

# Genetické asociační studie u komplexních onemocnění v neurologii

---

David Kemlink

# Dědičnost

- Monogenní dědičnost
  - mendelovské znaky
  - mutace 1 genu
- Komplexní (multifaktoriální) dědičnost
  - většina onemocnění (roztroušená skleróza, Alzheimerova choroba)





# Polymorfismus a mutace

---

- polymorfismus = variace v nukleotidové sekvenci DNA určitého lokusu (alely)
  - frekvence polymorfní alely v populaci  $> 1\%$
  - variace po každých 200 - 400 bp (daleko častěji např. v sekvencích genů HLA !)
  - fenotypově vyjádřený x nevyjádřený
  - výhodný, nevýhodný, neutrální
  - využití v nepřímé DNA diagnostice



# Polymorfismus a mutace

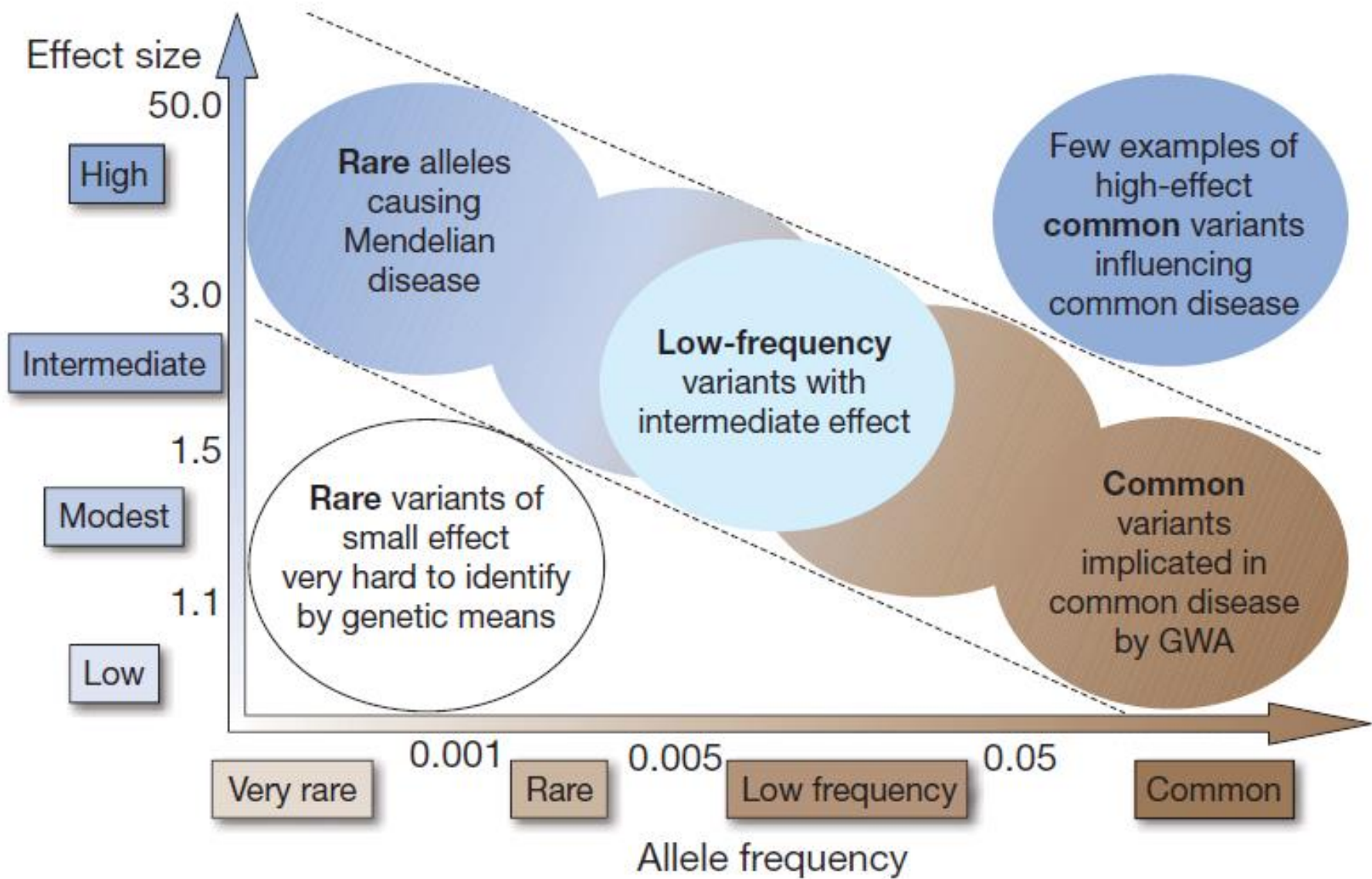
---

Podle rozsahu:

genomové – změny celé chromozom. sady (aneuploidie)

chromosomální – translokace, delece duplikace (vč. CNV – submikroskopické varianty, VNTR, mikrosatelity)

bodové – delece, inserce, záměny (vč. SNP)





