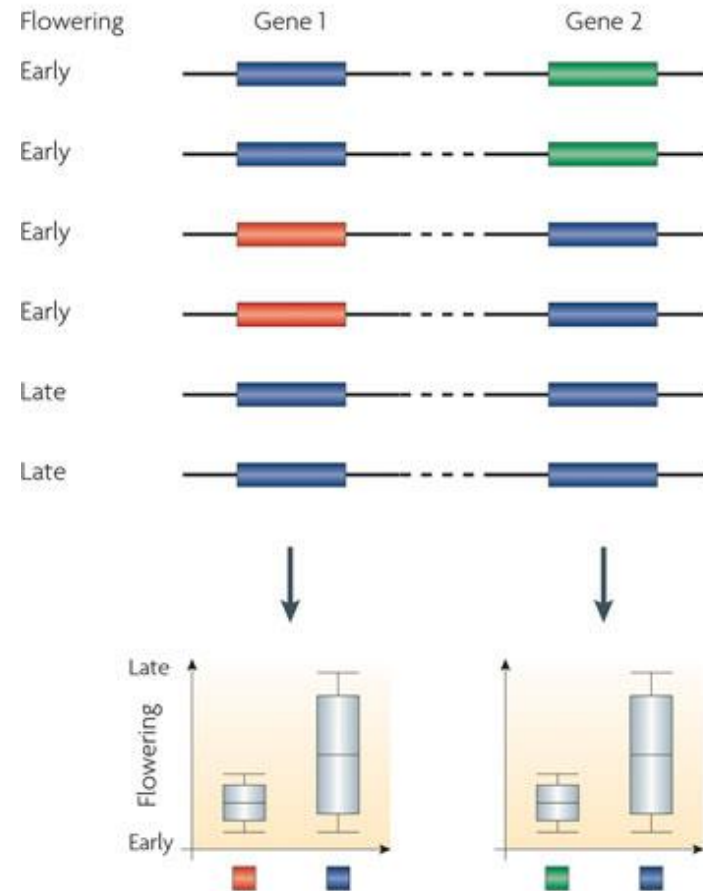
- v genech ležících na různých lokusech (= **lokusová heterogenita**)
- v jednotlivých genech může být přítom vícero mutací či polymorfizmů (= **alelická heterogenita**)

# Komplexní choroby

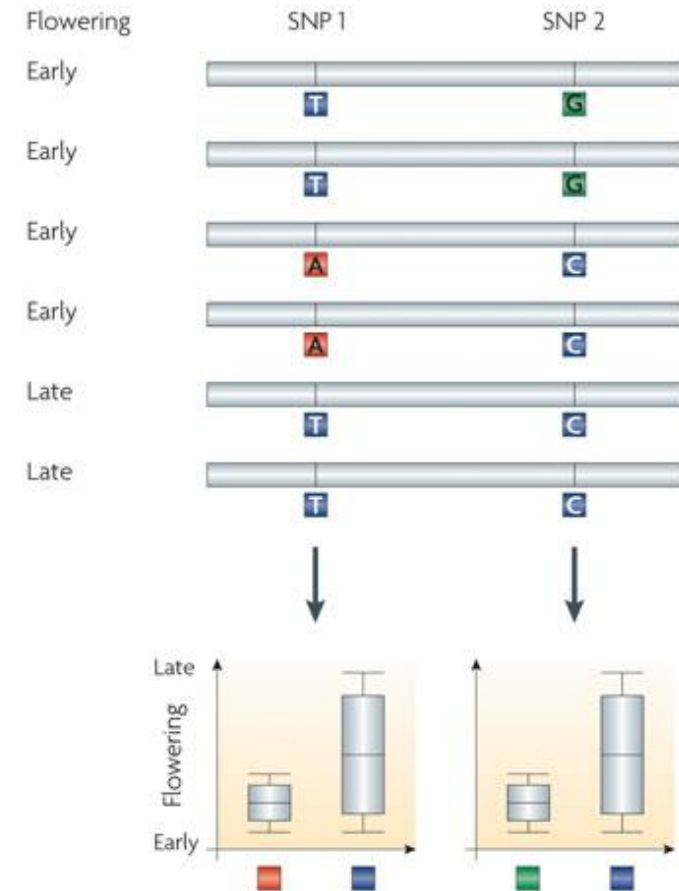
Problematika studia komplexních chorob

## – genetická heterogenita

**a Genetic heterogeneity**



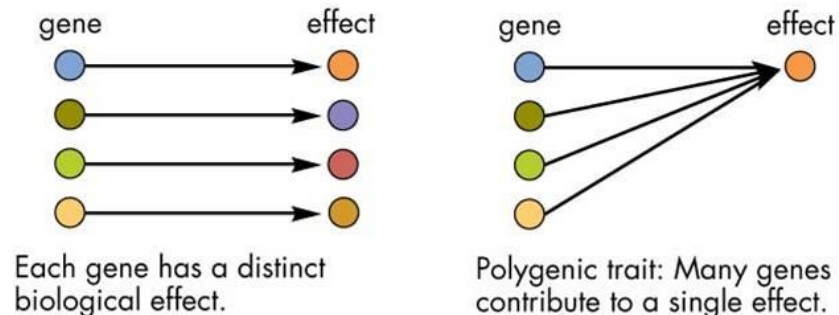
**b Allelic heterogeneity**



# Komplexní choroby

## Problematika studia komplexních chorob

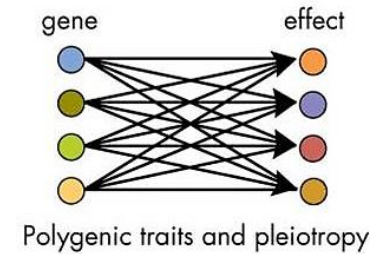
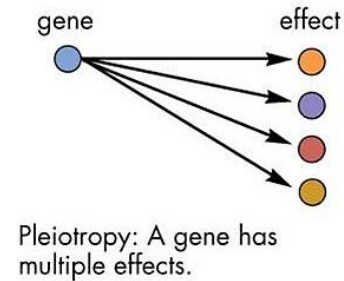
- vysokou populační frekvencí alel zodpovědných za rozvoj patologického fenotypu
  - každá jednotlivá predisponující alela pravděpodobně není sama o sobě výrazně patogenní
- polygenní dědičností
  - predispozice k rozvoji patologického fenotypu se zvyšuje pouze při simultánním výskytu určitého souboru alel - více faktorů - tzv. „malé“ faktory



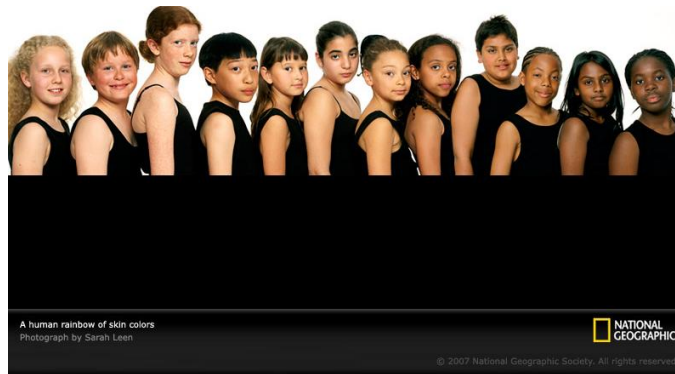
# Komplexní choroby

## Problematika studia komplexních chorob

– jev, kdy jeden gen ovlivní organizmus mnoha způsoby se nazývá **pleiotropie**



<http://www.grossmont.edu/people/bo-nnie-yoshida-levine/online-lectures/genetics-mendel.aspx>



# Komplexní choroby

## Základy genetiky komplexních stavů

– frekvence různých typů dědičných onemocnění

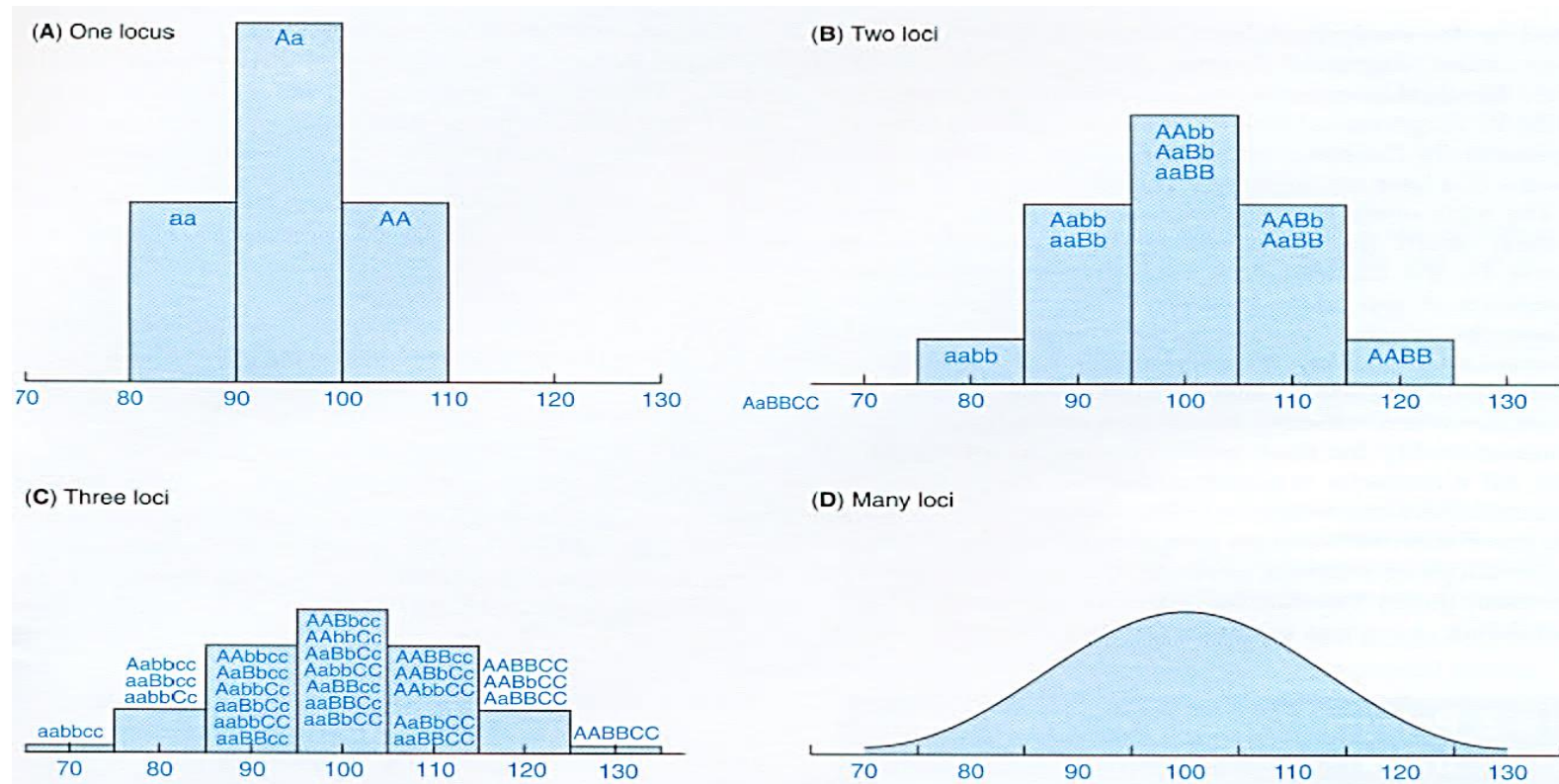
Typ dědičnosti chorob	Incidence při narození (na 1000)	Prevalence ve věku 25 let (na 1000)	Prevalence v populaci (na 1000)
genomové a chromozomové mutace	6	1,8	3,8
monogenní mutace	10	3,6	20
multifaktoriální	~ 50	~ 50	~ 600

