

Predmet **Osnove preiskovalnih metod**, sklop 3: **Molekularno genetske metode za diagnostiko v medicini**, seminar 7

Večgenske/zapletene bolezni: pristopi pri odkrivanju duševnih motenj

Alja Videtič Paska, Medicinski center za molekularno biologijo, Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta UL, Vrazov trg 2; alja.videtic@mf.uni-lj.si

Človeški genom

- **Human genome project:** identifikacija 20.000 – 25.000 genov; določitev nukleotidnega zaporedja (3000 Mb); podatki shranjeni v podatkovni zbirki, dostopni za nadaljnji študij; izboljšava orodij za analizo; prenos tehnologij v privatni sektor (biotehnoška industrija in razvoj novih medicinskih aplikacij); etična, pravna in socialna vprašanja
- **Razlika v zaporedju DNA** med dvema naključno izbranim človekoma je le 0,1 %
- Študij sprememb zaporedja lahko pokaže npr. pot migracij ob selitvah in genetske osnove odpornosti na bolezni, primerjava podobnosti organizmov

```

GAAATAATTAATGTTTCTTCTCTCTCTATTTGTGCTTACTGCAATTTATTTATTTAATATTATTTTCTT
AGACGGAGTTTCACTCTTTGTGCAACCTGGAGTGCAGTGGGCTGATCTCAGCTCACTGCACACTCCGCTTCTCTGG
TTTCAAGCGATTCTCTGCTCAGCTCTCTGAGTAGCTGGGACTACAGTCAACACACACACCGCCCGGCTAATTTTGT
TATTTTATAGAGTGGGTTTCACTATGTTGGCCAGACTGGTCTCGAACTCTGACCTTGTGATCCGCGACGCTCT
GCCTCCCAAGAGCTGGGATACAGGCTGAGCCAGCCGCTCGGCTTTCGATCAATTTCTACAGCTGTGTTTCCT
TGCCTGGAGCTTACAGAGCTTACAGCTTGTGCTGAGATATTGTGGGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCT
ATCCAGATTGCTCTCAGCTCAGCTGCTGTTGTCATCTCTCTTATCTGGGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCT
CTGATCCCGAGTCTAGCATGTGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCT
TCAGAAAAATGCAATGTAAGTTAAATTTAAAGATTTAAATATAGGAAAAAATAGCAACATAGGGAACAAAA
GGAAAAAGCATGTATTCTAATCCATTATTATTATACAAATTAAGAAAAATTTGGAACCTTTAGATTACACTGCTTTAGAG
ATGGAGATGTAGTAAGCTTTTACTCTTTACAAAAATACATGTTAGCAATTTTGGGAGAAATAGTAACCTACCCGAA
CAGTGAATGTGAATATGCTACTAGAGGAAGAGAGGCACTTGAAACATCTCTAAACCTATAAACACAAATTA
CATCAATATGAGAAACCCAGAGATTTTATAGAAACATACAGGCTTAATACAAAGTAGAGCCAGATGCTAT
TATCTTCCCTTGTGCTGTGTGAGAAATCTAGAGTTATATTGTACATAGGATGGAAAAATAGAGGCTAGTTTATC
AAGTAGTCTATTTTAAAGTCTAACACATCCTAGGTATAGGTGAACCTGCTCCTCGCAATGATTGCACATTTGTGC
CCAGATCCAGCATAGGATGTTTGTCCATTACAAAGCTTTATGCTTAAAGAGAGGAAATAGAGAGCAAAACAGT
GCATGCTGGAGAGAGAGAGCTGATACAAATATAATGAACAAATTTGGAAAAATTTGAGAAACTACTCATTTTCTAA
ATTACTCATGATTTTCTGAGAAATTAAGCTTTTAAATTTGTATTAATCCCAATGTGAGAGAGAGATAAGTATTGAT
GGTATGAGTAAATATCTGTATATATATTCATTTCTGATGAGAGAAATAAATAGGTTGATGATGATGTTG
ATTATTTTCTAGAGGGGTTGTCAGGGAAGAAATTCGTTTTTCTTCTCTCTTCCACTAAGAAAGTTCACTATT
AATTAGGCACATACAATAATTACTCCTCTCAAAATGCCAAAAAGGTAATTAAGAGACTTAAACGTGAAAAATTTA
AGATAGTCACACTGAATATATAAAATCCAGGGTGGTTGGAAGTACGGCTTATATTAAGAGGCTAAAAATTTG
CAATAAGACACAGGCTTTTATGCTTAACTGTGAAAGGTGAAACTAGAAATGAATAAAATCTATAAAATTTAA
ATCAAAAGAGAGAAATATTTTCAATTAAGTAAATATACAGAAATATGTTGGCTGGATCTAGTGAACATATAGT
AAGCATAAACAGAAATATTTTCAATCTGGAAGATCTTTGGGCTAACCTGAAACAGTATATTTGAAACTATTT
TTAAATAGCAGTATAGTAAGTATTTAGAAATGATGTA
    
```