# Komplexní dědičnost

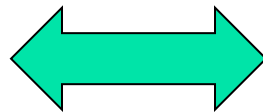
---

- **Znaky kvalitativní** – barva očí, přítomnost onemocnění (přítomny/nepřítomny)
- **Znaky kvantitativní** – váha, výška, krevní tlak - různé hodnoty, Gausovské rozložení
- Variabilita znaků

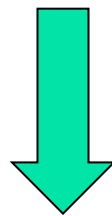
# Komplexní onemocnění

- Komplexní interakce

Geny malého  
účinku



Vnější prostředí



Fenotyp



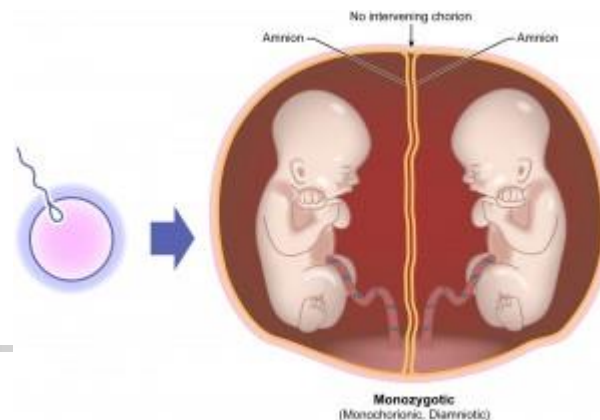
# Komplexní onemocnění

---

- Studie dvojčat
- Rodinné studie – (FBA – Family based association studies)
- Asociační studie
  - Genome wide studie
- Heritabilita



# Studie dvojčat



- Monozygotická dvojčata (MZ): stejný genotyp
- Dizygotická dvojčata (DZ): sourozenci
- **Konkordance**: shoda ve znaku
- Konkordance MZ nižší než 100% svědčí pro vliv negenetických faktorů na vzniku onemocnění



# Konkordance MZ a DZ dvojčat

Onemocnění	MZ (%)	DZ (%)
Epilepsie	70	6
Roztroušená skleróza	17,8	2
DM 1.typu	40	4,8
Revmatoidní artritida	12,3	3,5
Systemový LE	22	0

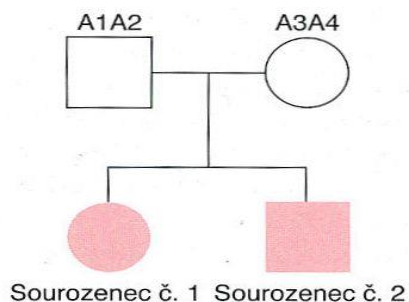
# Rodinné studie – linkage studie



---

- **Familiární agregace:**
  - sdílejí geny
  - častější výskyt onemocnění v rodině
- Relativní riziko závisí na **stupni příbuznosti**
- - příbuzní 1.stupně (sourozenci, rodiče)
  - sdílení  $\frac{1}{2}$  alel

# Sdílení alel



Genotyp sourozence č. 1

		A1A3	A1A4	A2A3	A2A4
Genotyp sourozence č. 2	A1A3	2	1	1	0
	A1A4	1	2	0	1
	A2A3	1	0	2	1
	A2A4	0	1	1	2

Monozygotická dvojčata

- všechny alely

Příbuzní 1.stupně

- sourozenci, rodiče

- 1/2 alel

Příbuzní 2.stupně

-prarodiče, tety

-1/4 alel

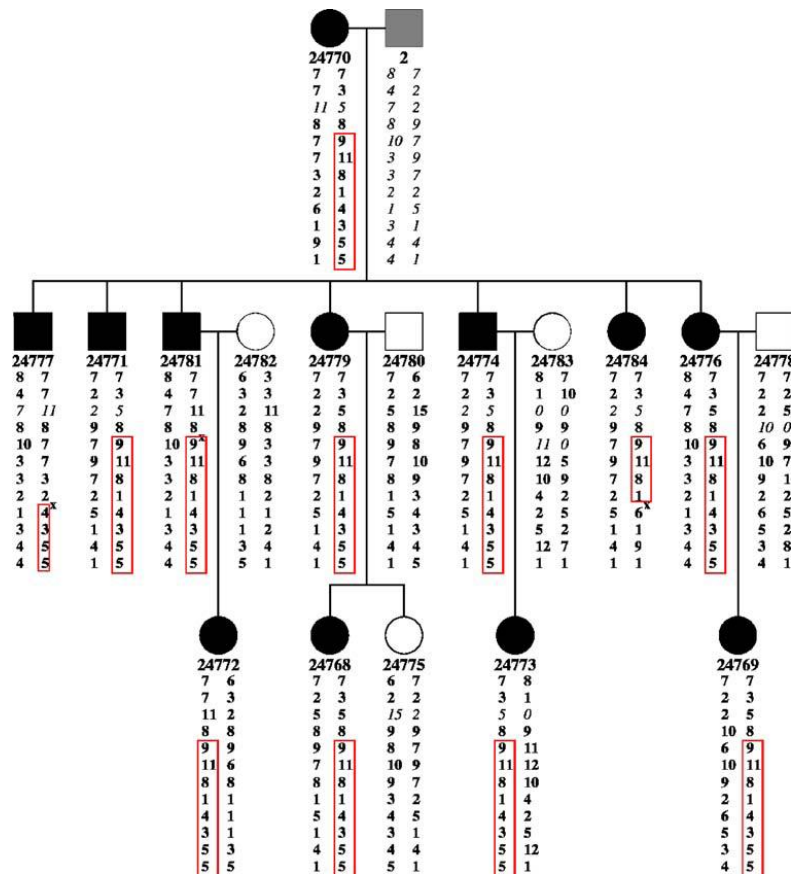
# Rodinné studie – linkage studie



---

- Sdílení alel u příbuzných
  - rekombinace v průběhu meiózy
- Vazebná analýza
- Markery – polymorfismy = alely s frekvencí v populaci více než 1%
- LOD skóre: Poměr pravděpodobností přítomnosti vazby oproti její nepřítomnosti
- Typ dědičnosti