	JEDNOLOKUSOVÉ NEMOCI	KOMPLEXNÍ NEMOCI
Závažnost nemoci, manifestace	Narušují homeostázu zásadním způsobem a porucha se objevuje brzy v průběhu života. Závažnost je pro konkrétního nositele je značná. Z hlediska populační morbidity a mortality jsou však nevýznamné!	Rovněž zásadně narušují homeostázu, ovšem efekt nastupuje postupně a efekt kulminuje v pozdějším období života. Hlavní faktor ovlivňující morbiditu a mortalitu v populaci, zejm. v rozvinutých zemích!
Interakce s prostředím	Některé se vyvinou bez ohledu na prostředí, u jiných je nutný specifický etiologický činitel (např. u fenylketonurie přítomnost fenylalaninu v dietě) nebo několik činitelů (např. oxidační stres u hemolytické anemie při G6PD deficitu).	Manifestace je pravidelně výsledkem spolupůsobení komplexu genů interagujících s prostředím během vývoje, dospívání a zejm. stárnutí.
Variabilita fenotypu	Modifikující geny, někdy pohlaví (např. heredit. hemochromatóza) a efekt prostředí činí fenotyp do jisté míry variabilní, ale ne tak jako u komplexních onemocnění; efekt hlavního patologického genu vždy dominuje a kvalitativně jsou značně homogenní.	Fenotyp je výsledkem interakce efektů jednotlivých genů, přičemž charakter interakce může být heterogenní, aditivní či multiplikativní.
Penetrance	Obecně vysoká.	Typicky nekompletní (avšak pojem penetrance úzce souvisí s definicí fenotypu, což je u komplexních onemocnění svébytný problém).
Populační frekvence genetických variant	Obecně velmi nízká jako důsledek vysokého selekčního tlaku; výjimku z pravidla představují nemoci, které přináší určitou selekční výhodu (např. hereditární hemoglobinopatie v malarických oblastech).	Frekvence minoritních alel jsou vyšší, často se jedná o tzv. běžné polymorfizmy. Varianty genů jsou pravděpodobně evolučně starší; evoluční konzervace je součástí lidského vývoje.
Genetická architektura	Poměrně velmi velká lokusová homogenita (tj. stejný gen), ale jsou výjimky (např. retinitis pigmentosa, Ehlers-Danlosův syndrom aj.). Typicky extrémně vysoká alelická heterogenita (tj. různé mutace) jako důsledek očišťující selekce (např. ~160 mutací u hemofilie B, ~270 mutací u cystické fibrózy, ~700 u familiární hypercholesterolemie).	Je předmětem intenzivního výzkumu. Lokusová heterogenita bude zřejmě vyšší, alelická už by nemusela být, protože zodpovědné varianty nejsou předmětem tak silné selekce (běžné polymorfizmy).

# Komplexní choroby

Základy genetiky komplexních stavů – modely

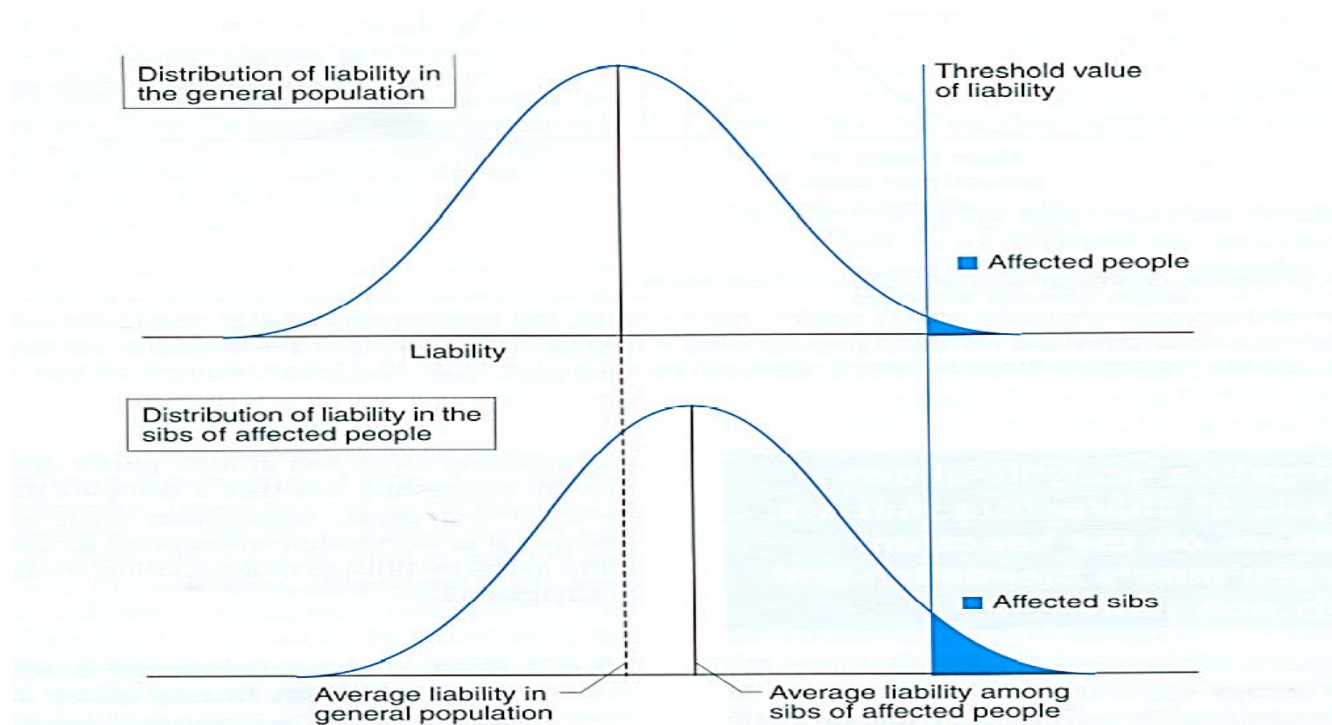
– 1918 R. A. Fisher - **polygenní model**



# Komplexní choroby

## Základy genetiky komplexních stavů – modely

- v polovině 60. let přišel s tzv. **prahovým modelem** D.S. Falconer (limitní počet recesivních alel způsobí vznik onemocnění)