*Del sekvence kromosoma 7:
v 2.200 bp najdemo 2
enonukleotidna
polimorfizma.*



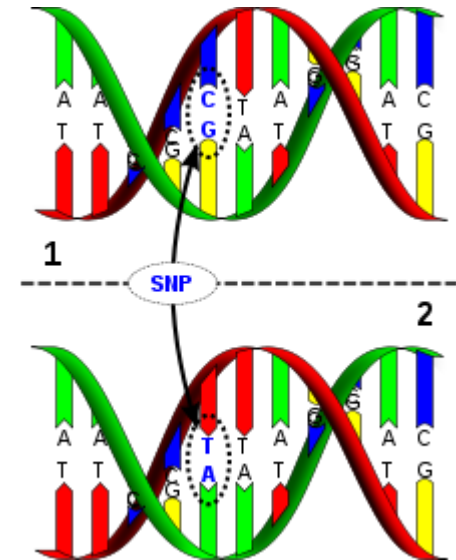
15. februar 2001



16. februar 2001

Človeški genom

- Spremembe v zaporedju:
 - Translokacije
 - Delecije
 - ...
 - Mikrosateliti
 - Najpogostejša sprememba: **enonukleotidni polimorfizmi** (angl. single nucleotide polymorphisms, **SNPs**); pribl. 10 mio
- Lahko proučujemo:
 - Spremembe z zaporedju DNA
 - Spremembe v metilaciji genov (epigenetske spremembe)
 - Spremembe v izražanju genov (mRNA)
 - Spremembe na proteinskem nivoju



Enogenske bolezni:

