

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

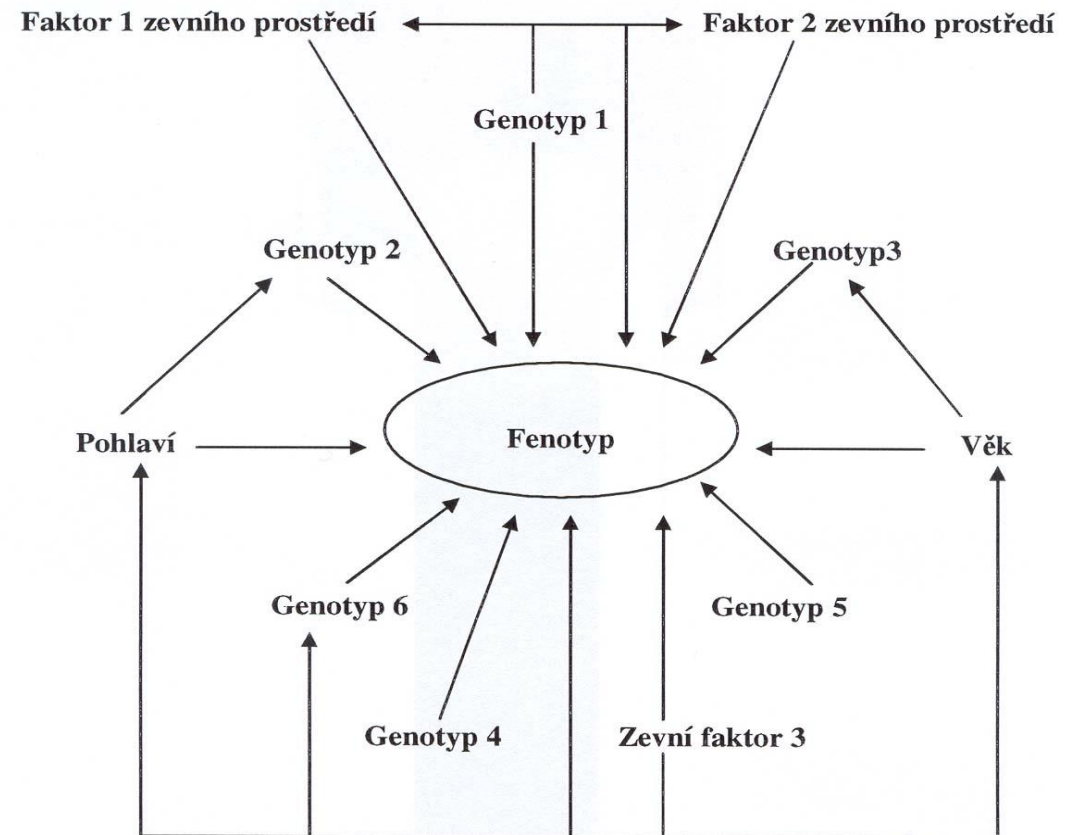
Komplexní choroby

Charakteristika

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

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

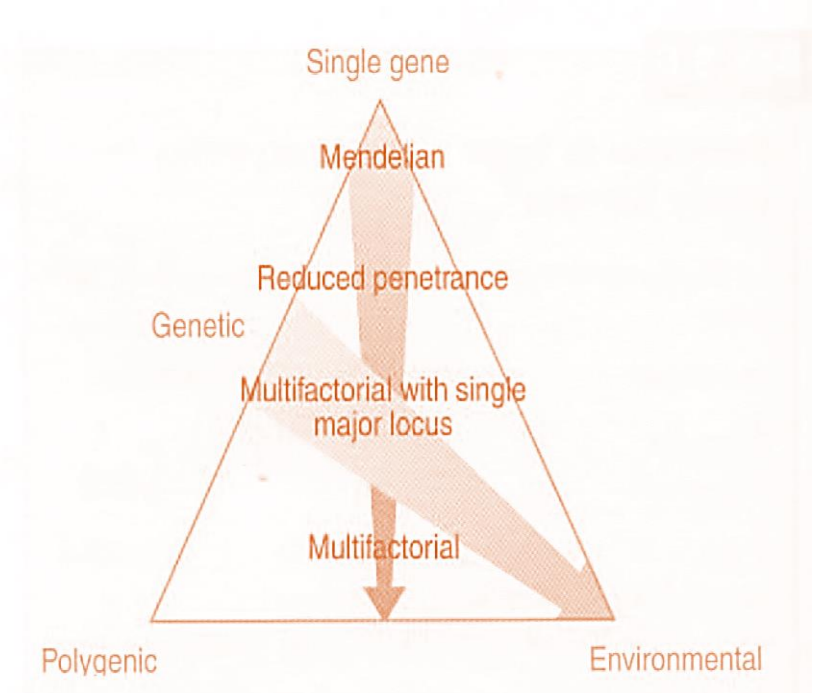
podílejících se na výsledném stavu – vzniku, rozvoji a průběhu onemocnění



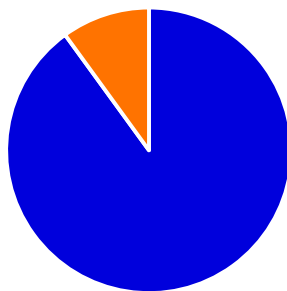
Komplexní choroby

Charakteristika

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

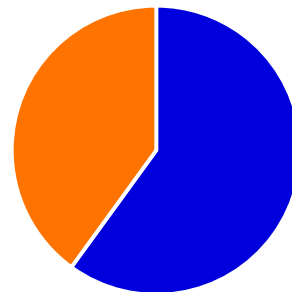


Monogenní

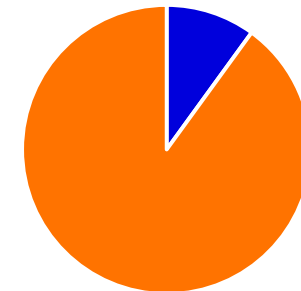


■ geny ■ další faktory

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

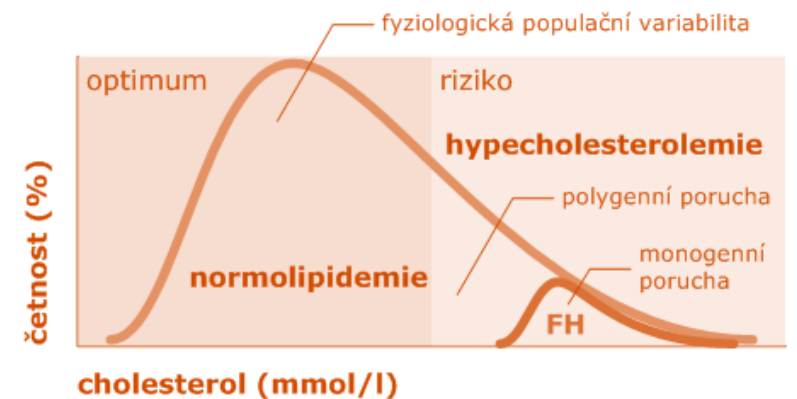
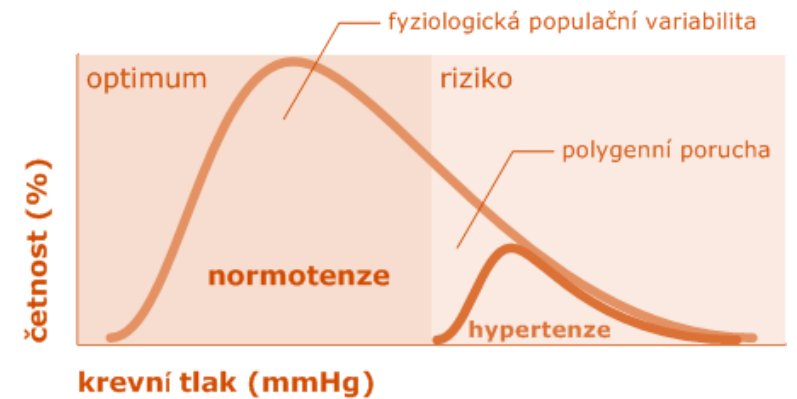
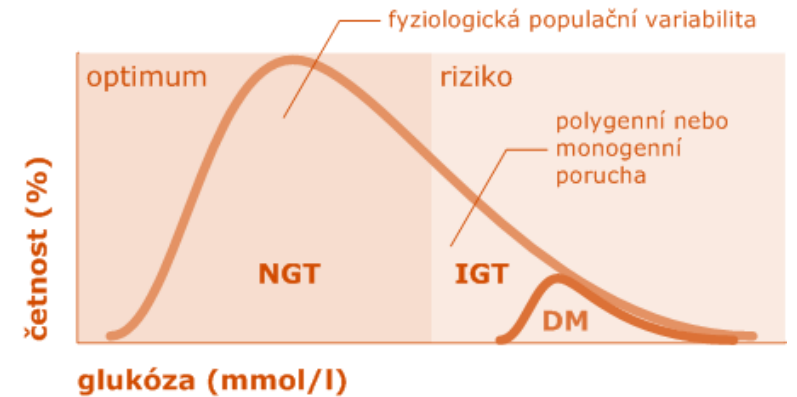
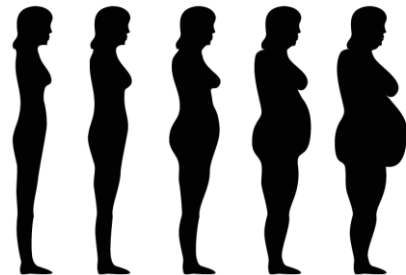
Charakteristika