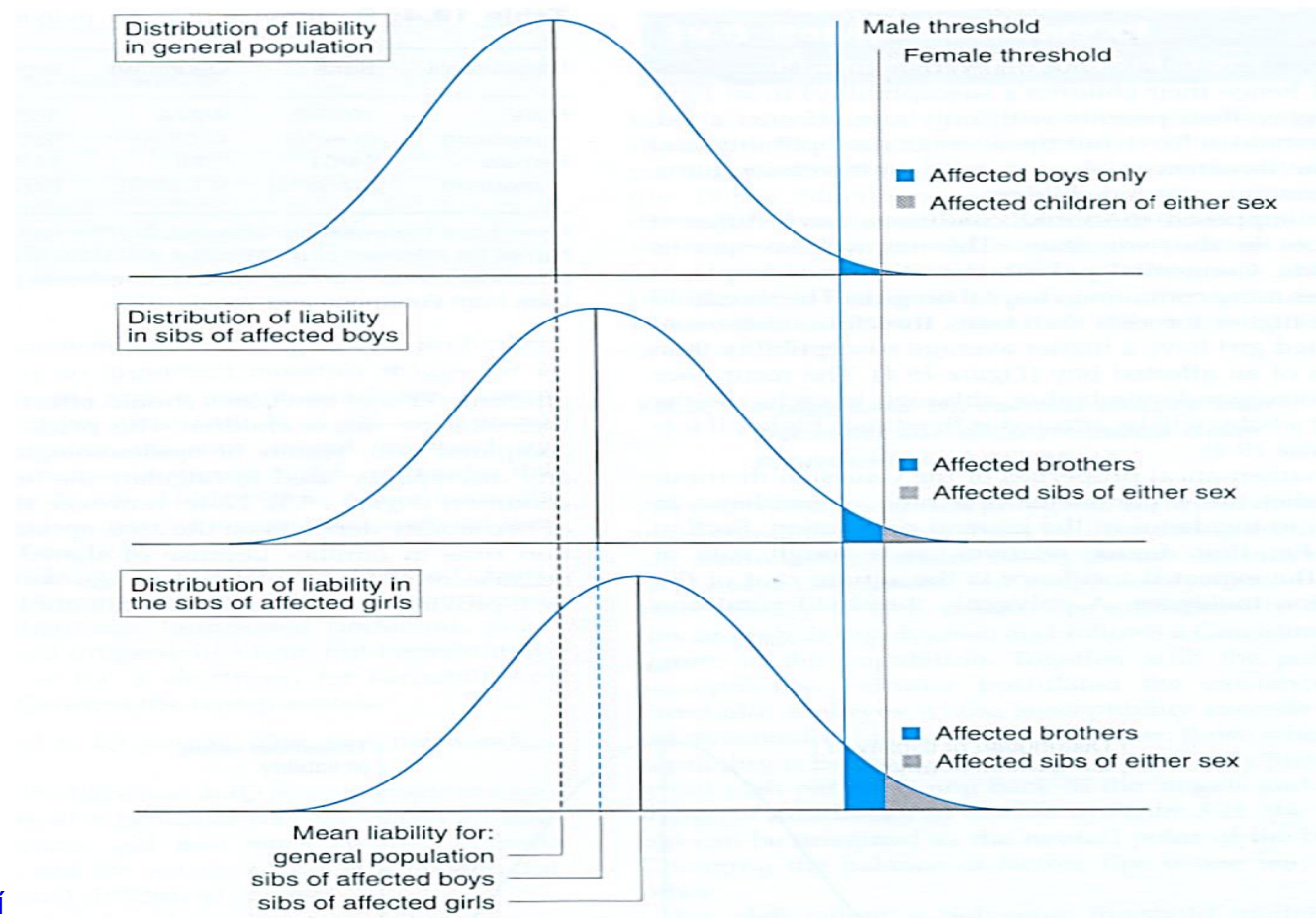




# Komplexní choroby

Základy genetiky komplexních stavů – modely

- prahový model s pohlavně rozdílným prahem



# Komplexní choroby

## Základy genetiky komplexních stavů – modely

### – **současný 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**

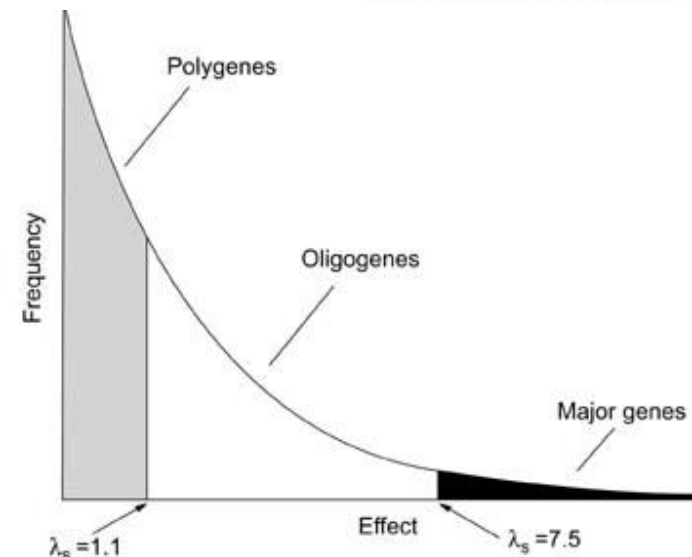
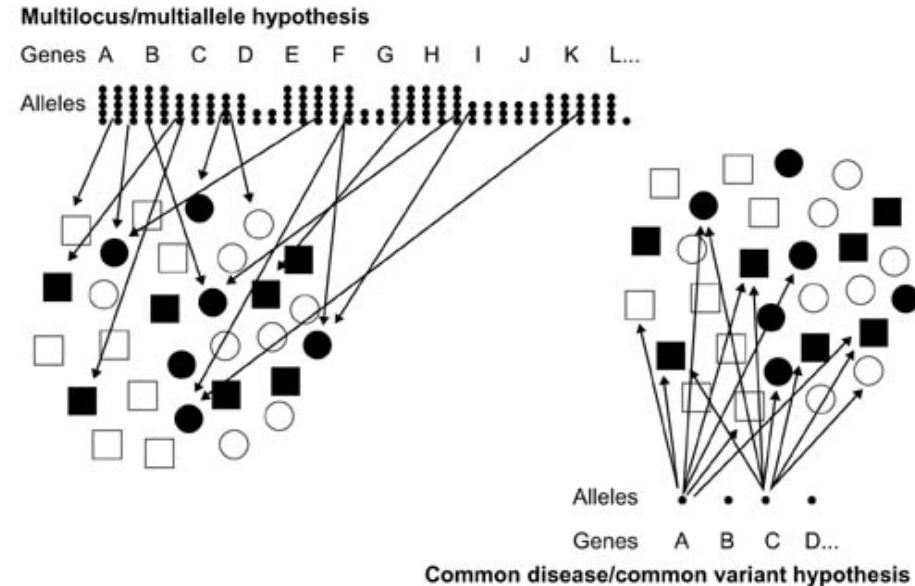


vyjádřeno **multiplikativním modelem**

# Komplexní choroby

Základy genetiky komplexních stavů – modely

- **multiplikativní model**
- souhrnný účinek predisponujících genů je roven součinu jejich dílčích účinků (interakční efekty)
- uvažuje existenci dvou a více rizikových lokusů, kdy dispozice k nemoci je zvýšena při současném působení obou či více rizikových genotypů



# Komplexní choroby

Základy genetiky komplexních stavů

## – Podklady pro hledání genetické determinace

- **Zvýšený výskyt v rodinách**
- **Zvýšená incidence u dvojčat: MZ > DZ**
- **Dědičnost intermediárních fenotypů**
  - neúplná dominance (heterozygot je intermediárním fenotypem)
  - mezi nejčastěji používané intermediární fenotypy patří profily genové exprese (transkriptom), variabilita v množství proteinů (proteom), metabolitů (metabolom), atd.

# Komplexní choroby

## Základy genetiky komplexních stavů

### – Familiární výskyt nemocí – **Familiární agregace**

- je charakteristikou komplexních nemocí, protože příbuzní sdílejí větší podíl genů navzájem mezi sebou než s nepříbuznými osobami
- obráceně to platit nemusí – FA neznamenaá, 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**

# Komplexní choroby

## Základy genetiky komplexních stavů

### – Familiární výskyt nemocí

- měří se **relativní riziko  $\lambda$  ( $\lambda_R$ )** – vyjadřuje, kolikrát vyšší pravděpodobnosti onemocnění čelí definovaný příbuzný nemocného jedince ve srovnání s obecným rizikem populace

**prevalence nemoci u příbuzných „r“ postižené osoby**

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

**prevalence nemoci v populaci**

- r – znamená obecně příbuzný („relative“), v praxi se měří např.  $\lambda_s$  („sibs“),  $\lambda_p$  („parents“)
- čím vyšší je hodnota  $\lambda$ , tím snazší je genetická analýza daného komplexního znaku

# Komplexní choroby

## Základy genetiky komplexních stavů

### – Familiární výskyt nemocí

- definovaný příbuzný – 1. stupně (dítě, rodič, sourozenec -  $\lambda_S$ )

Např. u DM 1. typu -  $\lambda=15$

u DM 2. typu -  $\lambda=3,5$

u astmatu -  $\lambda=3,5$

u cystické fibrózy má  $\lambda$  kolem 500

- hlavní příčiny rozptylu hodnot  $\lambda$  mezi jednotlivými chorobami nejsou v absolutní velikosti geneticky podmíněného rizika, ale **v obecné populační zátěži**, která např. u DM 1. typu činí 0,4 %, u 2. typu 6-7 % (ve věku 80 let je kumulativní riziko kolem 17 %)

# Komplexní choroby

Základy genetiky komplexních stavů

## – Konkordance a diskordance

- mají-li 2 příbuzní jedinci v rodině stejnou nemoc – **konkordantní**
- je-li jeden postižený a druhý ne – **diskordantní**
  - ⇒ lze vysvětlit 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



# Komplexní choroby

## Základy genetiky komplexních stavů

### – 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)  $0,25 (2 \text{ alely}) + 0,5 (1 \text{ alela}) + 0,25 (0 \text{ alel}) = 1 \text{ alela}$

# Komplexní choroby

## Základy genetiky komplexních stavů

- 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

# Komplexní choroby

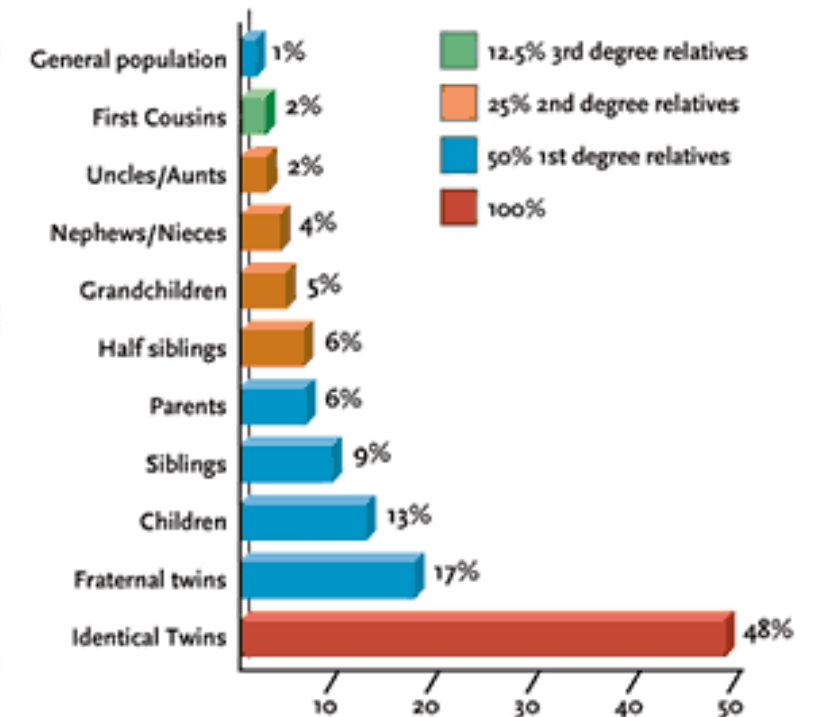
## Základy genetiky komplexních stavů

- Podíly relativního rizika  $\lambda_r$  příbuzných probandů s vybraným onemocněním
  - 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 Rimo DL, Connor JM. Pyeritz RE. Emery and Rimo DL'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.



<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/15199/title/The-Infection-Connection-in-Schizophrenia/>

# Komplexní choroby

## Základy genetiky komplexních stavů

### – Studie dvojčat

- „experiment přírody na lidech“
- základním přístupem je tradičně **stanovení stupně fenotypové shody** u MZ a DZ dvojčat → minimalizace relativních 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

# Komplexní choroby

## Základy genetiky komplexních stavů

### – Studie dvojčat

- **omezení:**

- 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)

# Komplexní choroby

## Základy genetiky komplexních stavů

### – 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 (%)	
	<i>MZ</i>	<i>DZ</i>
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.