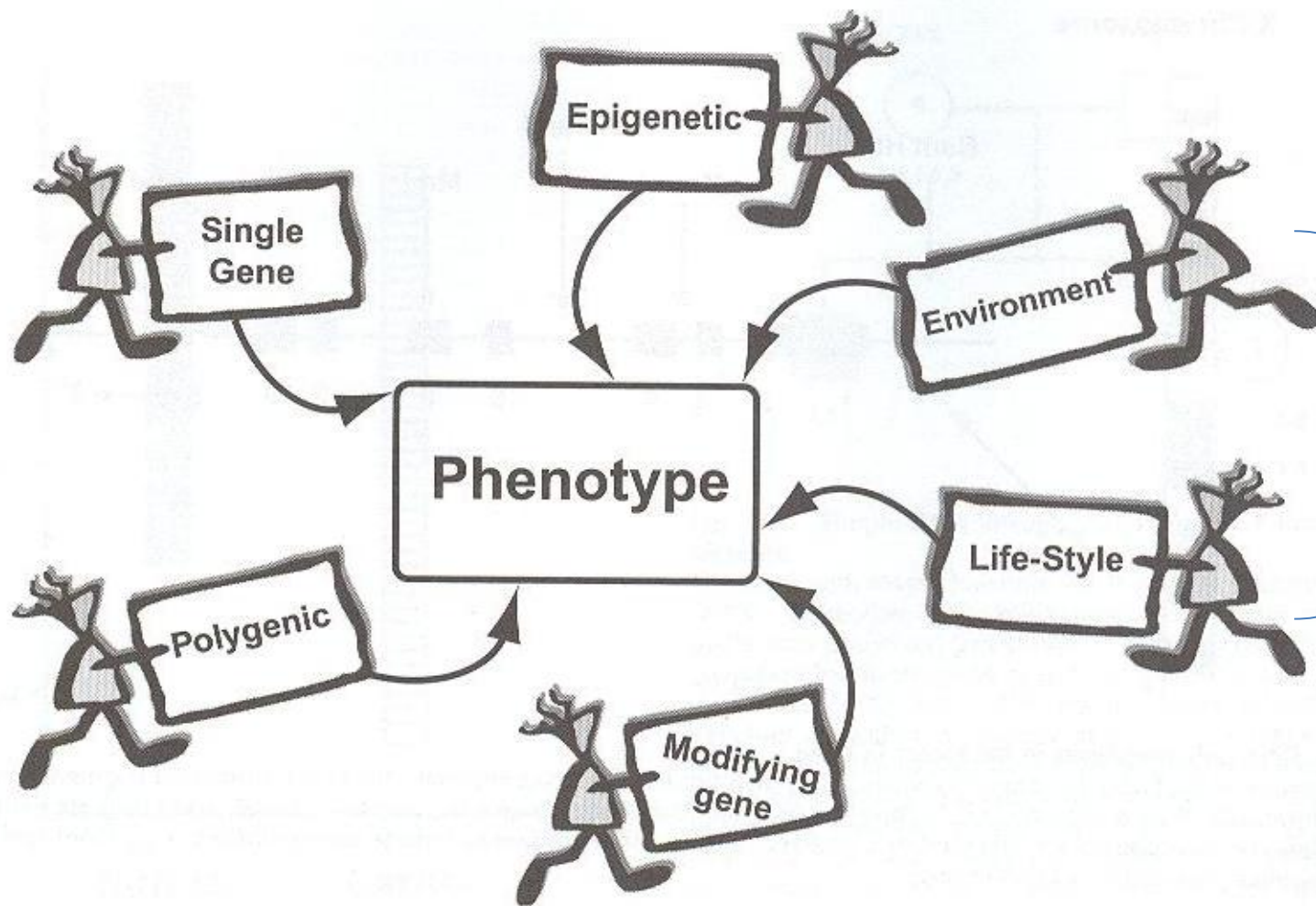
- en gen
- avtosomna dominantna (Marfanov sindrom, družinska hiperholesterolemija, huntingtonova bolezen)
- avtosomna receseivna (cistična fibroza, anemija srpastih celic)
- X-vezana (hemofilija, Duchenova mišična distrofija)
- mitohondrijska (mitohondrijska miopatija, Leberjeva dedna optična nevropatija)

Večgenske/zapletene bolezni:

- nekaj genov
- aditivni učinek več sprememb v več genih
- spremembe lahko podedovane ali pridobljene
- pomembne **interakcije z okoljem in drugimi geni**
- Primeri zapletenih bolezni: diabetes, hipertenzija, astma, glavkom, epilepsija, shizofrenija in druge duševne bolezni

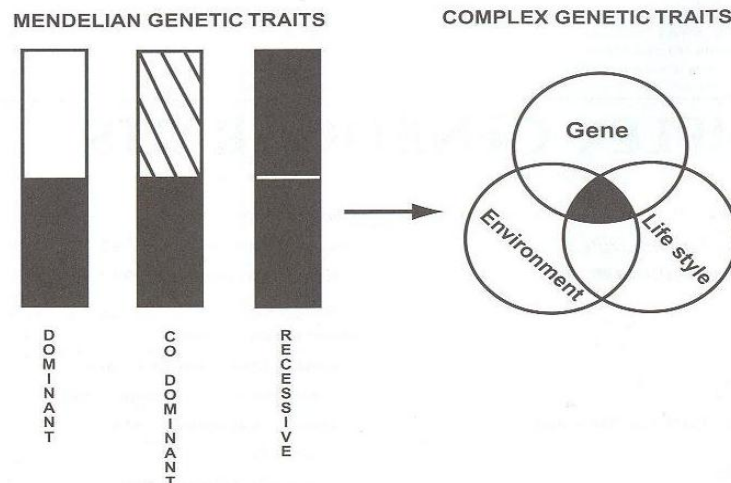
Podatkovna zbirka bolezni OMIM <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