# Rodinné studie



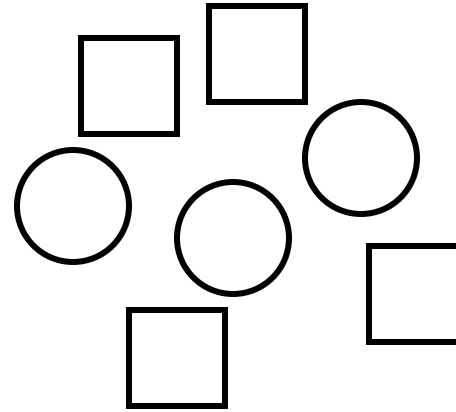
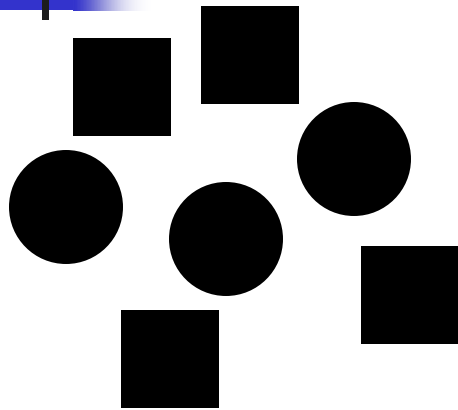


# Rodinné studie - limity

---

- Dostatečný počet postižených jedinců v rodině
- Genetická heterogenita
- Věk vzniků obtíží v době vyšetření
- Vzácné varianty v populaci

# Asociace v genetice



Pacienti

Kontroly

SNP1 C-20%/G-80%

C-22%/G-78%

- bez asociace

SNP2 A-30%/C-70%

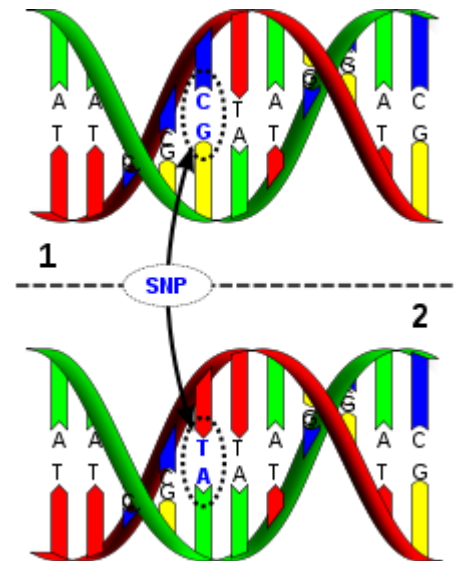
A-20%/C-80%

- signifikantní  
asociace



# Asociační studie

- Asociace alely či genotypu s onemocněním ↔ Kauzální gen
- SNPs (single nucleotide polymorphisms)
- Linkage disequilibrium





# Výsledky asociační studie

Chr	Gene	SNP ID	Genome	r <sup>2</sup>	OR (95% Conf. Int)	P nom	P corr
2p	MEIS1	rs6710341	66611925		0.84 (0.64-1.11)	0.30646	1
2p	MEIS1	rs12469063	66617811	0.603	1.43 (1.16-1.78)	4.15E-06	<b>4.15E-05</b>
2p	MEIS1	rs2300478	66634956	0.953	1.47 (1.18-1.82)	1.26E-06	<b>1.26E-05</b>
6p	BTBD9	rs9296249	38473818		1.59 (1.26-2.01) †	0.00011	<b>0.00107</b>
6p	BTBD9	rs3923809	38548947	0.445	1.58 (1.28-1.96) †	4.11E-06	<b>4.11E-05</b>
6p	BTBD9	rs4236060	38578315	0.869	1.49 (1.19-1.86) †	1.93E-05	<b>0.00019</b>
15q	MAP2K5	rs11635424	65824631		1.26 (1.02-1.55) †	0.00602	0.06023
15q	MAP2K5	rs3784709	65859328	0.820	1.24 (1.01-1.52) †	0.00530	0.05301
15q	MAP2K5	rs1026732	65882138	0.960	1.27 (1.03-1.56) †	0.00428	<b>0.04278</b>
15q	MAP2K5/ LBXCOR1	rs6494696	65890259	1.000	1.27 (1.03-1.56) †	0.00476	<b>0.04764</b>