# Komplexní choroby

Základy genetiky komplexních stavů

## – 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 znaku  $H^2$  je  $\Rightarrow$  dvojnásobek rozdílu korelačního koeficientu MZ a DZ dvojčat

# Komplexní choroby

Základy genetiky komplexních stavů

## – Odhad heritability

### 1. pomocí rozptylu F1 a F2 generací

rozptyl u F1 – rozptyl u F2

$$H^2 = \frac{\text{rozptyl u F1} - \text{rozptyl u F2}}{\text{rozptyl F2}}$$

- je-li variabilita znaku určena zejména prostředím, je rozptyl u F2 blízký rozptylu u F1 a čitatel, a tím i hodnota  $H^2$ , se bude blížit 0
- pokud je variabilita dána pouze genetickým složením, rozptyl u F1 je nulový a  $H^2$  je rovna 1



# Komplexní choroby

Základy genetiky komplexních stavů

– Odhad heritability

2. pomocí sledování inbredního kmene pokusných zvířat

3. ze studií dvojčat

– dle **Holzingerova indexu heritability (H)**

relativní zastoupení konkordantních párů ve skupině MZ dvojčat – DZ

**H** = -----

1 – relativní zastoupení konkordantních párů ve skupině DZ dvojčat

# Komplexní choroby

Základy genetiky komplexních stavů

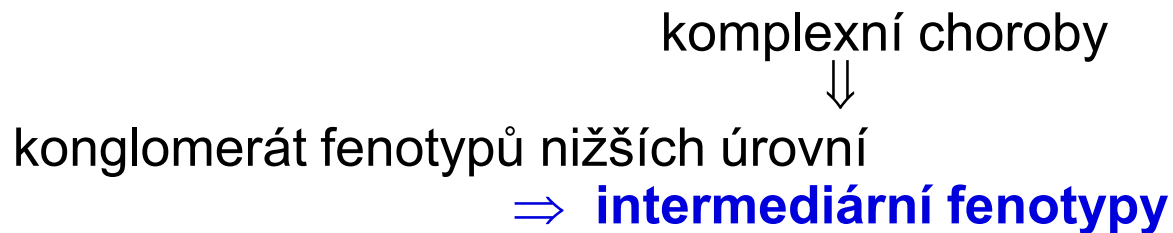
## – Heritabilita běžných komplexních nemocí (znaků)

<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>

# Komplexní choroby

Základy genetiky komplexních stavů

- **Genetická analýza komplexních nemocí**
  - důležité je **definovat studovaný fenotyp**



- vágní stanovení fenotypu ⇒ komplikace při porovnávání různých nezávislých studií

# Komplexní choroby

Základy genetiky komplexních stavů

## – Genetická analýza komplexních nemocí

- má **vždy statistický charakter**

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

FENOTYP = ZEVNÍ FAKTORY + GENETICKÉ FAKTORY

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

# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Genetická analýza komplexních nemocí – fáze studia:

- formulace hypotézy
- selekce kandidátních genů
  - s intermediárním fenotypem
  - s klinickou manifestací nemoci
  - s klinickou závažností nemoci
  - s odpovědí nemoci na léčbu
- studium FA (studie na dvojčatech)
- asociační studie (case-control studie)

# Komplexní choroby

## Design genetických studií

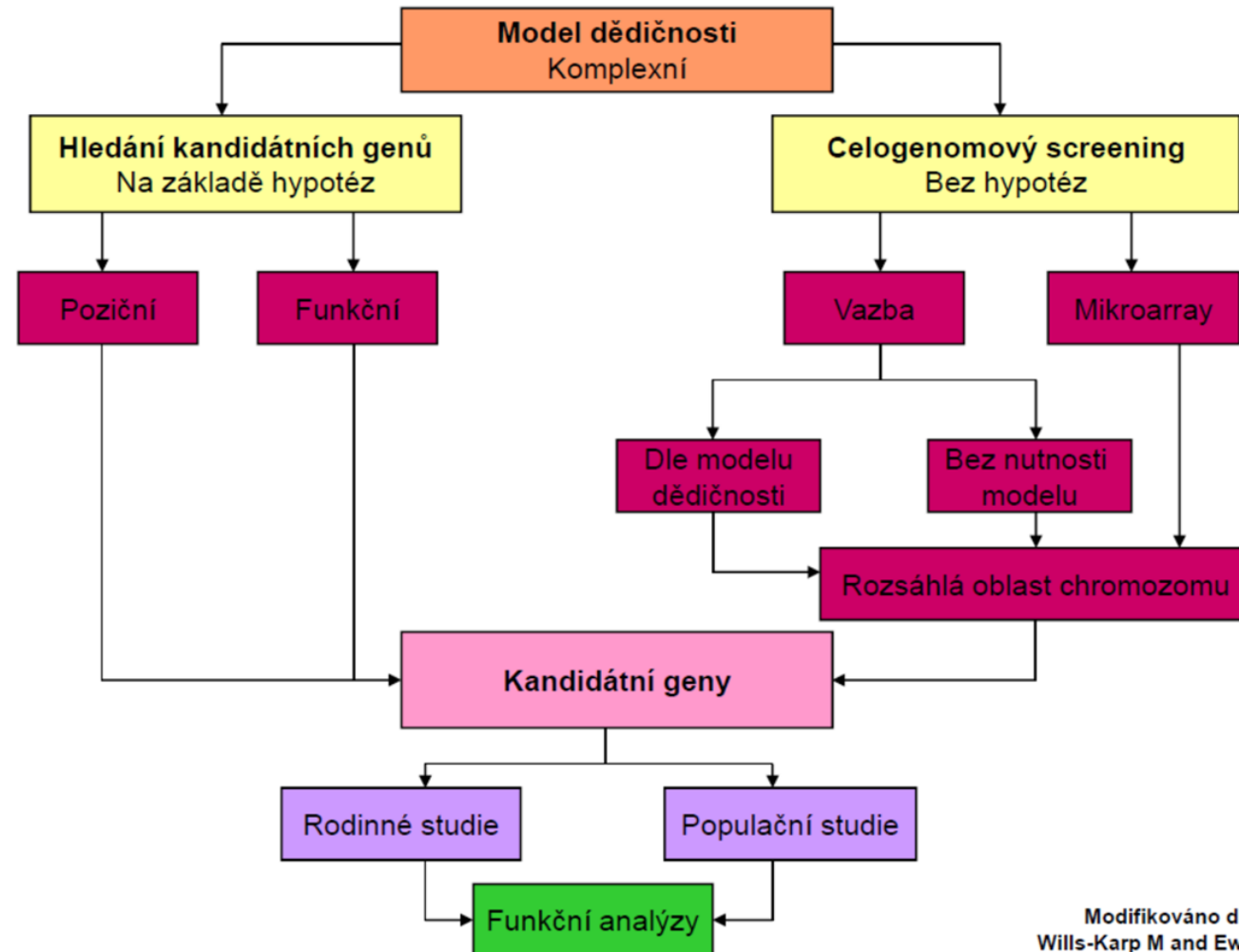
### – Genetická analýza komplexních nemocí – fáze studia:

- tvorba modelu dědičnosti
- hledání oblasti, kde se gen nachází (vazebná nerovnováha, haplotypy)
- analýza struktury a fce genu
- odhad frekvence různých mutací a zhodnotí se rizikovost každé z nich, a to v kombinaci s dalšími faktory, například věk nebo prostředí
- **určení míry asociace** - statisticky významná závislost dvou proměnných. Sílu asociace zjišťujeme pomocí statistického testu, např. t-testu, chí-kvadrát test, analýzou variance nebo mnohočetnými lineárními nebo logistickými regresemi.

# Komplexní choroby

Design genetických studií

- Metodologie genetického výzkumu komplexních nemocí



Modifikováno dle  
Wills-Karp M and Ewart SL  
Nature Review 2004

# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Genetické studie

- strategie výběru tzv. **kandidátních genů**
  - jednodušší u mendelisticky děděných nemocí
  
- **studie na modelových organizmech**
- **studie na lidech** (jednotlivci, rodiny, populace)



# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Studie na modelových organizmech

- identifikace genetických determinant komplexních onemocnění u experimentálních modelů
- vycházíme ze dvou inbredních kmenů (potkana, myši), tedy takových kmenů, kde **všichni jedinci** (téhož pohlaví) každého z kmenů jsou **geneticky identičtí**
- tyto dva parentální kmény se **liší ve zkoumaném znaku** - např. hypertenzní kmen vs. normotenzní kmen
- pokud jedince těchto dvou kmenů **navzájem křížíme**, jejich potomstvo (F1) je heterozygotní v rozsahu celého genomu

# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Studie na modelových organizmech

- dále postupujeme přes **zpětné křížení** (F1 s P) nebo **křížíme navzájem dvojice F1** a získáme populaci druhé filiální generace (F2, zpravidla několik set jedinců)
- nejčastěji se používá sada několika set tzv. **mikrosatelitních markerů**, které jsou rovnoměrně rozmístěny po celém genomu
- u každého jedince F2 **zjistíme, jestli zdědil obě alely daného markeru od jednoho či druhého progenitora** (parentálního kmene), příp. jestli má po jedné alele od každého a je tedy pro daný úsek genomu heterozygotní (u zpětného křížení samozřejmě připadá v úvahu jen jeden typ homozygota nebo heterozygotní stav)

# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Studie na modelových organizmech

- za pomoci specializovaného softwaru zkoumáme, **jestli některé alely nejsou výrazně předávány potomkům současně s dispozicí** pro vysoké nebo naopak nízké hodnoty sledovaného kvantitativního znaku
- nejjednodušší variantou je porovnání hodnot
- např. inzulinémie - mezi skupinami rozdělenými podle genotypu postupně v každém markeru

# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Studie na modelových organizmech

- "**marker regression**„ - pokud budou jednotlivé genotypové třídy vykazovat signifikantně rozdílné parametry sledované charakteristiky (např. krevního tlaku), lze předpokládat, že daný marker, případně variace DNA v jeho blízkosti nějakým způsobem ovlivňuje tuto charakteristiku
- **nevýhody:**
  - FP - náhodně odlišná distribuce markeru kvantitativního znaku (! P-hodnota)
  - testujeme asociaci jen přímo v místech, ve kterých se nacházejí námi typizované markery, což v experimentu běžných parametrů znamená pomíjení desítek megabází DNA mezi nimi

# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Studie na modelových organizmech

- **metoda tzv. intervalového neboli QTL (quantitative trait locus) mapování**
  - umožňuje odhadovat genotyp i v úsecích mezi námi genotypizovanými markery
  - pokud se QTL (tedy lokus, který výrazně ovlivňuje variabilitu ve zkoumaném znaku) podaří identifikovat, nastává **fáze pozičního klonování**, která je v principu velmi podobná strategii popsané u studií lidských

# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Studie na lidech

- zhodnocení síly asociace genů s chorobami
- **linkage (vazebná) analýza** - para a neparametrická
- **asociační studie** – retro, prospektivní a TDT studie