- 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

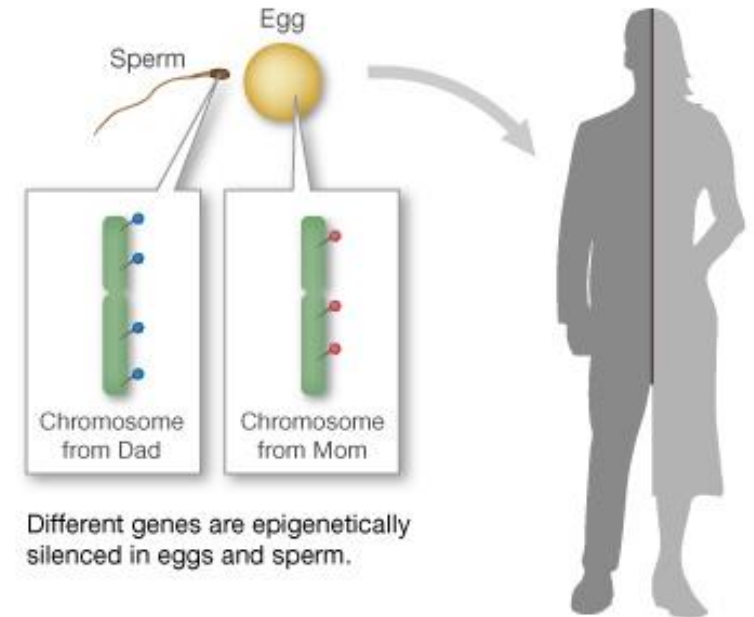
Problematika studia komplexních chorob

– 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:

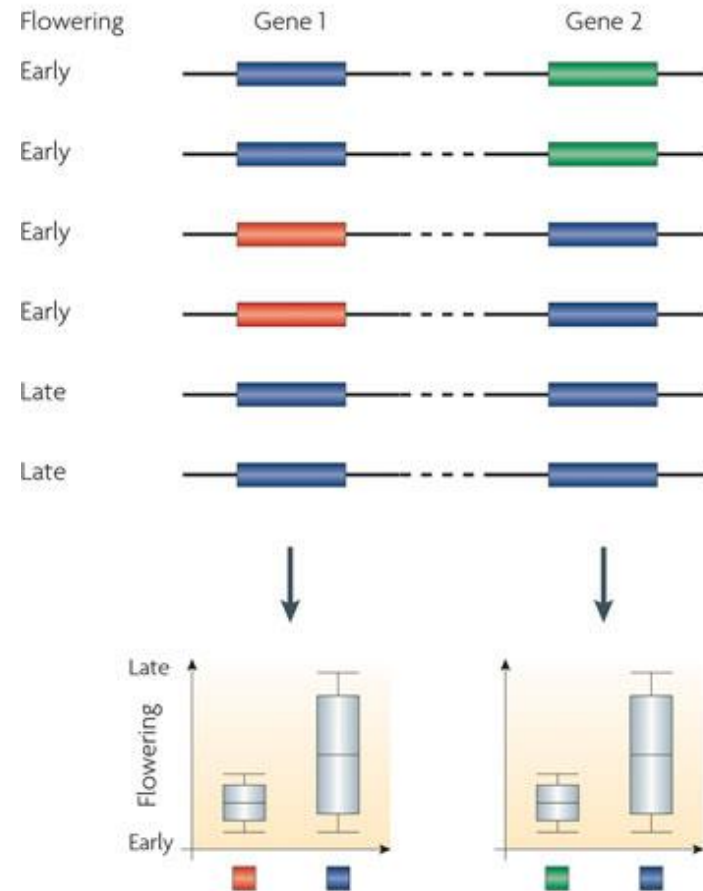
- v genech ležících na různých lokusech (= **lokusová heterogenita**)
- v jednotlivých genech může být přítom vícero mutací či polymorfizmů (= **alelická heterogenita**)

Komplexní choroby

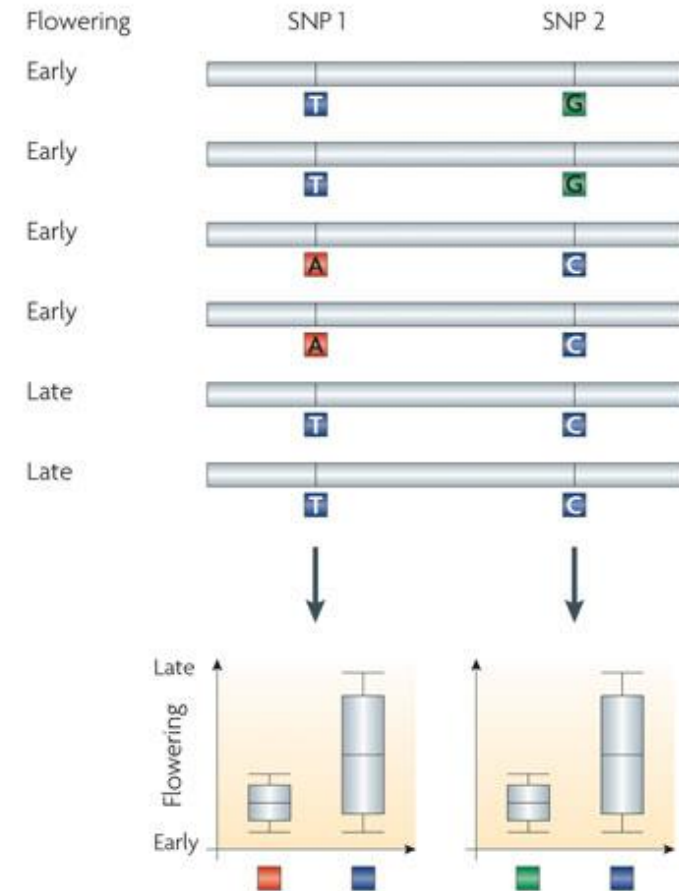
Problematika studia komplexních chorob

– genetická heterogenita

a Genetic heterogeneity



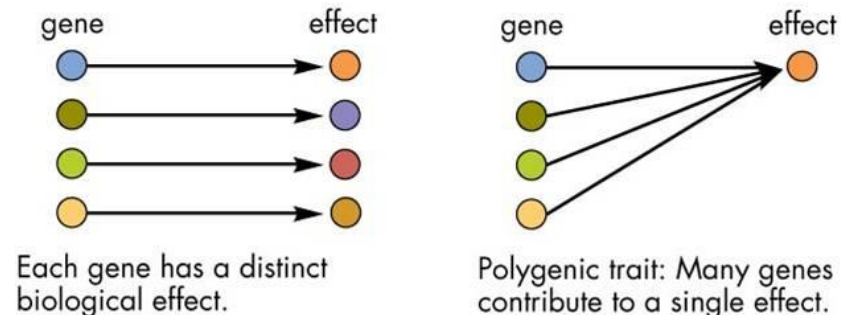
b Allelic heterogeneity



Komplexní choroby

Problematika studia komplexních chorob

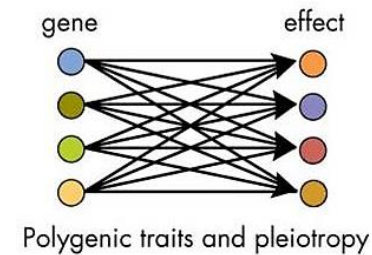
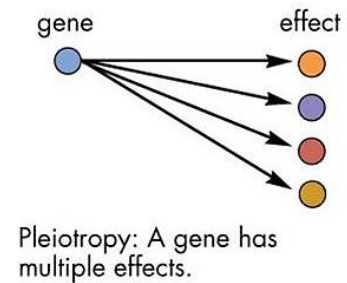
- vysokou populační frekvencí alel zodpovědných za rozvoj patologického fenotypu
 - každá jednotlivá predisponující alela pravděpodobně není sama o sobě výrazně patogenní
- polygenní dědičností
 - predispozice k rozvoji patologického fenotypu se zvyšuje pouze při simultánním výskytu určitého souboru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