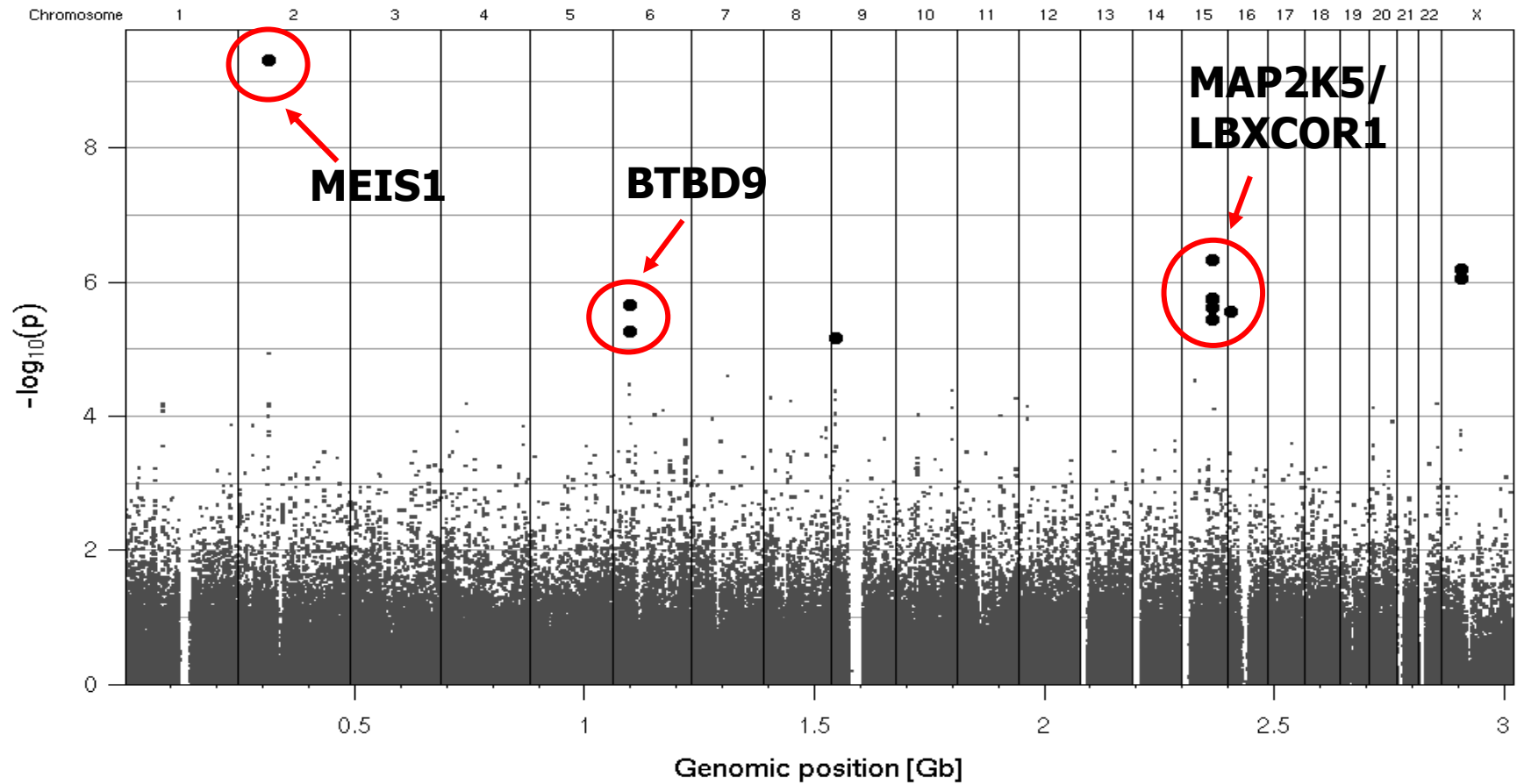


# Genome wide studie (GWS)

---

- Celogenomová analýza
- SNPs (single nucleotide polymorfisms)
  - 100 000 a více/chip
- Porovnání frekvence alel
- Replikace v nezávislých populacích
- Náročný statistické vyhodnocení