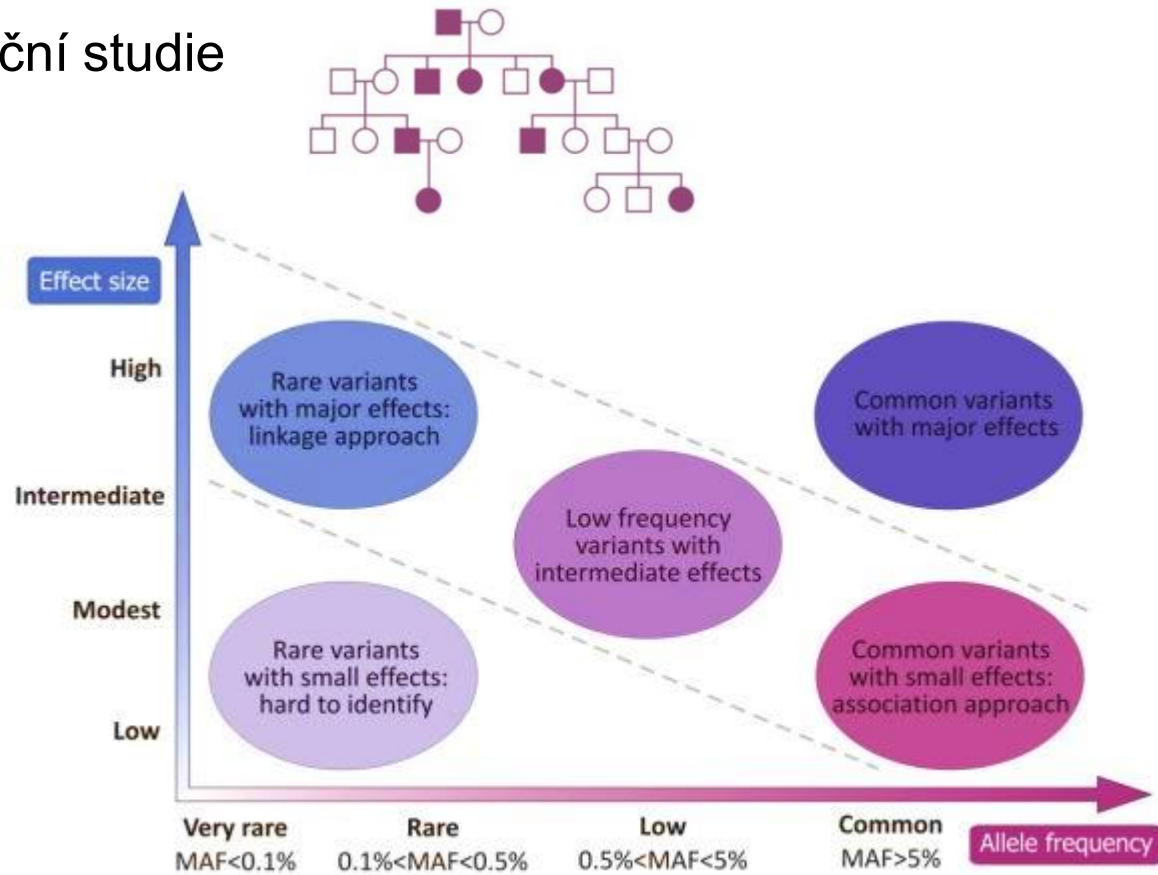
např. **case-control** – studium několik SNPs

např. **celogenomové asociační studie** (GWAS = Genome-Wide Association Study) - vyhledávají SNPs nebo běžné genové variace, které se typicky chovají jako ukazatelé genových oblastí s malým efektem u stoupajícího rizika nemocí

# Komplexní choroby

## Design genetických studií

– vazebné vs. asociační studie



# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Linkage (vazebná) analýza – dva základní principy:

- geny umístěné na různých chromozomech segregují nezávisle a není tedy mezi nimi žádná vazba
- čím blíže u sebe lokusy na stejném chromozomu leží, tím je pravděpodobnost rekombinace  $\theta$  mezi nimi menší, přičemž může dosahovat maximálně hodnoty 0,5. Jestliže jsou dva lokusy na jednom chromozomu příliš blízko u sebe, mezi těmito lokusy existuje vazba a dochází ke společné segregaci alel. Pokud například zjistíme, že rekombinační poměr genetického markeru s určitou nemocí je nízký, můžeme usoudit, že se tento marker nachází blízko genu pro nemoc.



# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Linkage (vazebná) analýza

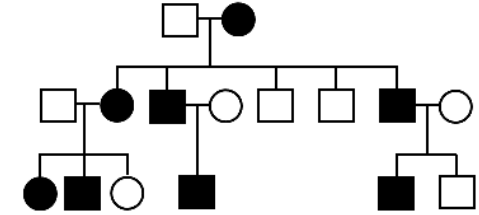
- testuje kosegregaci genového markeru a fenotypu nemoci v rodině
- marker a nemoc se v dané rodině mají vždy vyskytovat spolu

○ **parametrické metody** - je-li stanoven model dědičnosti

○ **vs. neparametrické metody**

# Komplexní choroby

## Design genetických studií



### – Linkage (vazebná) analýza – parametrické metody

- je-li stanoven model dědičnosti (při genetickém mapování monogenních nemocí)
  - dostatek rodin, ve kterých daná nemoc postihuje alespoň dvě generace, a jasně definovaný fenotyp
  - hodnocení dle **LOD skóre** - 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 (1:100 proti) jako důkaz, že lokusy nejsou vázány
  - **porovnání NULOVÉ HYPOTÉZY** (neexistuje vazba,  $\theta = 0,5$ ) **s alternativní hypotézou**

# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Linkage (vazebná) analýza – neparametrické metody

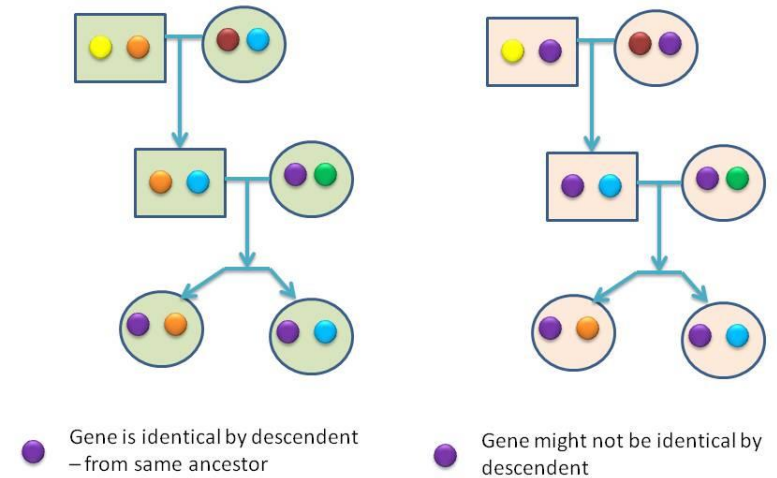
- u komplexních chorob

- např. studium sourozenců, sdílení alel

- zjišťuje se, jestli pár zdědil daný marker častěji než v případě náhodné segregace. K tomu slouží počet tzv. IBD alel (identical by descent, identické původem)

- **NULOVÁ HYPOTÉZA** = oba sourozenci sdílejí dvě IBD alely s pravděpodobností 25 %, jednu IBD alelu s pravděpodobností 50 % a žádnou takovou alelu s pravděpodobností 25 %

- Možná vazba by se projevila tím, že oba nemocní sourozenci by sdíleli více IBD alel než kdyby šlo o náhodu



# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Linkage (vazebná) analýza

- **Posun zjištění (ascertainment bias)**

- 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

# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Asociační studie

- vyšetřují související markeru a nemoci na populační úrovni, tj. u nepříbuzných jedinců, obvykle srovnáním frekvencí markerů u nepříbuzných nemocných a kontrolních subjektů (studie case-control)
- retrospektivní studie
- prospektivní studie
- TDT studie

# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Asociační studie

- statistickou sílu asociace je možno dále zvýšit obohacením o další kritéria, jako např.:
  - klinické subtypy nemoci (studie case-case)
  - závažnost nemoci
  - časný začátek nemoci
  - rizikové faktory pro nemoc včetně pohlaví
  - vhodné biologické znaky (např. plazmatické hladiny cytokinů při asociaci genetických polymorfizmů v cytokinových genech; studie genotyp-fenotyp)

# Komplexní choroby

## Design genetických studií

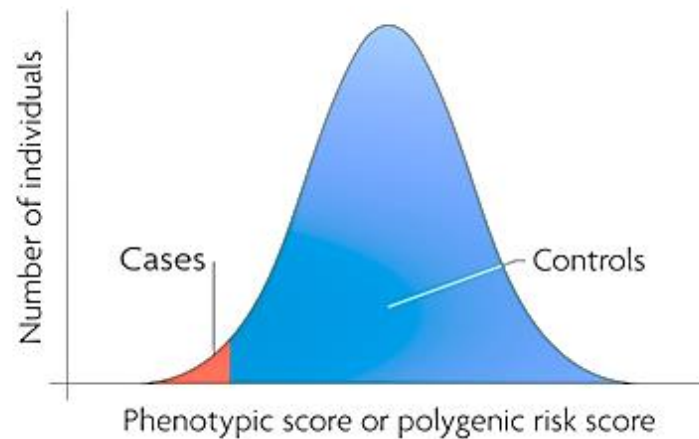
- **Asociační studie – retrospektivní – studie případů a kontrol (case-control studies)**
  - srovnávání frekvencí alel studovaného genu mezi dvěma skupinami nepříbuzných osob ze stejné populace (zamezení tzv. stratifikace)
  - u metod retrospektivních se vyvinula daná nemoc a až poté se zjišťuje, zda postižená osoba byla nebo nebyla vystavena sledovanému rizikovému faktoru (například přítomnost určité formy genu)
  - nutné definovat kritérium, podle kterého se subjekty rozdělí do skupin (např. dle klinického vyšetření)
  - charakteristika skupin – srovnatelnost (např. věk, pohlaví nebo rasa) = strukturální vyvažování případů a kontrol (**matching**)