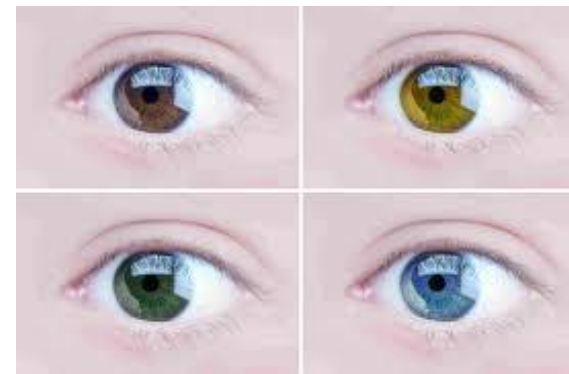
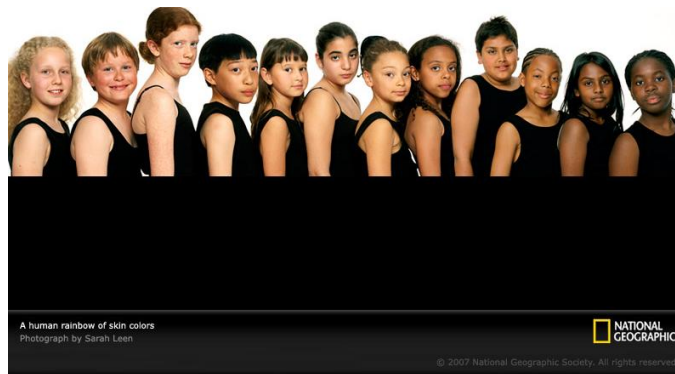
Komplexní choroby

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

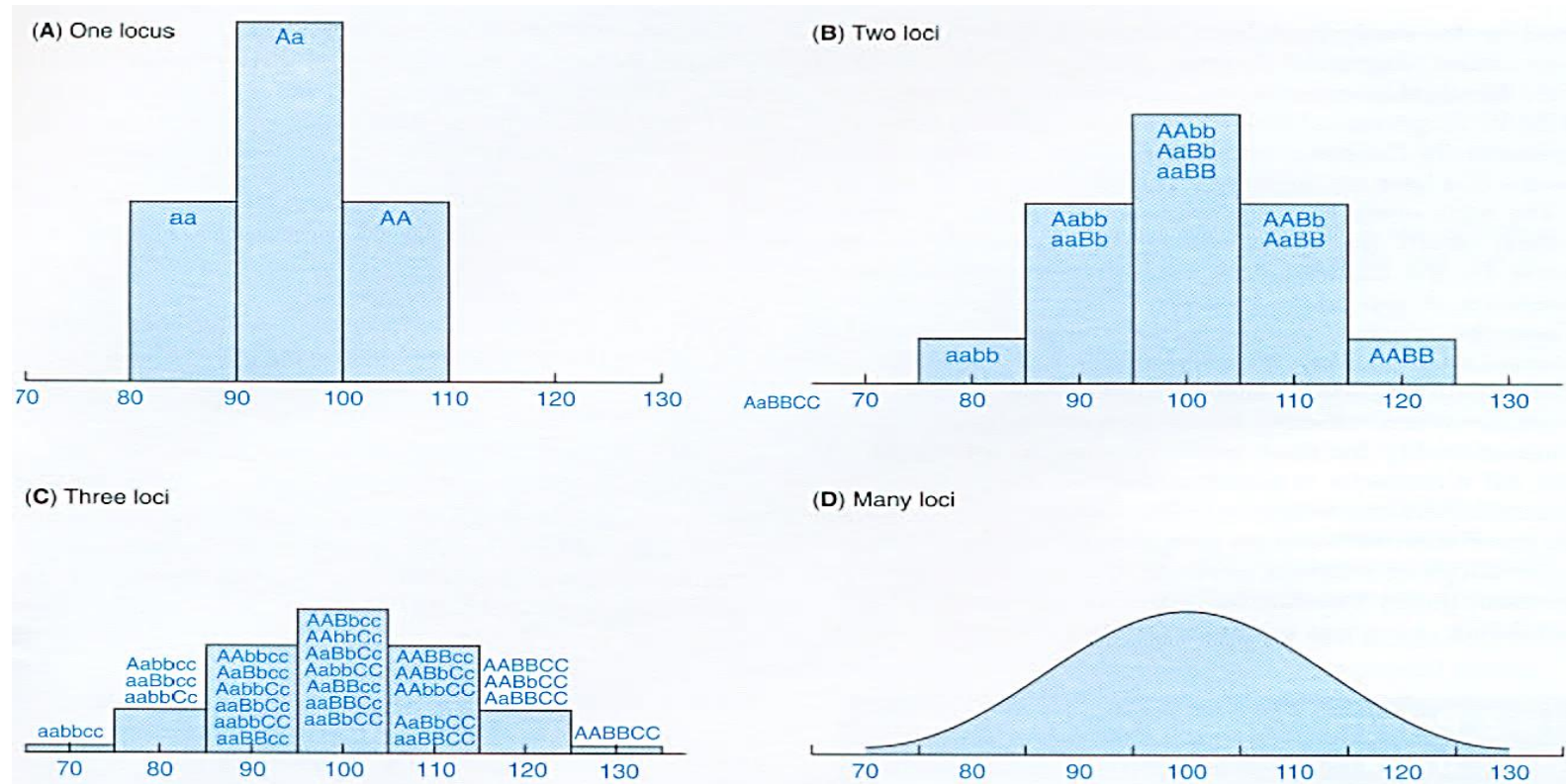
Typ dědičnosti chorob	Incidence při narození (na 1000)	Prevalence ve věku 25 let (na 1000)	Prevalence v populaci (na 1000)
genomové a chromozomové mutace	6	1,8	3,8
monogenní mutace	10	3,6	20
multifaktoriální	~ 50	~ 50	~ 600

	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 přinášejí 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

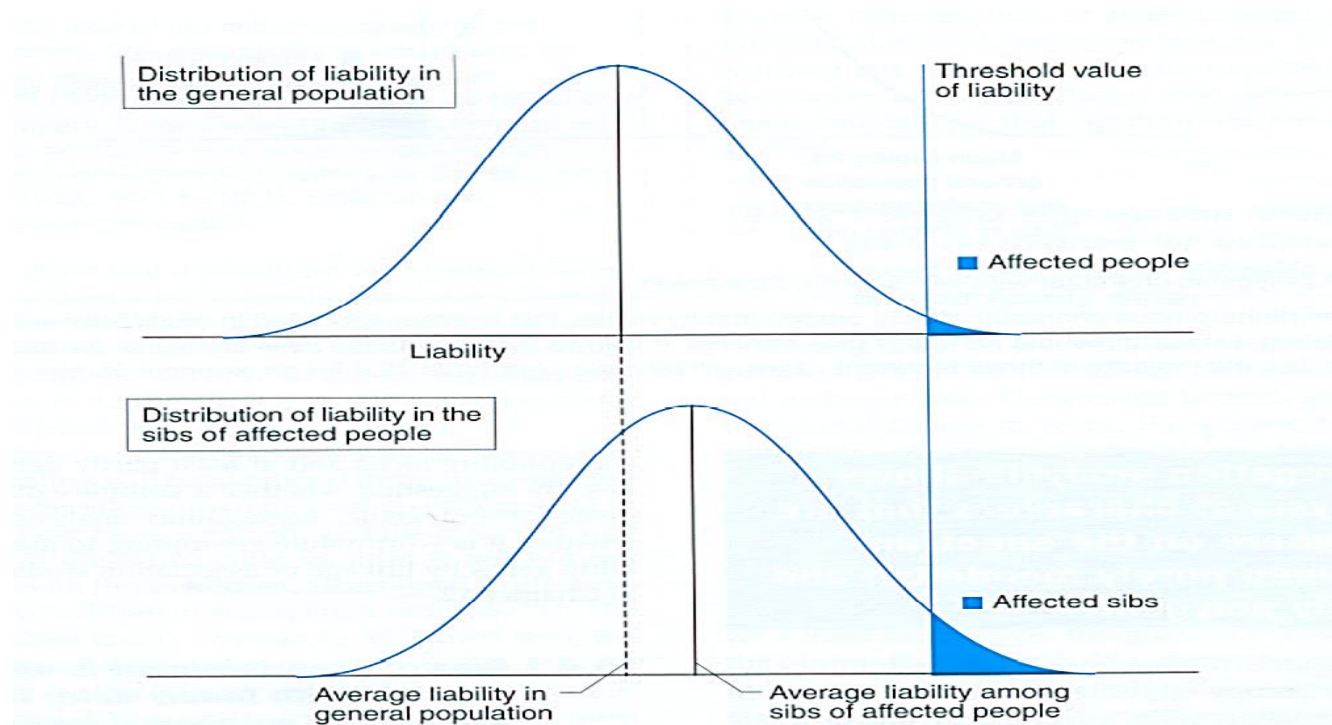
– 1918 R. A. Fisher - **polygenní model**