# Výsledky GWA - RLS



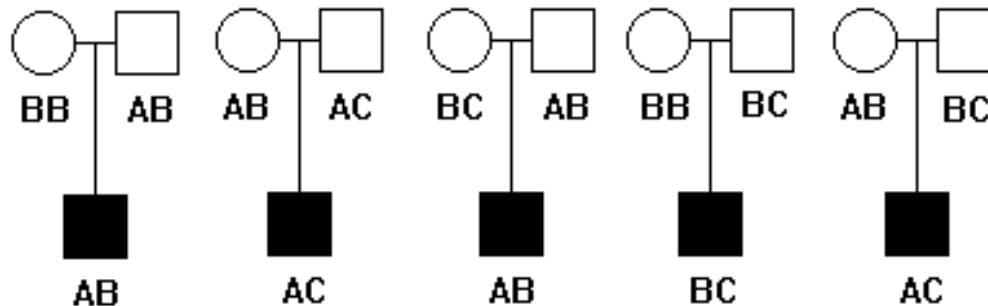


# Asociační studie - limity

---

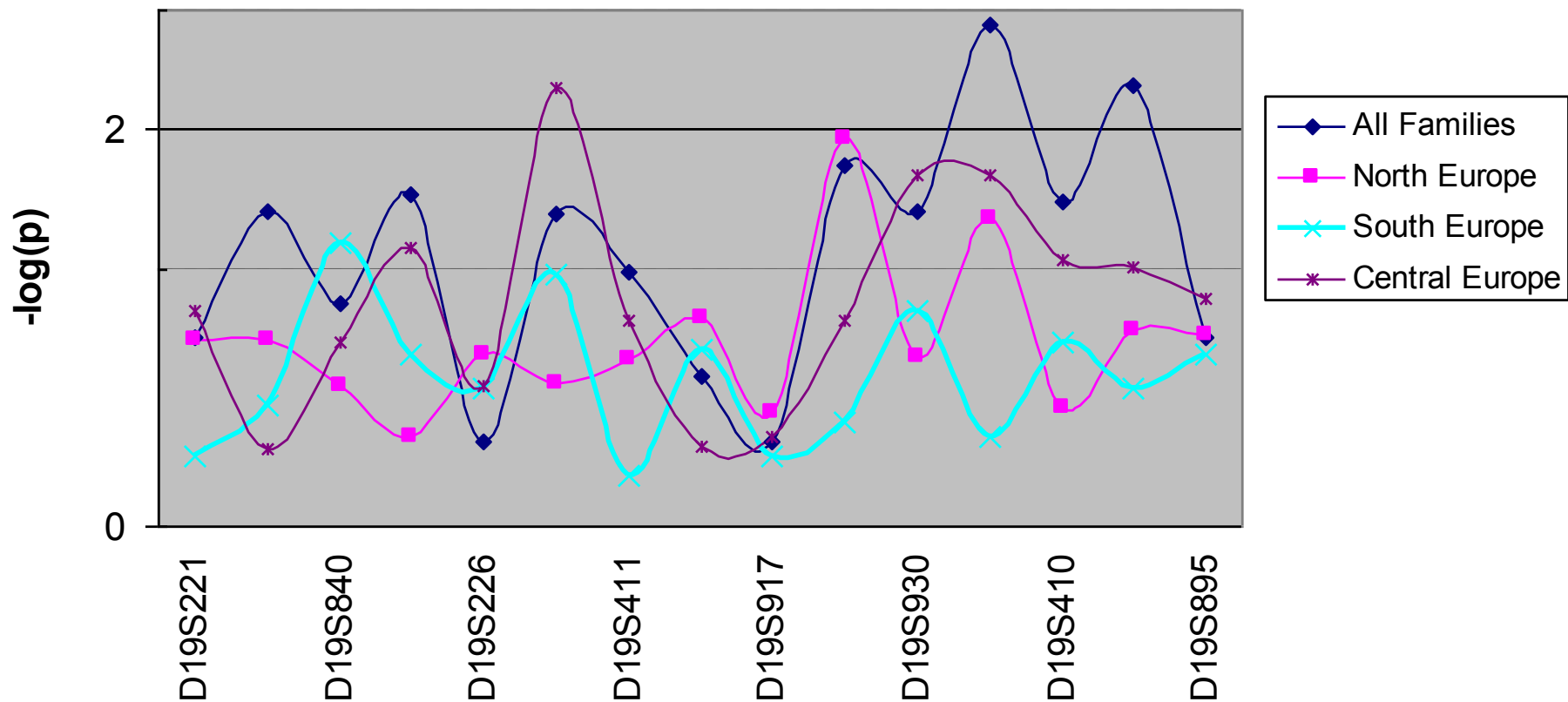
- Asociace x kauzální gen
- Etnická variabilita – populační stratifikace
- Věk vzniku
- Neúplná penetrance
- Fenokopie

# Asociační studie v rámci rodin



- Používá se jako neparametrický test asociace alel (nebo haplotypů) s genetickým znakem i v přítomnosti vazby. Testuje nerovnováhu přenesených alel od rodičů u postižených probandů. Odchylka od rovnoměrného rozdělení alel v rámci informativních přenosů je důkazem jak vazebné nerovnováhy, tak asociace mezi testovaným a lokusem pro sledovanou chorobu.
- Testuje zároveň vazbu a vazebnou nerovnováhu
- Není ovlivněn nerovnoměrným rozdělením alel v populaci
- Poskytuje analytickou metodu pro volný model dědičnosti.
- Může být použit i na rodokmeny

# Chromosome 19p11





# Copy Number Variations (CNV)

---

- Submikroskopické strukturální abnormality chromosomů, způsobené ztrátou či naopak duplikací segmentů delších než 10 000 párů basí
- Podobně jako jiné polymorfismy v genomu přispívají jako zdroj genetické variability jedinců
- Vykazují CNV vliv i u pacientů s narkolepsií?