Zbirka genetskih testov dostopna na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GeneTests/>



Zapletene bolezni

- Ni klasičnega (Mendelskega) načina dedovanja
- Bolj **zapleteni mehanizmi** na molekularnem nivoju
- Vpletenih več genov
- **Vpliv in učinek genetske** komponente je **težko kvantificirati**
- Verjetno je v patogenezo vpletenih **več genov**, vsak z **majhnim aditivnim učinkom**
- **Oteženo** je **določanje fenotipov**, saj je vpleteno večje število genov in okoljski dejavniki, ki skupaj vplivajo na fenotip
- Le majhno število genov je bilo povezanih z zapletenimi boleznimi
- Nove, tudi epigenetske, spremembe v DNA lahko razložijo genetski učinek



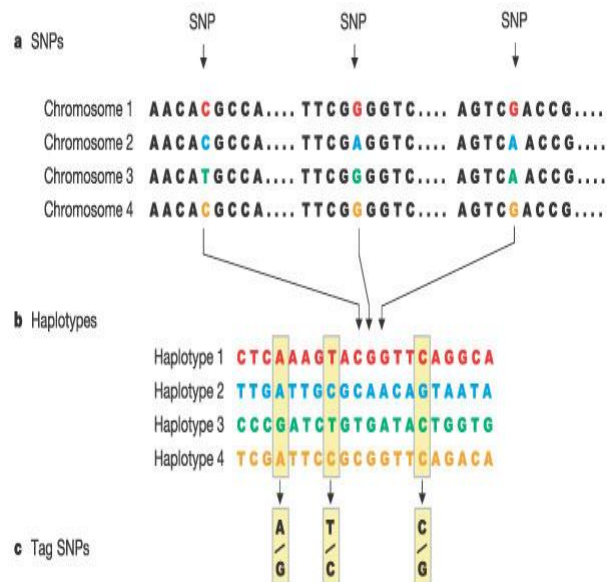
Projekt HapMap



- HapMap Project: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/whatishapmap.html.en>
- HapMap je zbirka pogostih genetskih različic, ki jih najdemo v človeški DNA;
- Organizacija v genomu: Opisuje, kaj te različice so, kje v DNA jih najdemo ter kako so porazdeljene med ljudmi v različnih populacijah na svetu;
- Projekt je namenjen dajanju informacije, ki jo raziskovalci lahko uporabijo ter povežejo določene genetske različice in tveganje za določeno bolezen; ta dognanja tako vodijo do novih preventivnih in diagnostičnih metod ter zdravljenja bolezni.

SNP-ji in haplotipi

- Vrste SNP-jev:
 - nekodirajoči
 - kodirajoči: sinonimni, nesinonimni (imajo spremenjen smisel ali so nesmiselni – stop kodon)
- Za genetika SNP-ji delujejo kot **označevalci**, ki jim pomagajo locirati gen v zaporedju DNA;
- Primerjava prisotnosti SNP-jev pri posameznikih kot kazalec za bolezenski gen;
- Testiranje 10 mio SNP-jev preobsežno → ugotovili, da se določeni deli genoma dedujejo skupaj, zato lahko testiramo bistveno manjše št. SNP-jev, to so **označevalni SNP-ji** (angl. tag SNPs). V čl. genomu naj bi jih bilo 300.000 do 600.000.



a) *SNP-ji v različnih osebah.*

b) *SNP-ji, ki se dedujejo skupaj tvorijo haplotip.*

c) *Ugotovljeni so označevalni SNP-ji, ki enkratno določajo ostale SNP-je v haplotipu. Z genotipizacijo označenih treh SNP-jev lahko ugotovimo kateri haplotip je prisoten pri posamezniku.*