Komplexní choroby

Základy genetiky komplexních stavů – modely

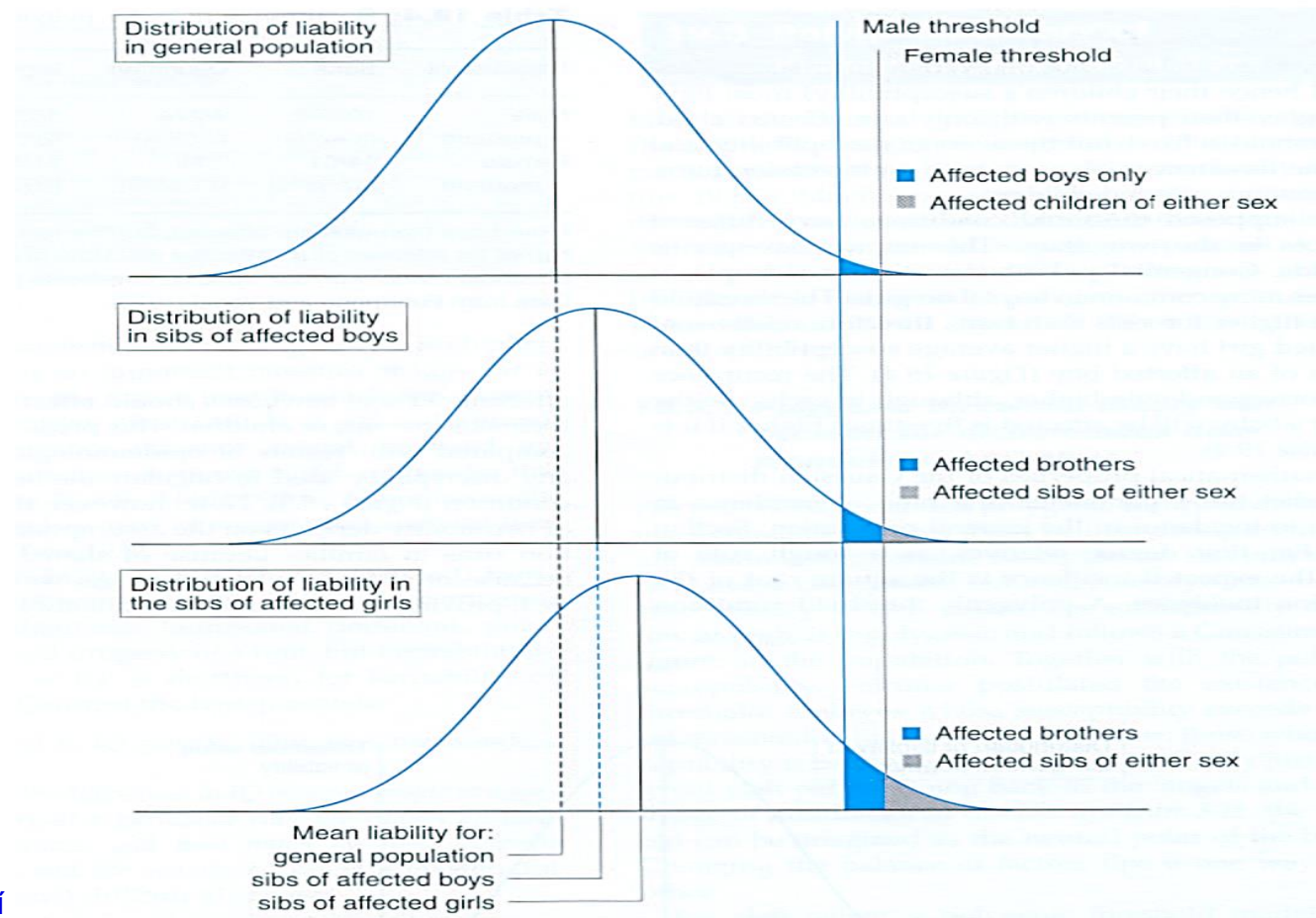
- v polovině 60. let přišel s tzv. **prahovým modelem** D.S. Falconer (limitní počet recesivních alel způsobí vznik onemocnění)



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**

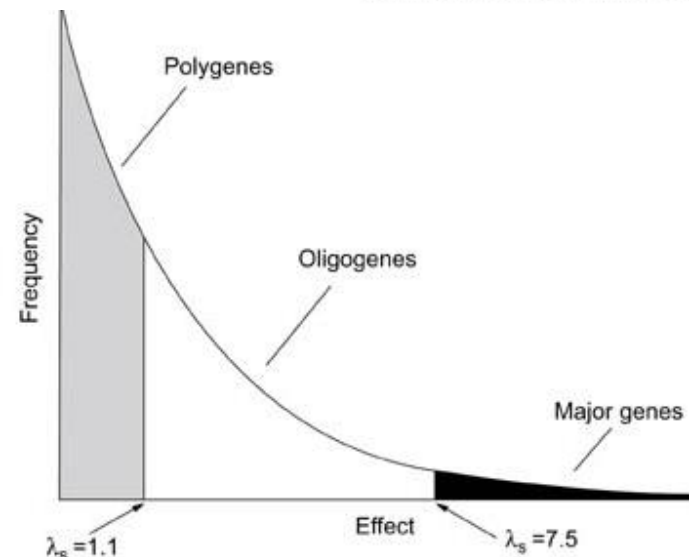
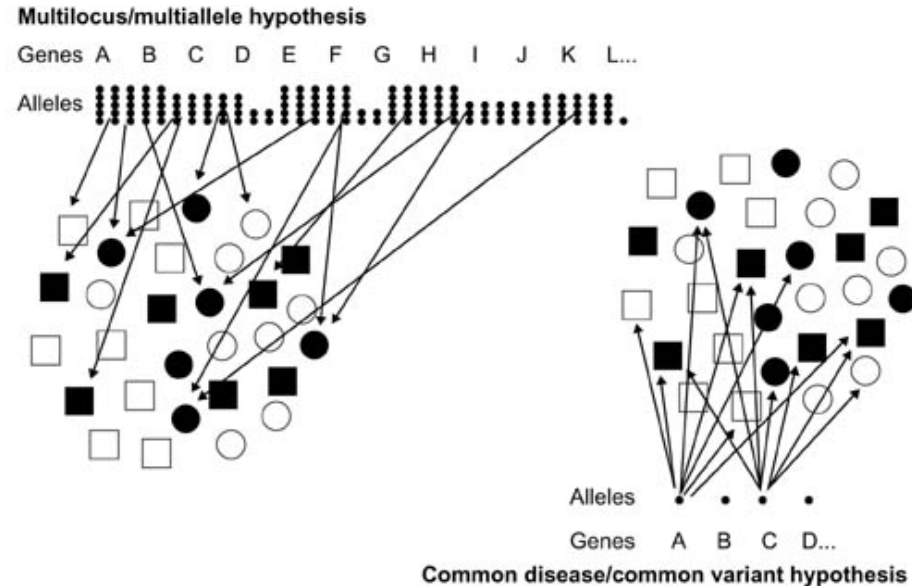


vyjádřeno **multiplikativním modelem**

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 λ (λ_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. λ_s („sibs“), λ_p („parents“)
- čím vyšší je hodnota λ , tím snazší je genetická analýza daného komplexního znaku

Komplexní choroby

Základy genetiky komplexních stavů

– Familiární výskyt nemocí

- definovaný příbuzný – 1. stupně (dítě, rodič, sourozenec - λ_S)

Např. u DM 1. typu - $\lambda=15$

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

u astmatu - $\lambda=3,5$

u cystické fibrózy má λ kolem 500

- hlavní příčiny rozptylu hodnot λ 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 λ_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

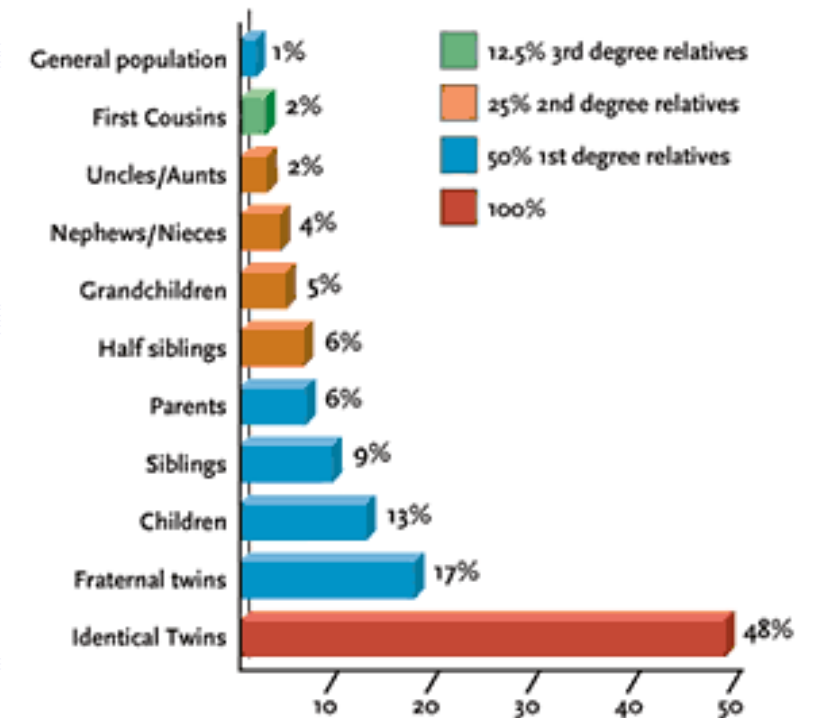
Základy genetiky komplexních stavů

- Podíly relativního rizika λ_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	λ_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 (%)	
	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 JI, 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 čítec, 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)