# Komplexní choroby

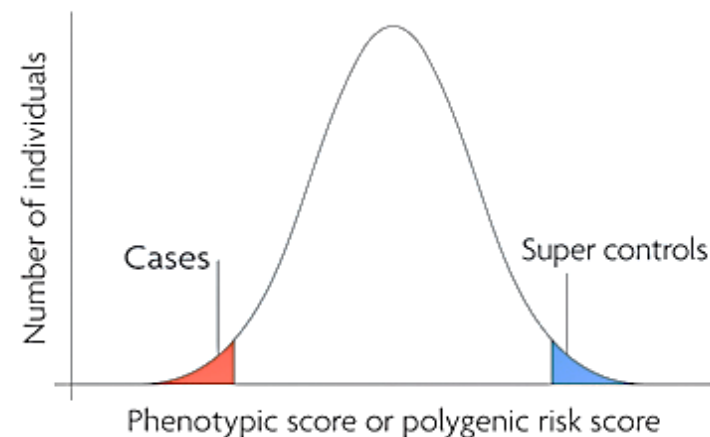
## Design genetických studií

### – Asociační studie – retrospektivní – studie případů a kontrol (case-control studies)

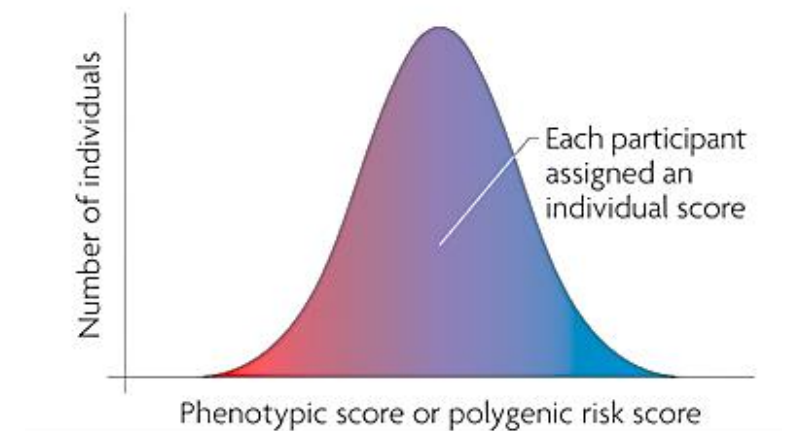
a Case-control



b Extreme selection



c Quantitative measurement



[http://www.nature.com/nrg/journal/v10/n12/box/nrg2670\\_BX3.html](http://www.nature.com/nrg/journal/v10/n12/box/nrg2670_BX3.html)



# Komplexní choroby

## Design genetických studií

- **Asociační studie – retrospektivní – studie případů a kontrol (case-control studies)**
  - **funkční kandidátní geny**
    - produkty genů se patofyziologicky uplatňují u dané choroby
  - **pozičních kandidátních genů**
    - mohou tak navazovat na vazebné metody, u nichž se vymežil úsek chromozomu, kde se pravděpodobně hledaný gen nachází, a tento gen odhalit

# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Asociační studie – retrospektivní – studie případů a kontrol (case-control studies)

- poměr šancí (OR, odds ratio)

- síla asociace je vyjádřena podílem nadějí vypočítaným z frekvence dané alely u pacientů a kontrol

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

- $OR = (80 \cdot 50) / (50 \cdot 20) = 4$

	pacient	kontrola
Alela G	80	50
Alela A	20	50

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

		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

# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Vyjádření rizika u komplexních chorob

- **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

# Komplexní choroby

## Design genetických studií

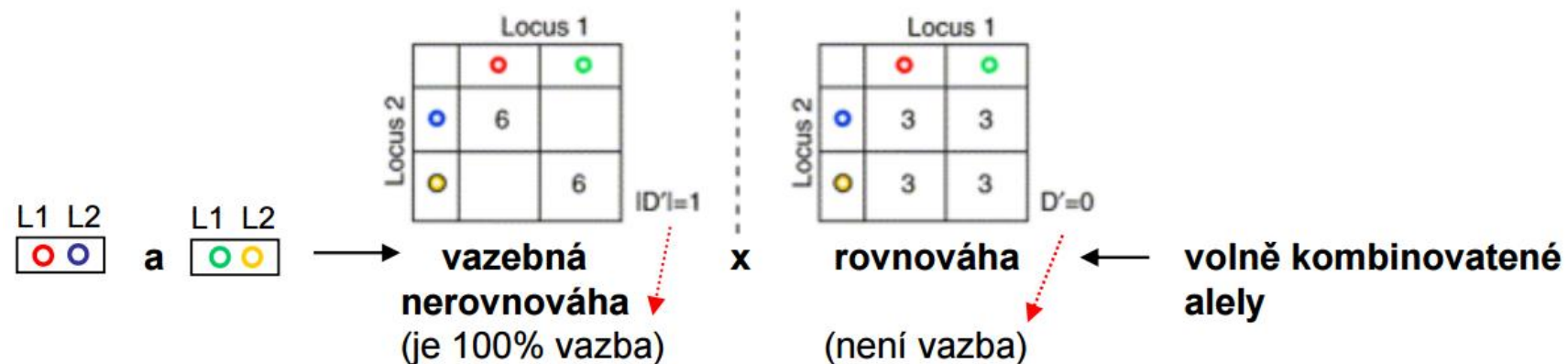
- **Asociační studie – retrospektivní – studie případů a kontrol (case-control studies)**
  - **přímá asociace**
    - předpokládá se, že sledovaný marker je zároveň patogenetickým lokusem pro nemoc a má tedy hypoteticky přímý (kauzální) efekt na fenotyp
    - je tedy nutné vybrat několik kandidátních lokusů, které by mohly být přímo zodpovědné za danou nemoc

# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Asociační studie – retrospektivní – studie případů a kontrol (case-control studies)

- pokud kandidátní lokusy neznáme, můžeme využít **nepřímé studie**, kde genotypizací musí projít daleko více většinou disperzně rozptýlených markerů
- u asociovaného markeru/ů předpokládáme, že se nachází v blízkosti lokusu pro nemoc



# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Asociační studie – retrospektivní – **studie případů a kontrol (case-control studies)**

- **nepřímé studie**

- když jsou alely v těsné blízkosti, segregují společně a dochází zde k minimálnímu crossing-overu - dva lokusy jsou ve **vazebné nerovnováze** (Linkage disequilibrium, LD, allelic or gametic disequilibrium)
- síla LD, a tedy hustota pokrytí genomu markery, je pro tyto studie stěžejní

# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Asociační studie – prospektivní

- **“cohort” studie**

- z populace se vybere vzorek subjektů (kohorta), kteří v době výběru netrpí danou chorobou
- zjišťováním přítomnosti příslušných genetických markerů v jejich genetické výbavě se vymezí skupina, u které se vyskytuje studovaný rizikový faktor
- skupina je po určitou dobu sledována, zpravidla jde o několik let
- poté se porovnávají alelické frekvence osob, u nichž došlo k rozvoji dané choroby (fenotypu) a ostatních, u kterých se tato choroba neprojevila

# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Asociační studie – prospektivní – “cohort” studie

- **relativní riziko (RR)**

- poměr incidence onemocnění v exponované skupině ku incidenci v neexponované skupině
- porovnává riziko vzniku nemoci při nosičství určité alely s rizikem bez nosičství této alely
- u vzácných onemocnění se přibližně rovná i OR ( $B < D$  a  $A < C$ )

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

		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



# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Asociační studie – prospektivní – “cohort” studie

- nejprve je tedy určen rizikový faktor a až poté sledujeme, zda dojde k rozvinutí onemocnění
- rovněž je možno sledovat populaci nemocných např. s ohledem na rychlost progresu nemoci či úmrtí
- jestliže se smíříme s délkou trvání těchto metod (a tedy typicky většími finančními a personálními náklady), získáme hned několik výhod
- můžeme vyjádřit RR dané alely a **nemusíme řešit častý problém s výběrem kontrolní skupiny**

# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Asociační studie – Test nerovnováhy přenosu (angl. transmission disequilibrium test, TDT)

- ke studiu se využívají tzv. **tria**, které tvoří vždy dítě, postižené danou chorobou, a jeho rodiče, kteří ovšem **musejí být v kandidátním lokusu heterozygoty**
- protože se jedná o heterozygoty, **můžeme snadno zjistit, která alela pochází od kterého rodiče**
- měří se frekvence, s jakou se na dítě přenáší kandidátní alely, a frekvence, s jakou se na něj přenáší alely alternativní – porovnávání
  - shoda = alela se na vzniku onemocnění neúčastní
  - rozdíl = alela je s chorobou v asociaci (jedná se o aplikaci McNemarova testu)

# Komplexní choroby

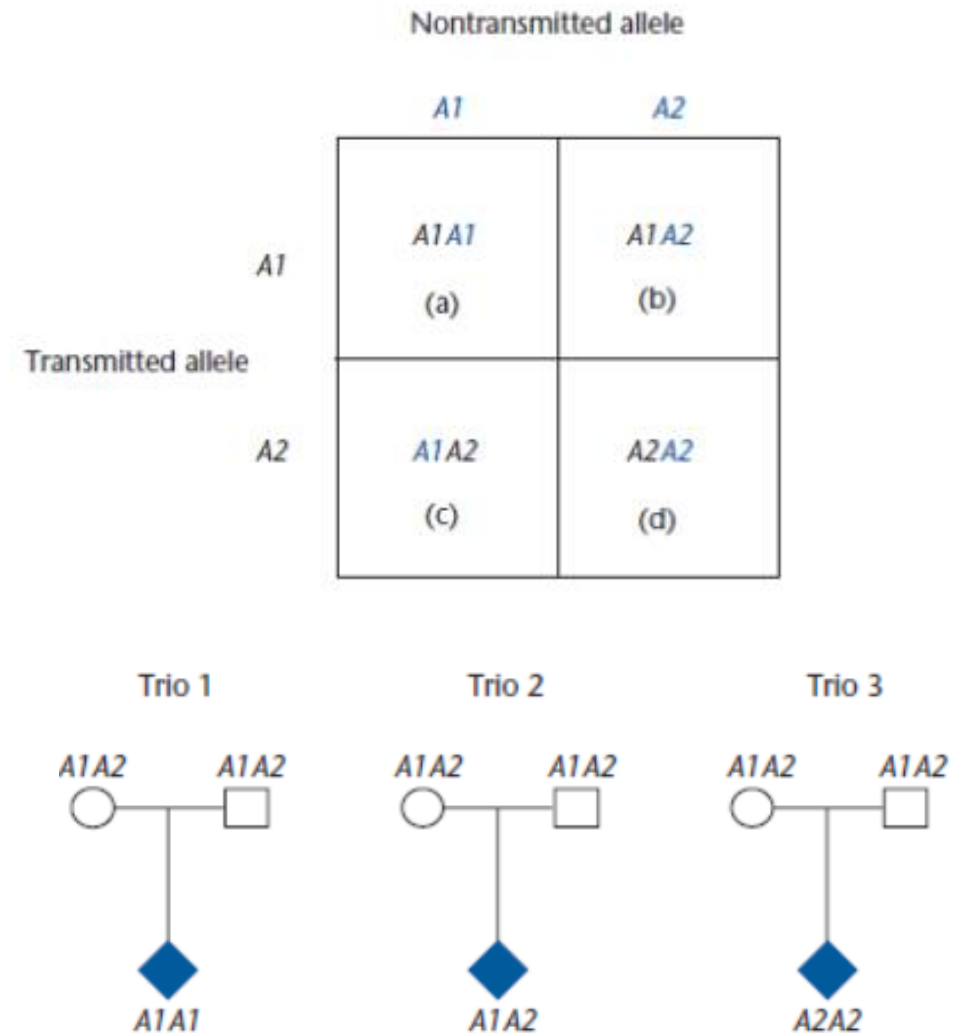
## Design genetických studií

### – Asociační studie – TDT

- nevýhoda pro nemoci s pozdním nástupem

Trio	Number of trios	Transmitted alleles	
		A1	A2
1	20	40	
2	10	10	10
3	5		10
		50 (b)	20 (c)

$$\chi^2 = \frac{(b - c)^2}{b + c} = \frac{(50 - 20)^2}{70} = 12.86; 1df; p < 0.001. \text{ The difference is significant.}$$



# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Asociační studie

- kauzální souvislost
- přirozená selekce
- populační stratifikace
- statistický artefakt

○ hodnoty pravděpodobností asociačních studií **musí být korigovány**:

ne  $p=0,05$  (event.  $0,01$ ) ale  $p=0,05/m$  (Bonferonni correction)

$m$ =počet zároveň provedených testů

- linkage disequilibrium

# Komplexní choroby

## Design genetických studií

### – Asociační studie

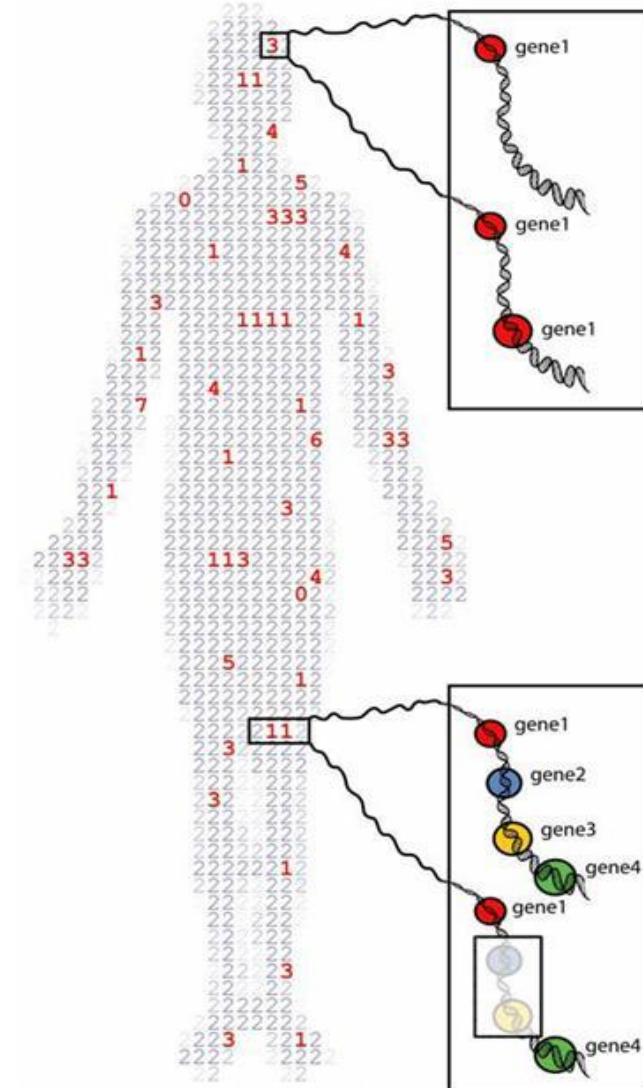
- v klinické praxi často kolísá názor na výsledky genetických studií
- neodůvodněné očekávání nalezení genů velkého účinku
- velká skepse k existenci genetického podkladu u nemocí, které jsou v populaci časté (>1 %)

# Komplexní choroby

Metody molekulární genetiky při studiu těchto chorob

## – Variabilita počtu kopií genu (CNV)

- v roce 2004 objevena nová forma strukturní variability lidského genomu
- CNV dnes tvoří asi 12 % lidského genomu
- CNV se podílejí na genetické variabilitě jedinců



Copy number variation in the human genome

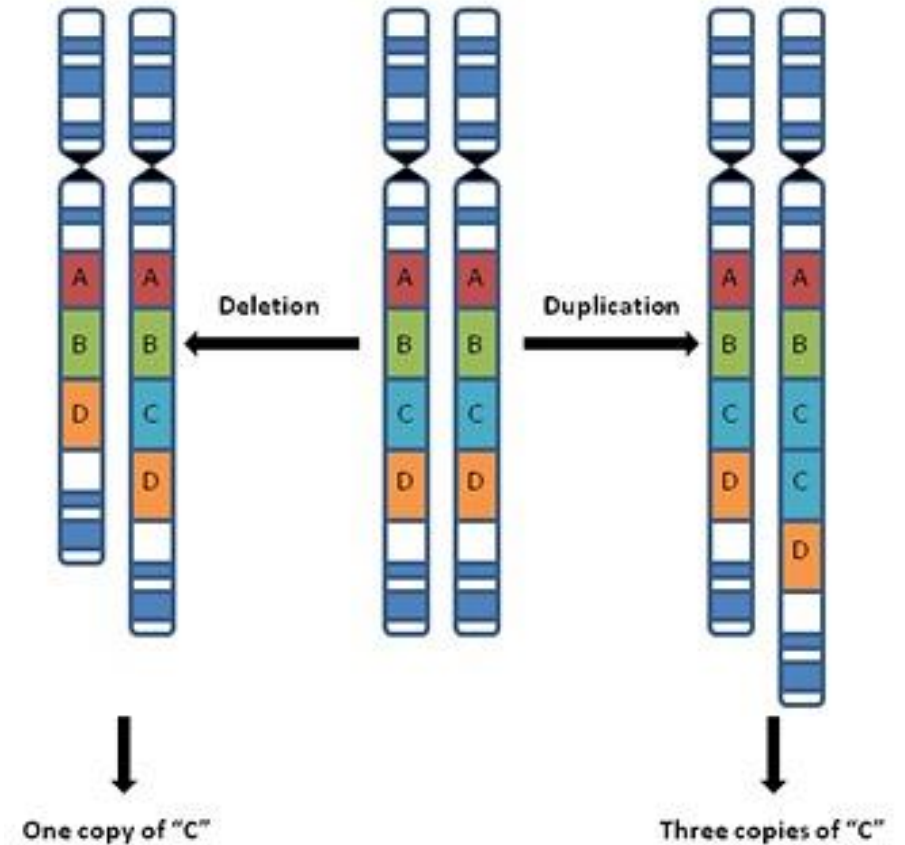
<http://cnv.gene-quantification.info/>

# Komplexní choroby

Metody molekulární genetiky při studiu těchto chorob

## – Variabilita počtu kopií genu (CNV)

- pokud CNV ve formě delecí/duplikací postihují důležité geny, mohou způsobovat genetické choroby
- CNV mapování (cytogenetické techniky, karyotypizace se SNP sondou, NGS)
- CNV asociovány s nádorovými onemocněními, autismem, schizofrenií a dalšími



# Komplexní choroby

Metody molekulární genetiky při studiu těchto chorob

## – Jednonukleotidové polymorfizmy (SNPs)

- v regulačních oblastech, intronech i exonech
- důsledkem může být:
  - změna AA
  - ukončení translace, a tím pádem zkrácení polypeptidu (často dochází k rychlé degradaci)
  - vliv na sestřih, transkripci nebo stabilitu mRNA
- cca 7 milionů známých lidských SNPs v dbSNP databázi
- HapMap projekt – běžné SNPs s MAF>5 %, populační rozdíly
- Haploview – k vizualizaci LD struktury dané oblasti genu



# Komplexní choroby

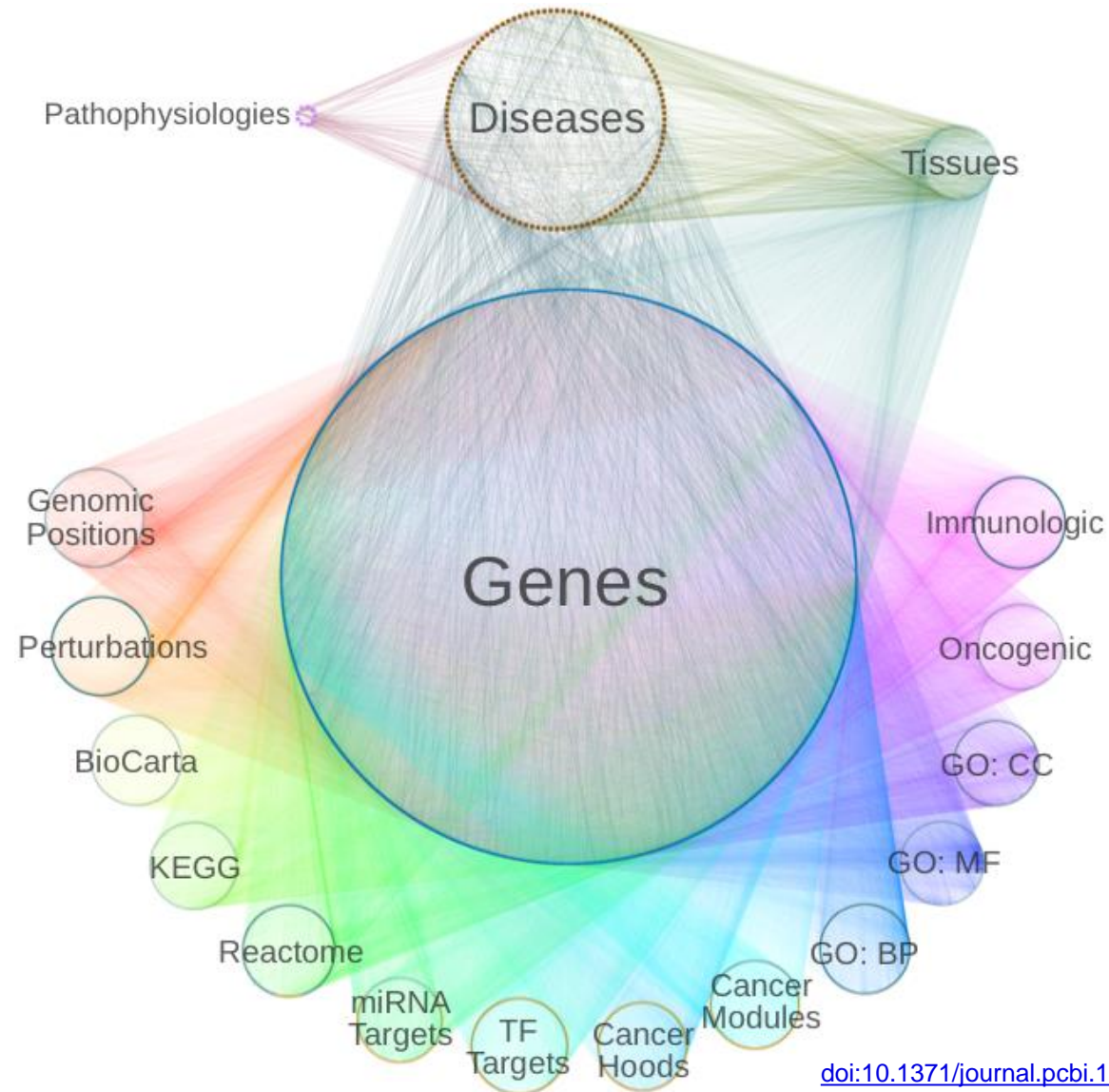
Metody molekulární genetiky při studiu těchto chorob