# Affymetrix 6.0 Mapping array

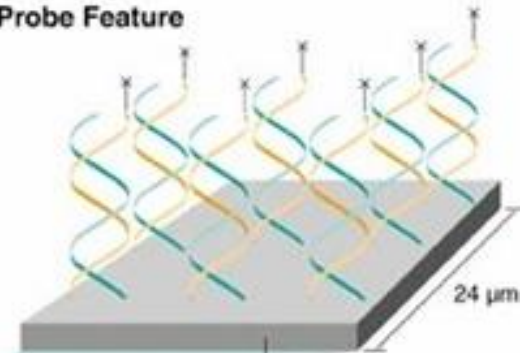
GeneChip® Probe Array



1.28 cm

Hybridized Probe Feature

Single stranded, fluorescently labeled DNA target  
Oligonucleotide probe



Each probe feature contains millions of copies of a specific oligonucleotide probe

Over 200,000 different probes complementary to genetic

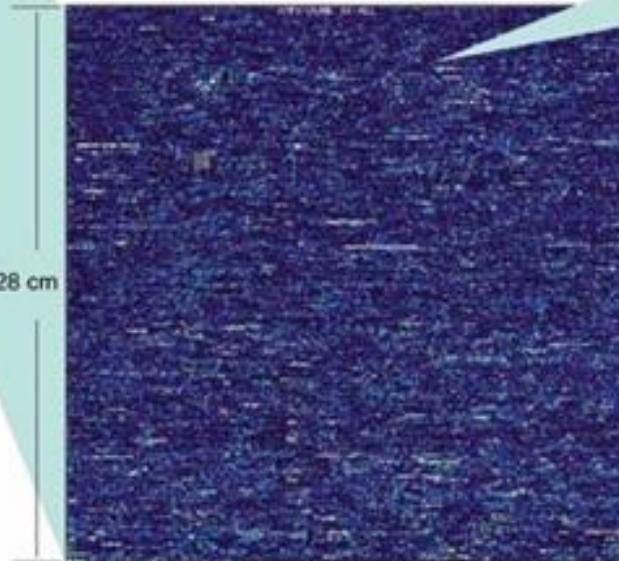
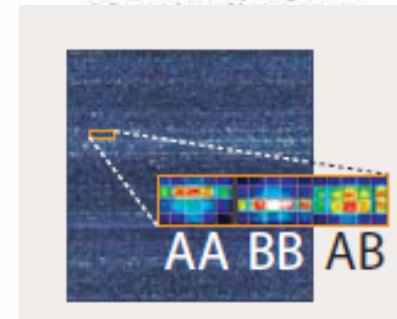
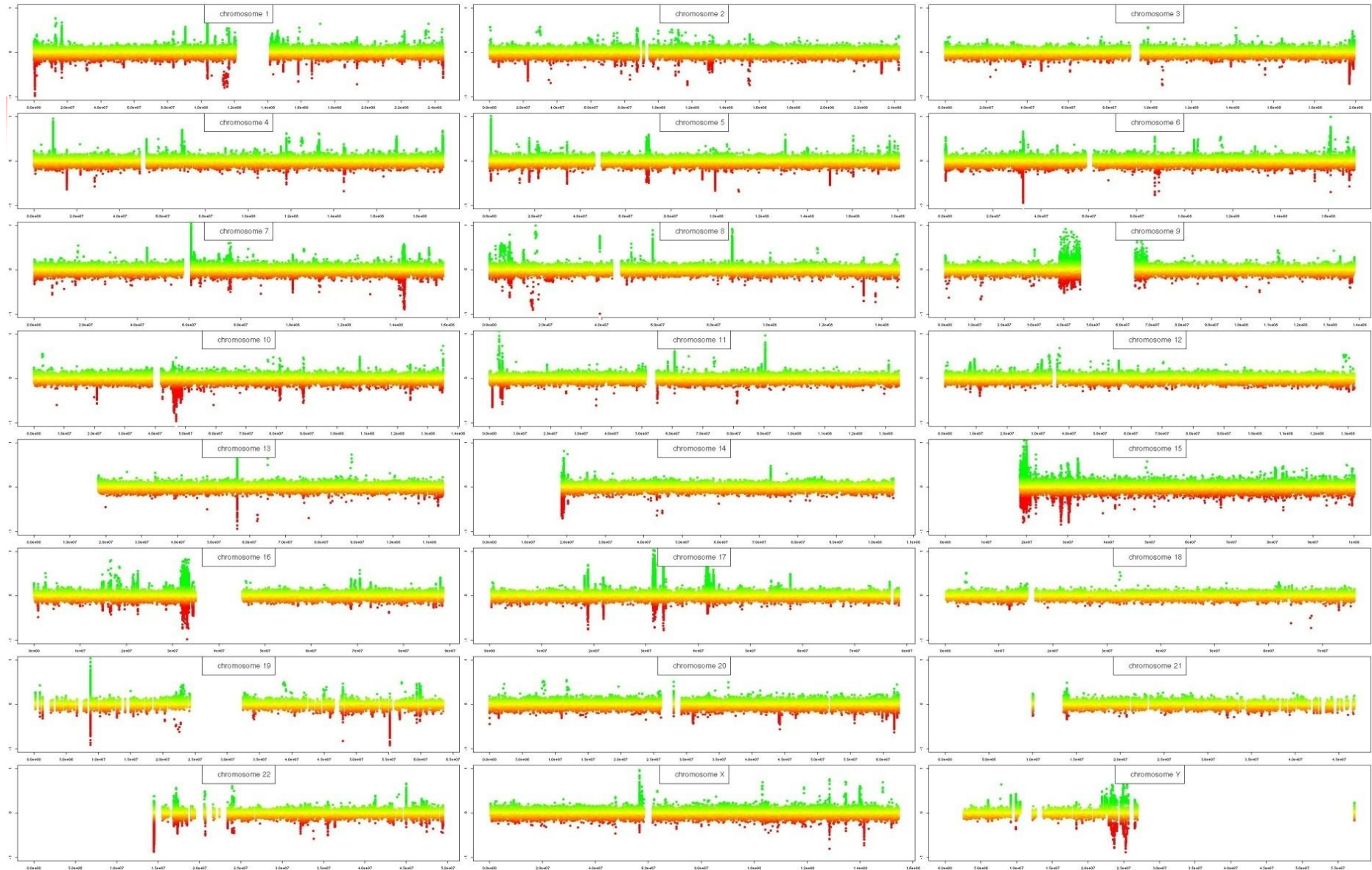