Pristopi pri odkrivanju genetskih označevalcev

- Pri zapletenih boleznih se niti fenotipa niti načina dedovanja ne da enostavno slediti ali ugotoviti/določiti.
- Pristopi: vsem je skupno oblikovanje dveh skupin: obolele in zdrave (kontrolne); značilnosti in genetske označevalce obeh skupin med seboj primerjamo
→ **asociacijske študije**.
- Vrste študij glede na vzorec:

- **Družinske študije**, tudi **analize (genetske) povezanosti** (angl. linkage analyses)

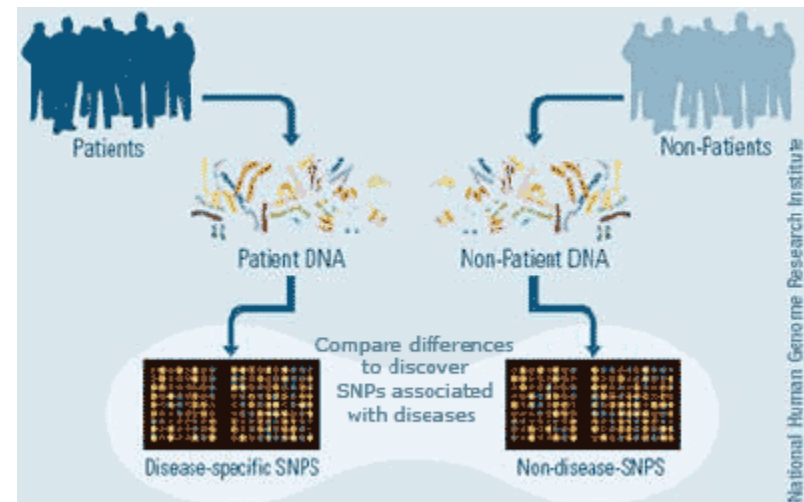
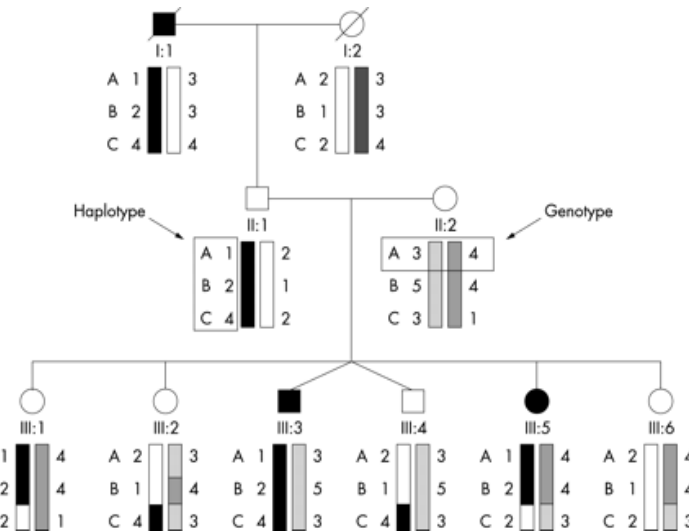
- **Asociacijske študije** (angl. association studies) **splošne populacije**

- **Študije celotnega genoma** (angl. genome wide studies)

- **Študije dvojčkov**

- **Študije posvojencev**

- **Meta analize** (združevanje in ponovna analiza rezultatov več različnih študij iste bolezni in istega označevalca)



Asociacijske študije

- Vključeno **veliko število oseb**, da zmanjšamo lažne povezave (ki jih je bistveno več kot pri študijah povezanosti) ter zato, ker je fenotip težje določiti zaradi vpliva okolja.
- Zaradi velikega št. oseb se pojavlja problem **razslojenosti populacije**.
- Lahko določimo **kanadidatne gene**, potem lahko št. SNP-jev bistveno zmanjšamo (s pomočjo HapMap).
- Primerjamo **porazdelitev** (genetskih) **označevalcev** (npr. SNP-jev) med **skupinama obolelih in kontrol**.
- Zaradi zapletenosti potrebujemo **bioinformatične in statistične pristope**; kljub temu so rezultati pogosto dvoumni.
- Težko je **dokazati**, da ima genetska **sprememba pomembno funkcijsko vlogo**.