## – Nové směry (tzv. high-throughput techniky)

- multiplexing (určení velkého množství markerů v jediné reakci) nebo DNA pooling (zjištění alelické frekvence při smísení DNA vzorků více jedinců)
- DNA microarrays, SnaPshot, NGS, MS a další

# Komplexní choroby

Metody molekulární genetiky při studiu těchto chorob



# Komplexní choroby

Závěr – Otázky k hodnocení významu genetických faktorů u komplexních nemocí

- 1. Jak důležité jsou **genetické vlivy** u nejčastějších forem těchto 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?

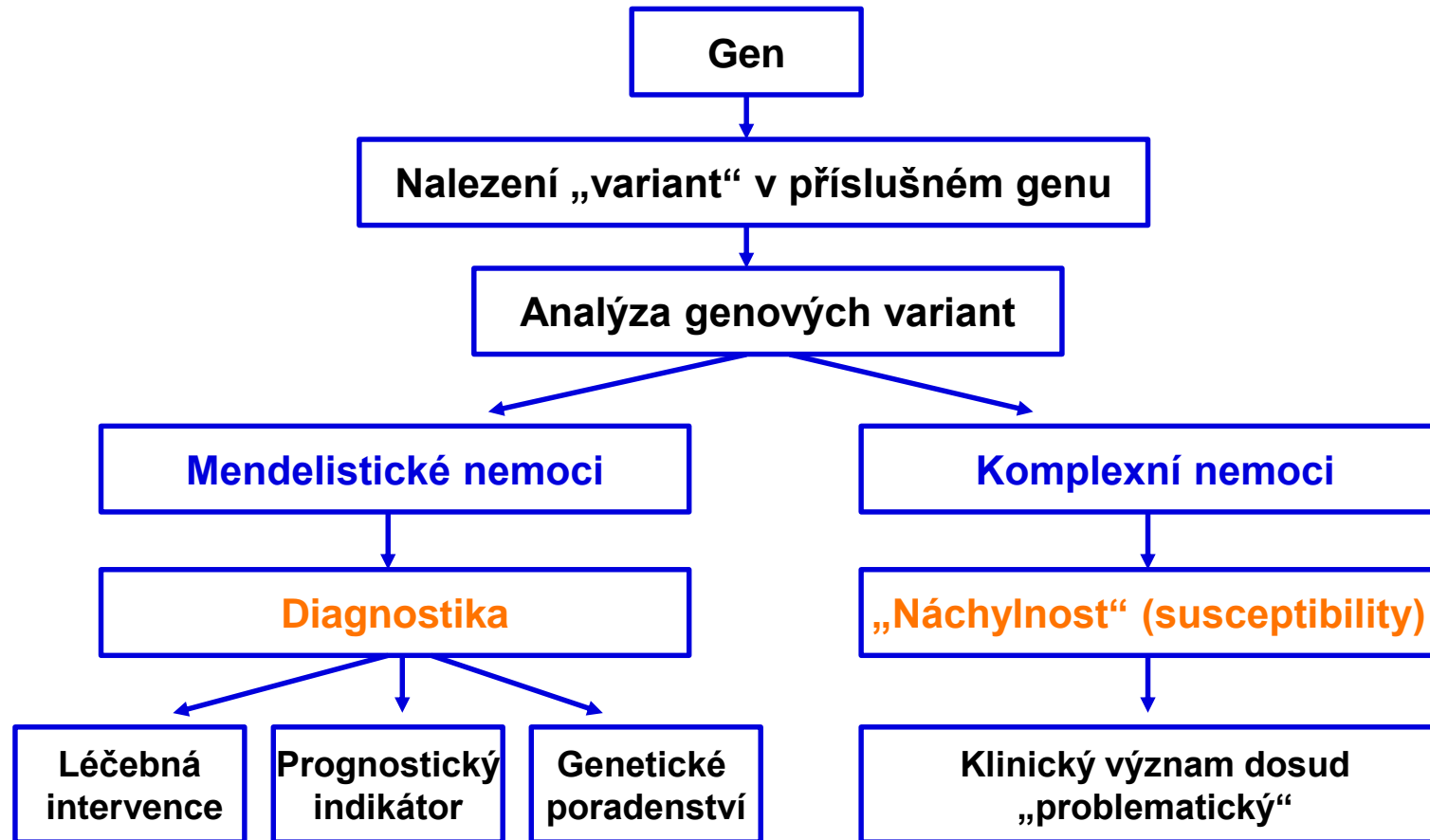
# Komplexní choroby

Závěr – Otázky k hodnocení významu genetických faktorů u komplexních nemocí

- 6. **Kolik genů** se podílí na vnímavosti k nemoci?
- 7. Jsou nejčastější formy polygenní 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**?

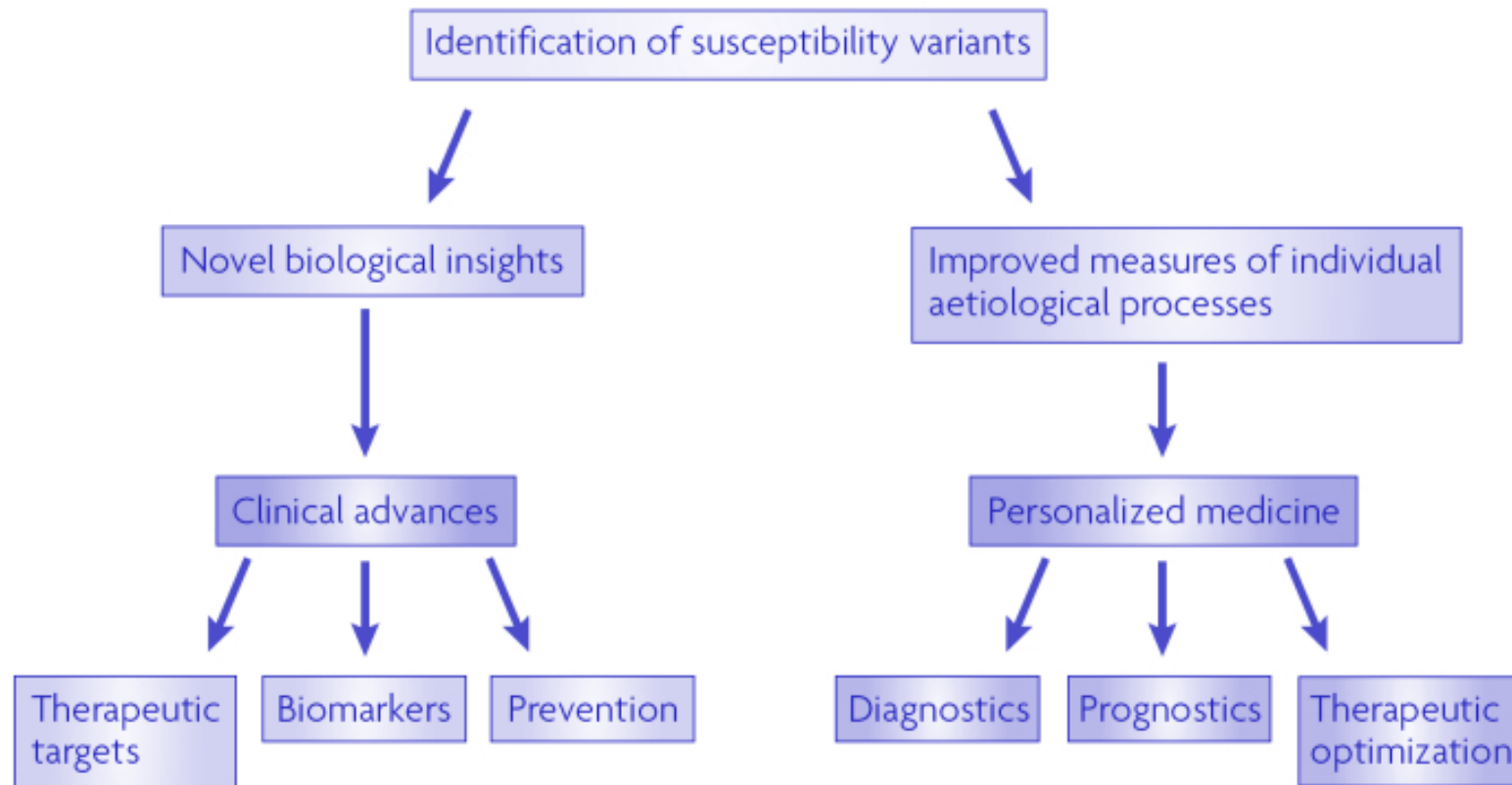
# Komplexní choroby

Závěr – Genetická analýza komplexních nemocí vs. monogenních chorob



# Komplexní choroby

Závěr – Cíle genetického výzkumu u komplexních nemocí



# Komplexní choroby

Závěr – 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 (individualizovaný přístup k terapii).**

# Informace o duševním vlastnictví

- Tato prezentace je autorským dílem vytvořeným zaměstnancem Masarykovy univerzity.
- Studenti kurzu/předmětu mají právo pořídit si kopii prezentace pro potřeby vlastního studia.
- Jakékoliv další šíření prezentace nebo její části bez svolení Masarykovy univerzity je v rozporu se zákonem.



**M A S A R Y K O V A**  
**U N I V E R Z I T A**