Image of Hybridized Probe Array



# Četnost CNV u 270 jedinců v HapMap



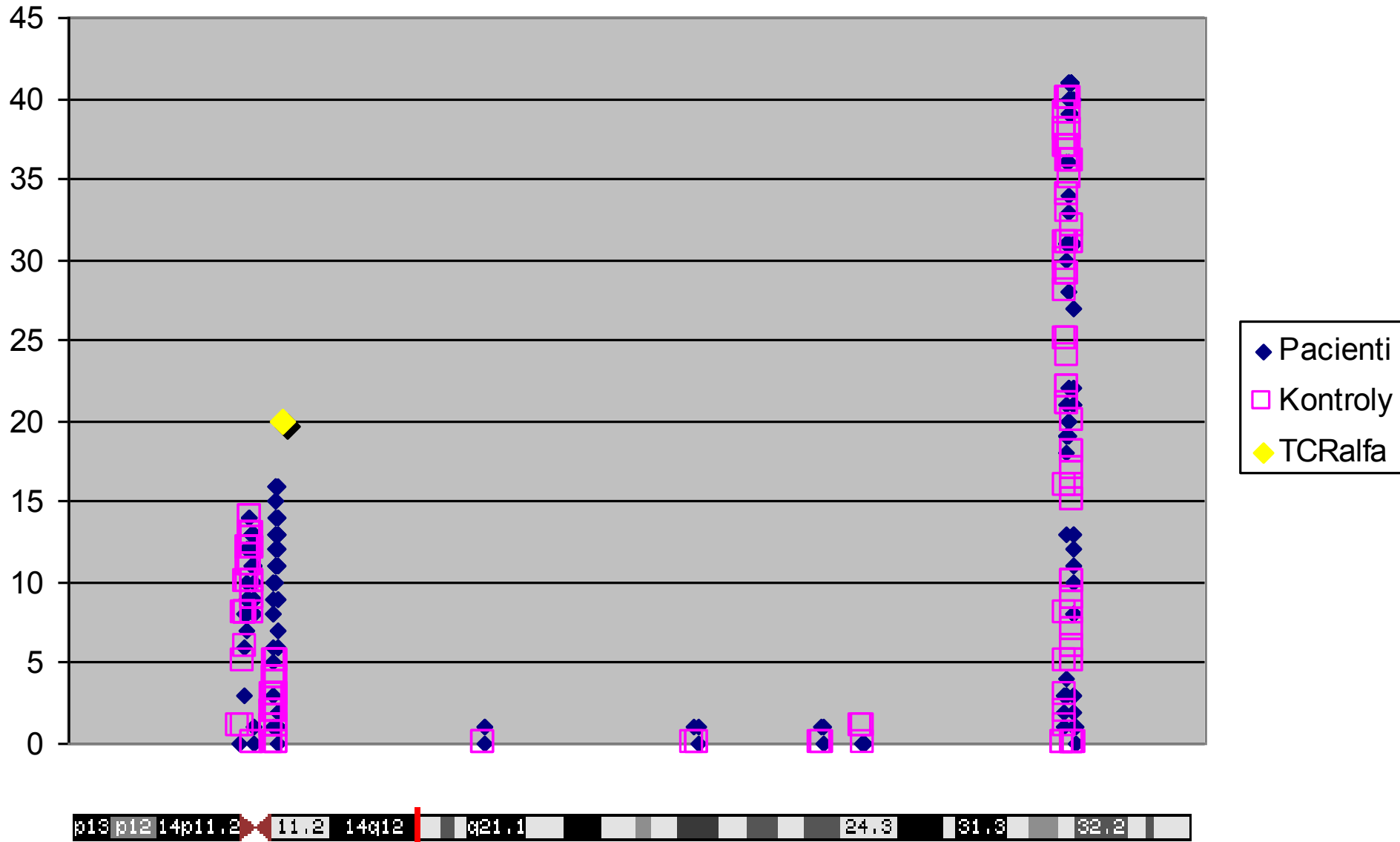


# Narkolepsie s kataplexií

---

- Prevalence 0.03–0.16%
  - závislost na etnicitě, s výraznou variabilitou
- Haplotyp HLA II. třídy DRB5\*0101-DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602
  - až v 98%, častý i v evropské populaci (15–25%)
- Autoprotilátka proti TRIB2 s afinitou vůči hypocretinovým neuronům v hypotalamu asi u 24% pacientů