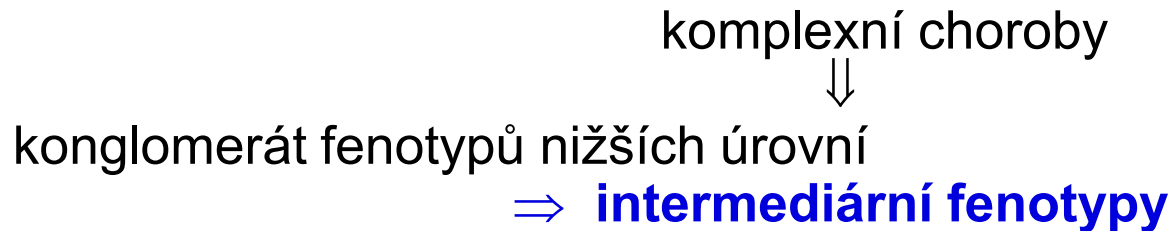
Astma	60 %
Krevní tlak	40-70%
Kostní denzita	60-80%
Degenerace plotének	60-80%
IDDM	70%
Obezita	50-90%
Osteoartritida	50-70%
Revmatoidní artritida	60%
Ulcerativní kolitida	50%

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

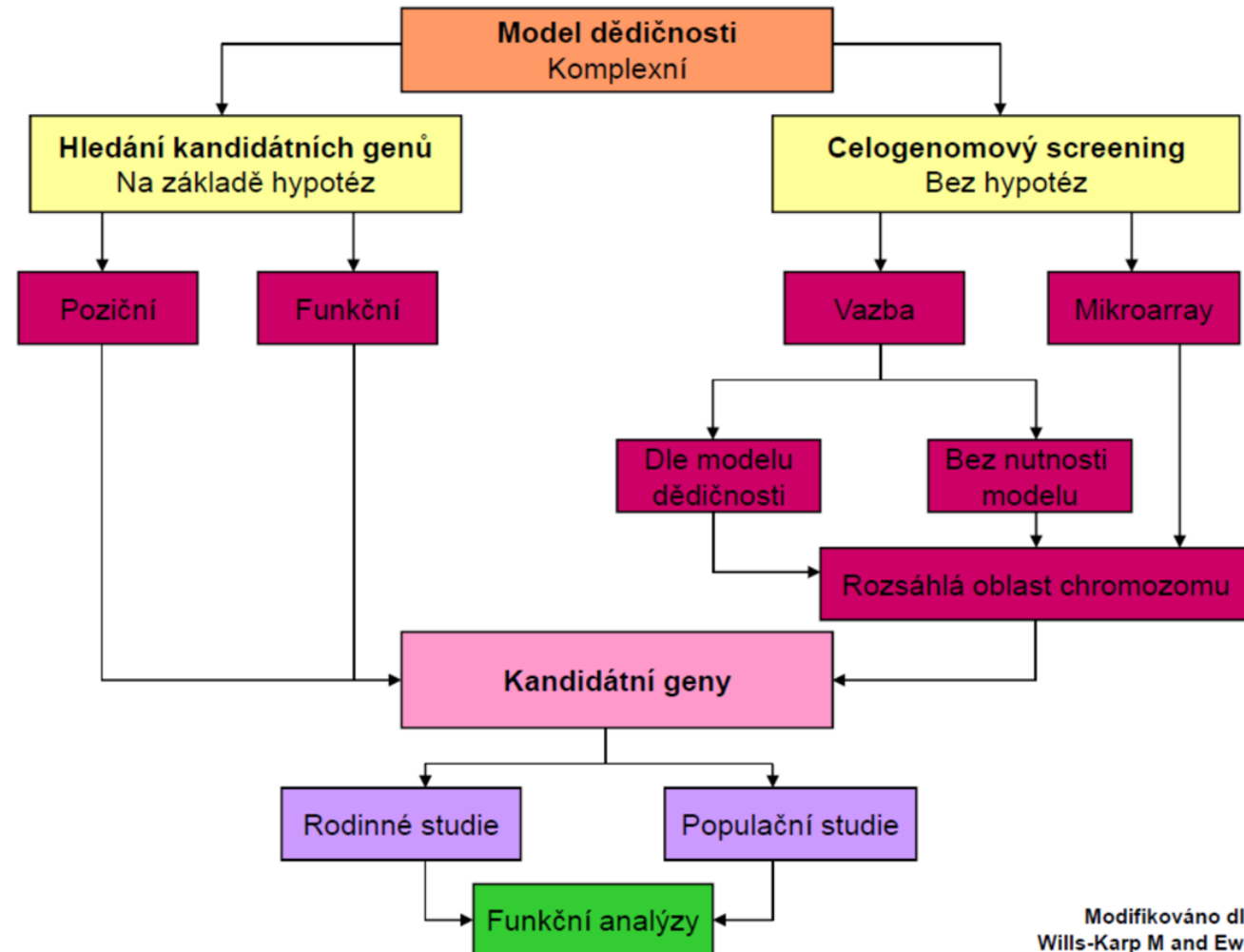
– Genetická analýza komplexních nemocí – fáze studia:

- 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

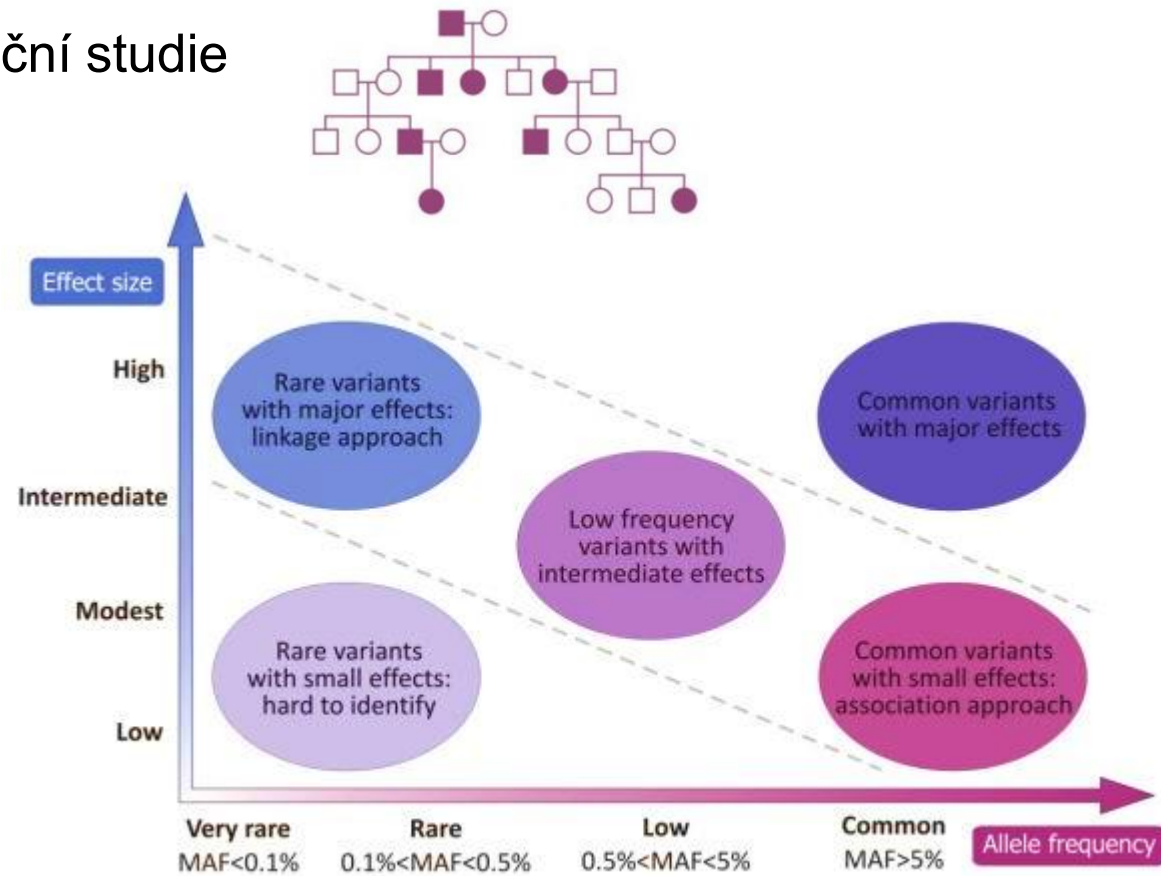
např. **case-control** – studium několik SNPs

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 θ 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

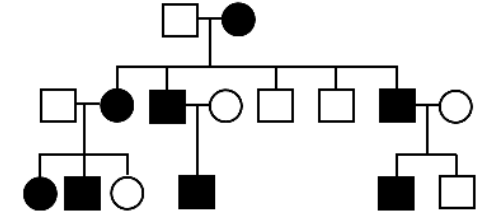
- testuje kosegregaci genového markeru a fenotypu nemoci v rodině
- marker a nemoc se v dané rodině mají vždy vyskytovat spolu