# Chromosom 14





# Celoexomové sekvenace

---

- Pomocí sekvenátorů nové generace (NGS) s masivní paralelní sekvenací
- Generuje 80-130 milionů sekvencí u jednoho pacienta, o délce 80Gbp
- Pokrývají více jak 21 tis genů (357 tis exonů), o celkové délce 50MB
- Možná resekvenace celého genomu

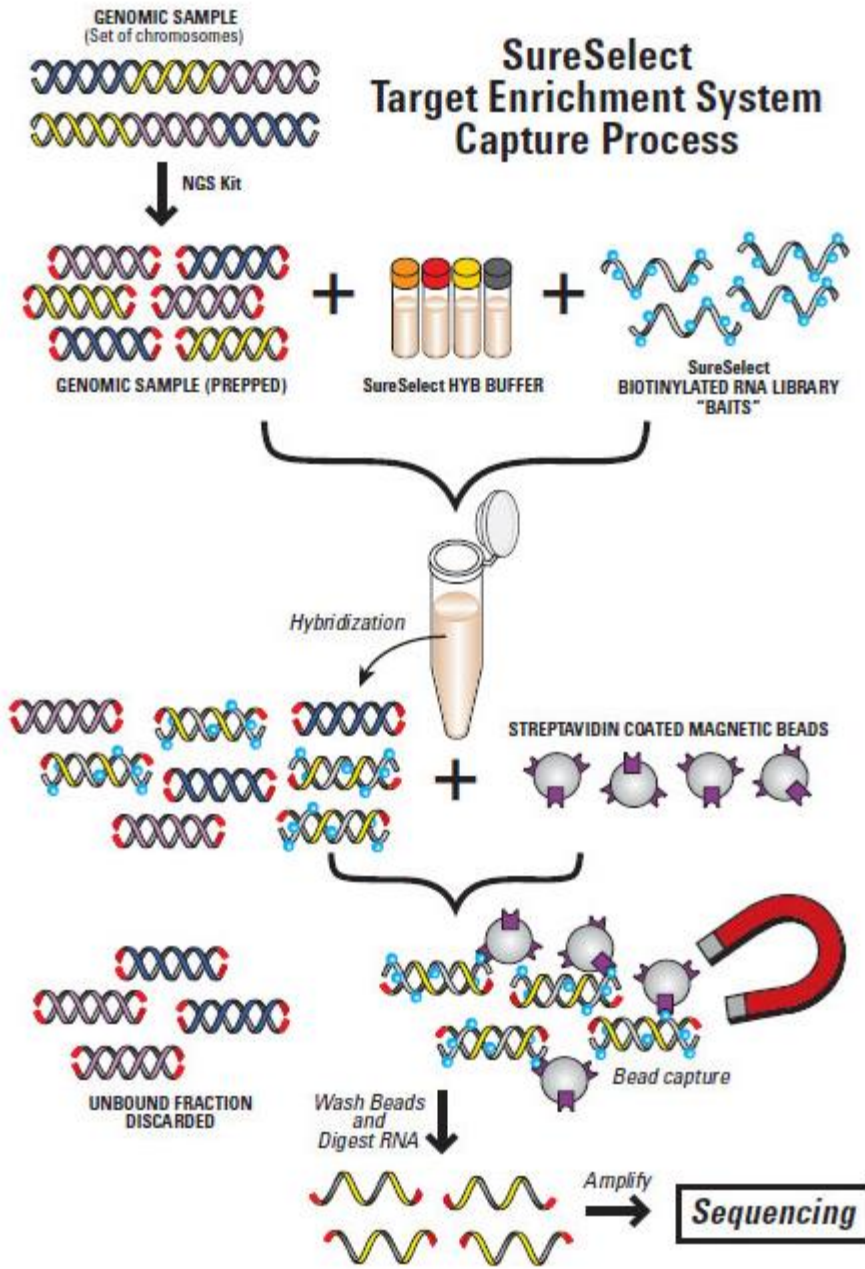
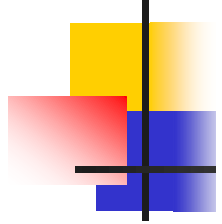


# Celoexomové sekvenace

---

- Vyhledávání odchylek od referenční sekvence
- Porovnávání frekvence s veřejnými databázemi (1000G, ExAC, Welllderly)
- In silico hodnocení patogenicity varianty (SIFT, PPH2, CADD) a klinickou korelací (Clinvar, HGMD)







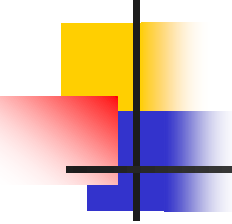
# Příklad bodové mutace - PD

---

- 4418524 chr12:40734202-40734202  
LRRK2 140 (11) 609007 ad snp  
missense probably damaging 36  
rs34637584 CM050659 Pathogenic  
0,00046 by-1000genomes 3 PARK  
66422 6055G->A, Gly2019Ser:



# Komplexní onemocnění - shrnutí



---

- **Není mendelovská dědičnost**
- **Familiární agregace**
- **Negenetické faktory (vnější prostředí, somatické mutace, inaktivace X)**