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

○ **vs. neparametrické metody**

Komplexní choroby

Design genetických studií



– Linkage (vazebná) analýza – parametrické metody

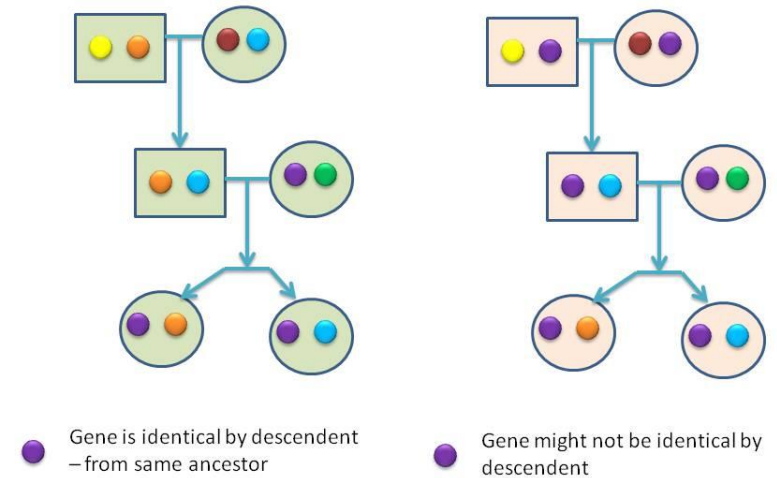
- je-li stanoven model dědičnosti (při genetickém mapování monogenních nemocí)
 - dostatek rodin, ve kterých daná nemoc postihuje alespoň dvě generace, a jasně definovaný fenotyp
 - hodnocení dle **LOD skóre** – logaritmus šance (odds), že tato vazba existuje. Konvenčně je LOD skóre 3 (šance 1000:1 ve 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

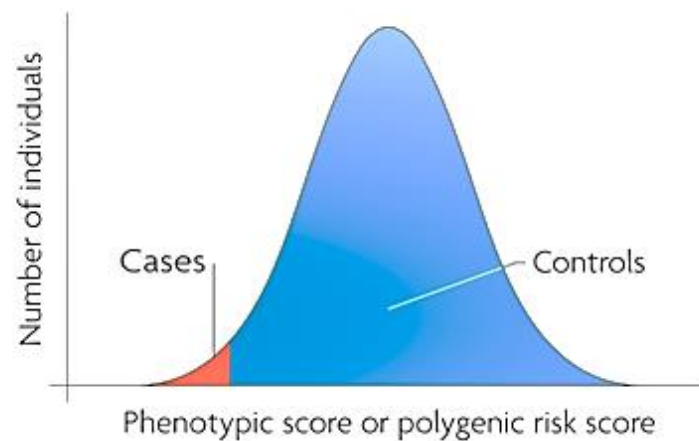
- **Asociační studie – retrospektivní – studie případů a kontrol (case-control studies)**
 - srovnávání frekvencí alel studovaného genu mezi dvěma skupinami nepříbuzných osob ze stejné populace (zamezení tzv. stratifikace)
 - u metod retrospektivních se vyvinula daná nemoc a až poté se zjišťuje, zda 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

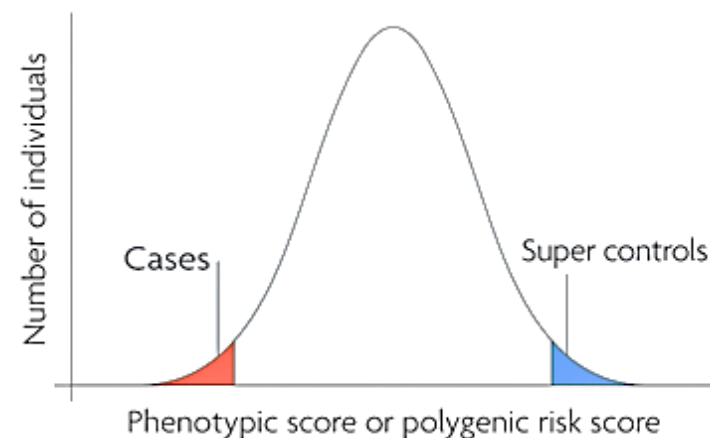
Design genetických studií

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

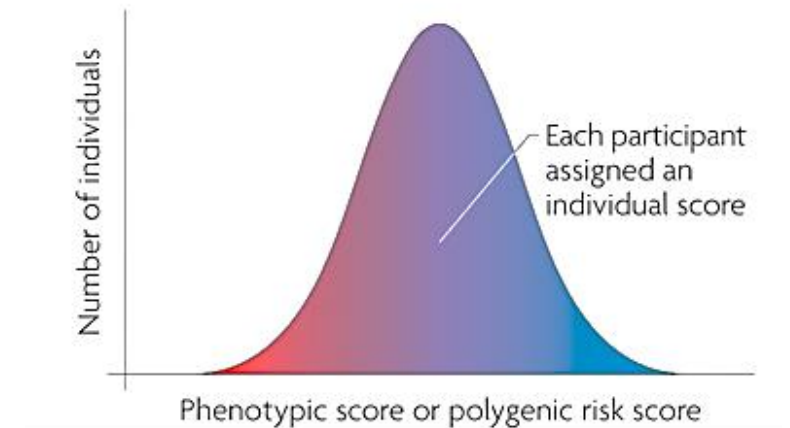
a Case-control



b Extreme selection



c Quantitative measurement



http://www.nature.com/nrg/journal/v10/n12/box/nrg2670_BX3.html

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**

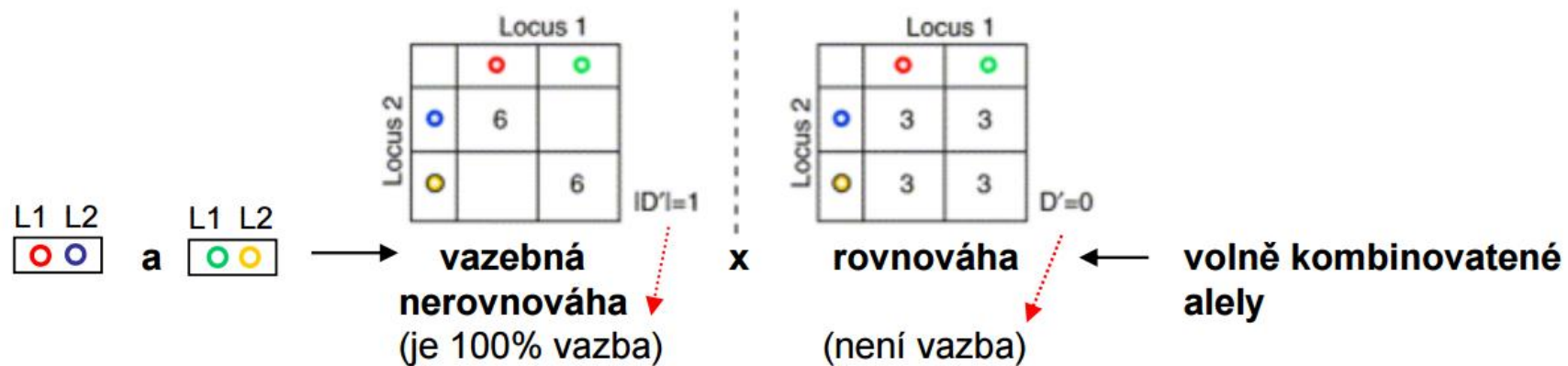
- předpokládá se, že sledovaný marker je zároveň patogenetickým lokusem pro nemoc a má tedy hypoteticky přímý (kauzální) efekt na fenotyp
- je tedy nutné vybrat několik kandidátních lokusů, které by mohly být přímo zodpovědné za danou nemoc

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

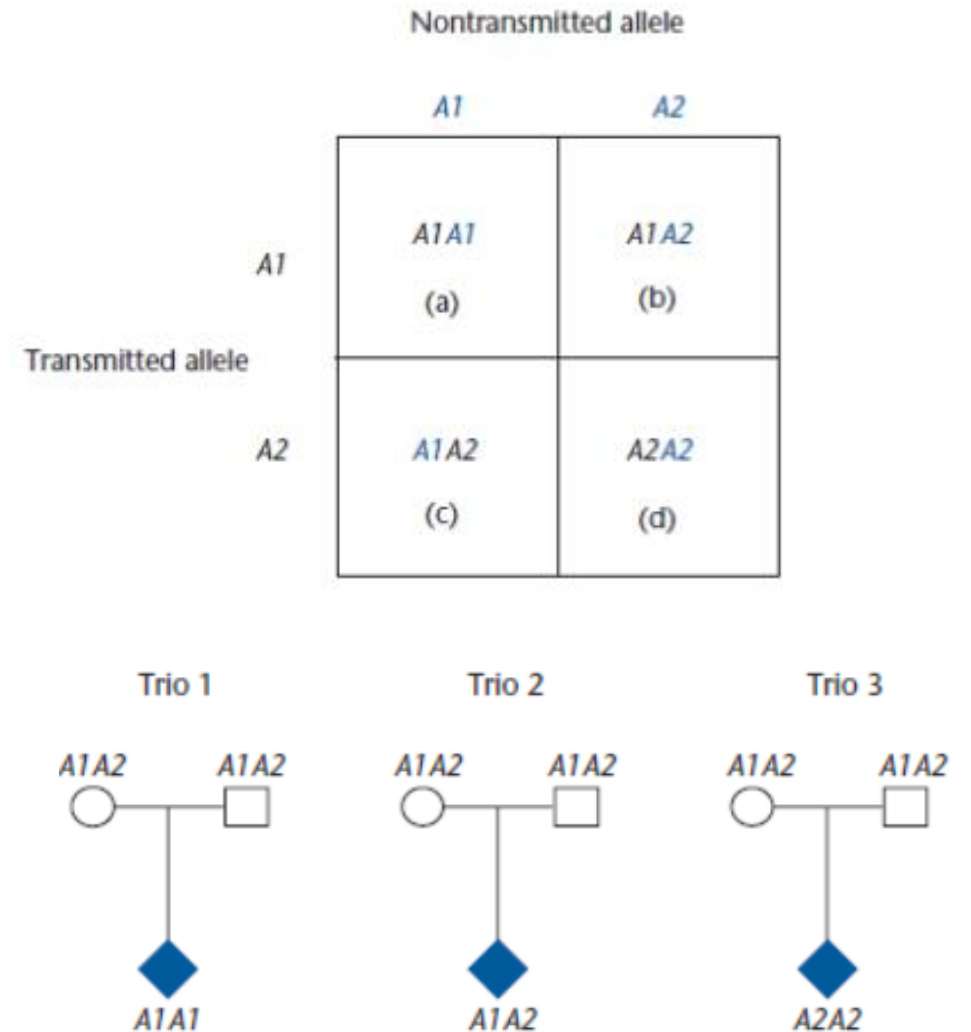
Design genetických studií

– 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

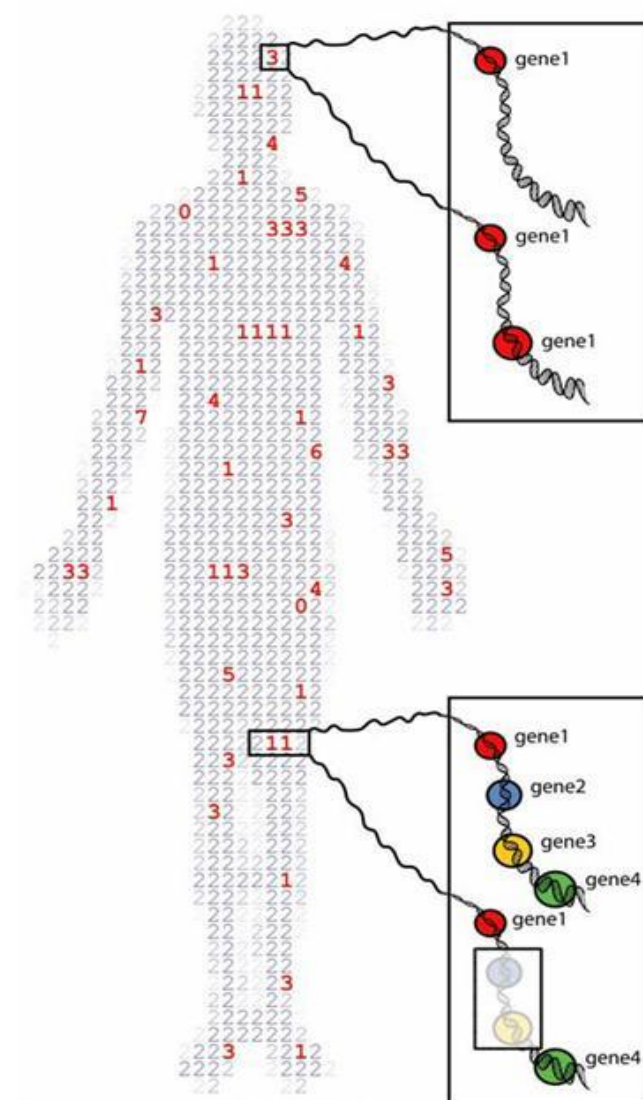
- v klinické praxi často kolísá názor na výsledky genetických studií
- neodůvodněné očekávání nalezení genů velkého účinku
- velká skepse k existenci genetického podkladu u nemocí, které jsou v populaci časté (>1 %)

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

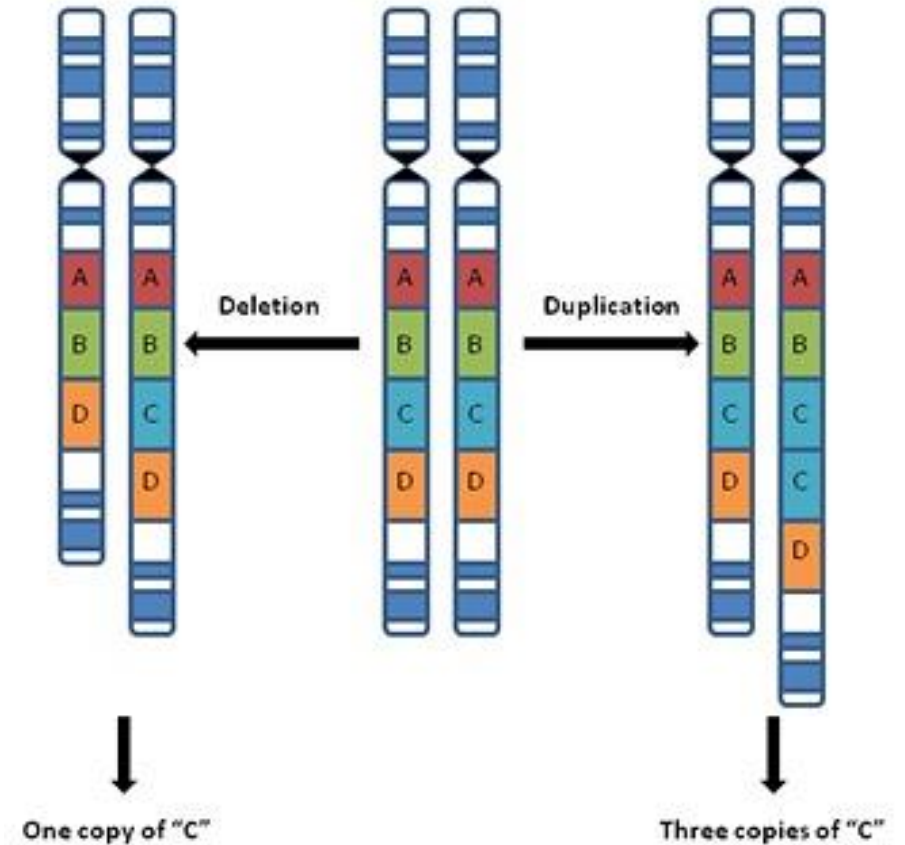
<http://cnv.gene-quantification.info/>

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

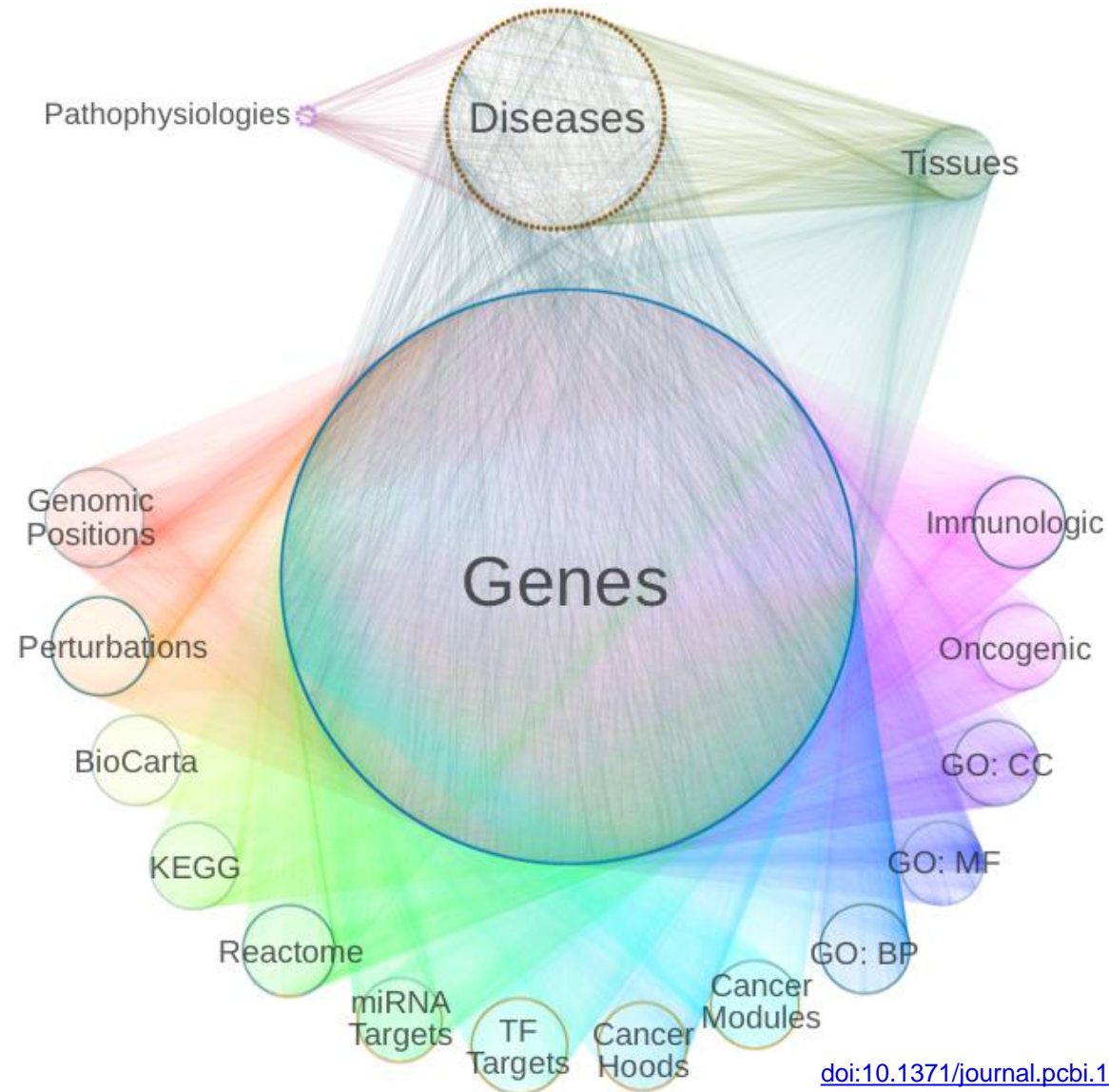
Metody molekulární genetiky při studiu těchto chorob

– 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?

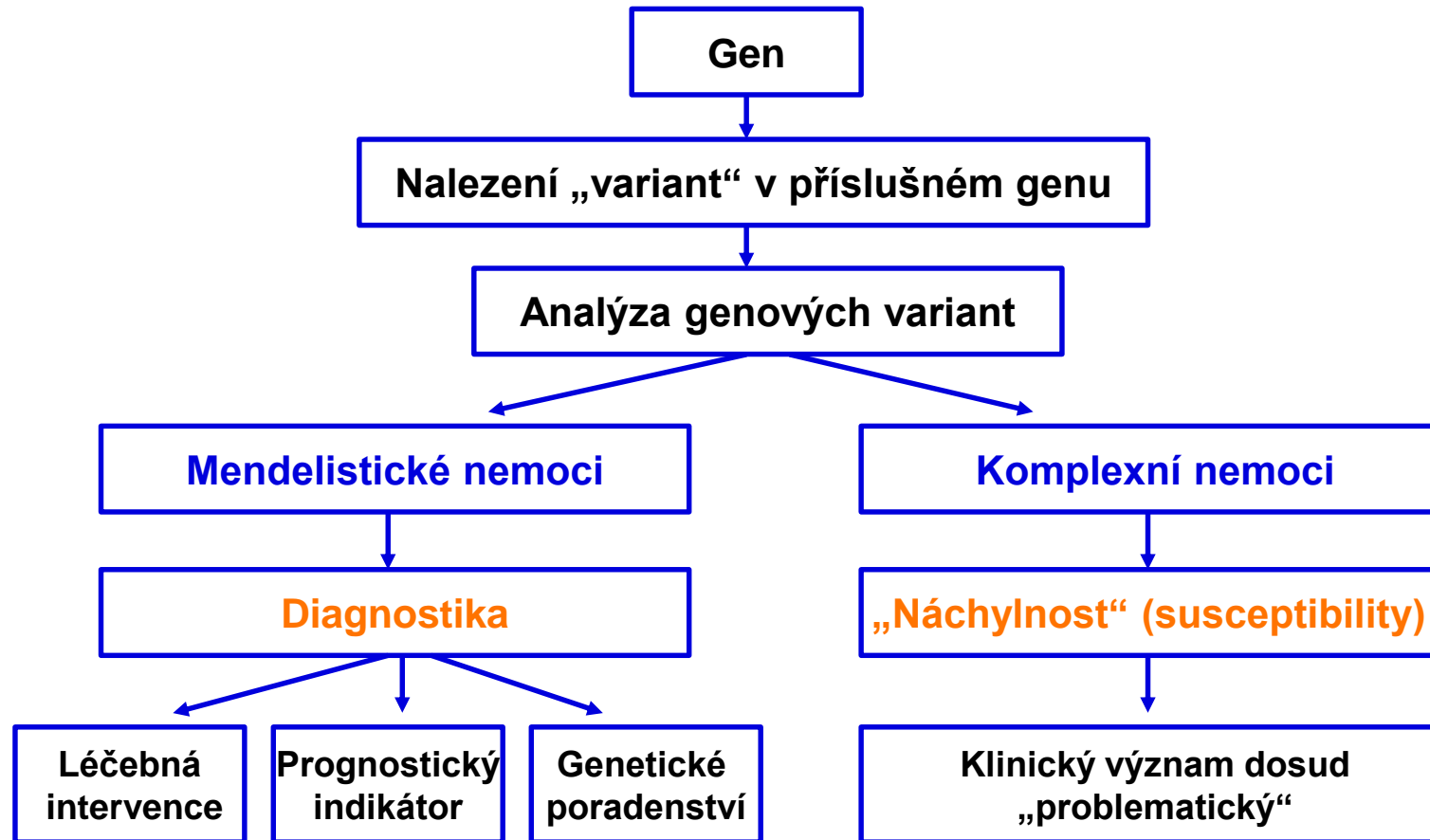
Komplexní choroby

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**?

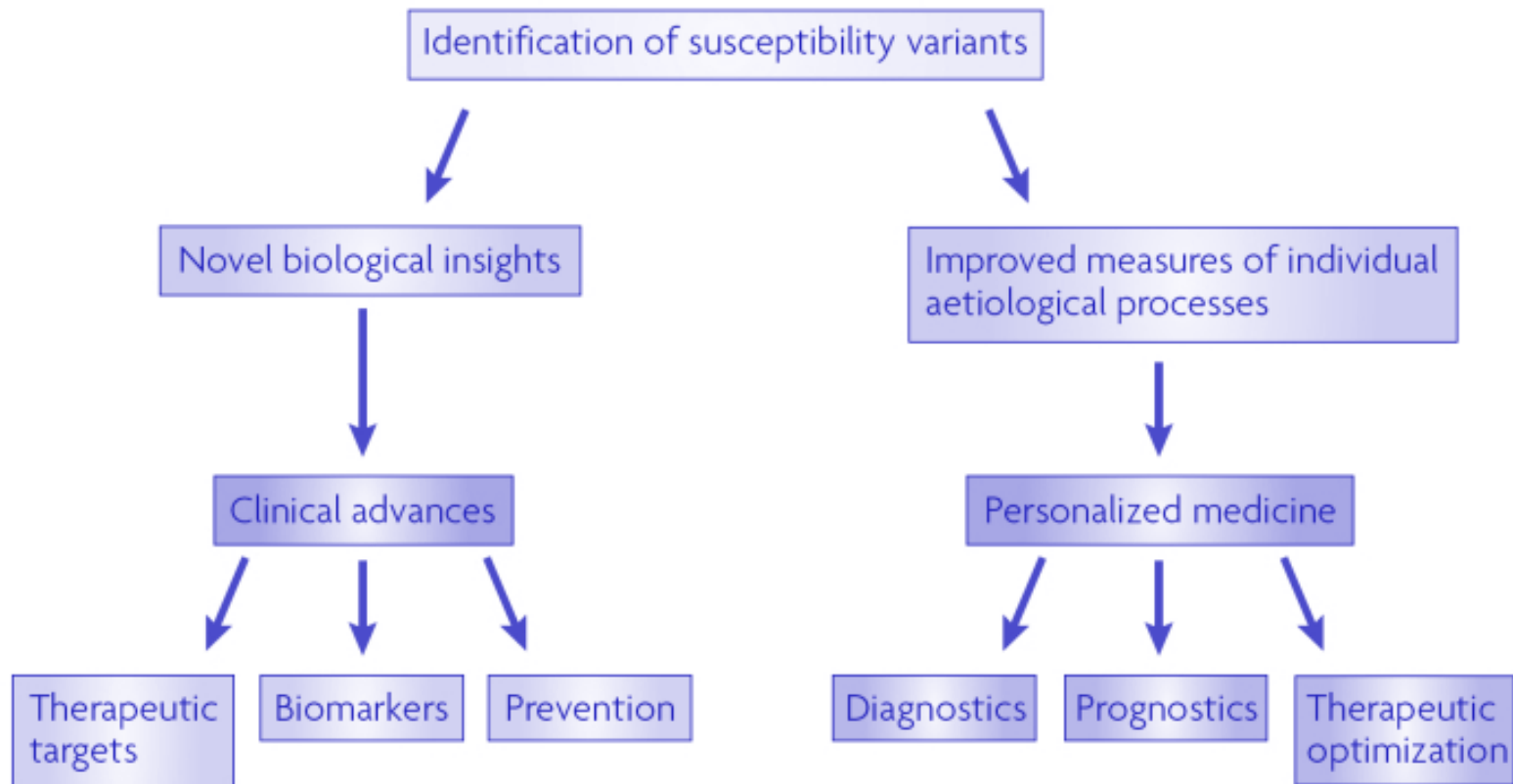
Komplexní choroby

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