Genetika duševnih motenj

- **Duševne motnje so večgenske in zapletene**
- Vsak gen ima majhen aditiven učinek
- **Interakcija z okoljem** (serotoninski transporter in stresni dogodki → razvoj depresije)
- Načeloma se pojavljajo v družinah
- Veliko študij kandidatnih genov daje nasprotujoče si rezultate (učinek posameznega označevalca, etične skupine)
- Boljši rezultati s študijem **vmesnih fenotipov** (angl. intermediate traits ali endophenotypes): dobro določeni kognitivni simptomi ali diagnostične skupine
- Shizofrenija
- Depresivne motnje



Singh I in Rose N, Nature, 2009

Box 1 | What are biomarkers?

A biomarker is a characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes or pharmacological responses to a therapeutic intervention⁴⁰.

Different markers can be used to make various assessments: to diagnose a condition; to predict the natural outcome for an individual with this condition; to predict whether the individual will benefit from a particular treatment and how aggressively to treat the

individual; and to assess an individual's response to this treatment.

In a psychiatric context, biomarkers could be used to detect and assess, or predict the development of, not only psychiatric disorders but also personality or behavioural traits, and emotional or cognitive capacity.

Biomarkers could also be used to inform treatment decisions. Examples of biomarkers are:

- specific variations in skin conductivity;
- specific patterns of neural

activity in particular brain regions, detected by imaging techniques, such as functional magnetic resonance imaging (fMRI) and positron-emission tomography (PET);

- specific genetic sequences or single-nucleotide polymorphisms, identified by genetic screening;
- specific endophenotypes (intermediate traits in the chain of causality between genes and diseases), such as biochemical, neurophysiological or neuropsychological features.

Genetika shizofrenije

- Prizadane ~ 1 % populacije
- **Študij zapleten:** (1) težko določljiv fenotip; (2) ni možno določiti načina dedovanja; (3) dodatni učinki drog in alkohola in potencilane nevrološke motnje, ki povzročajo podobne znake
- 70 – 80 % genetske komponente (določeno na osnovi družinskih, študij ter dvojčkov in posvojencev)
- Konkordanca pri enojajčnih dvojčkih 45 %, dvojajčnih 15 %
- Sorodniki so bolj ogroženi kot splošna populacija (prvo koleno 5 - 15 %, drugo 2 - 6 %, tretje 2 %)
- Predvideni **dejavniki okolja:** poškodba možganov v mladosti ali perinatalno, psihološki stres

Genetika shizofrenije

- Kandidatni geni ugotovljeni z analizo genetske povezanosti niso bili potrjeni v ponovitvenih študijah:
 - prva povezava trisomija 5q11.2-q13.3 → študij genetke povezanosti (povezanost ni bila potrjena)
- **Kandidatni geni** ugotovljeni z asociacijskimi študijami bolj zanesljivi:
 - študije pokazale na kromosome 1, 6, 8, 12, 13 in 22 → danes potrjeni kandidatni geni
 - geni, ki uravnavajo povezave med živčnimi celicami, sinaptogenezo in funkcije N-metil-D-aspartat (NMDA) glutamat receptorjev
- **Dopaminska hipoteza** osnovana na (1) zloraba amfetamina lahko zaradi odvečnega sproščanja dopamina privede do motenj podobnih shizofreniji (2) antagonisti dopamina so bili uspešni pri zdravljenju shizofrenije.
- **Glutamatna hipoteza** predvideva zmanjšano aktivnost v sistemu živčnega pranašalca glutamata, še posebej nepravilno delovajne receptorjev NMDA. Signaliziranje z glutamatom igra ključno vlogo v razvoju živčevja in nevroplastičnosti; vse te vloge so oslabiljene pri shizofreniji.

Table 4.4 Genes implicated in schizophrenia (from Gerber *et al* 2003; Harrison and Owen 2003)

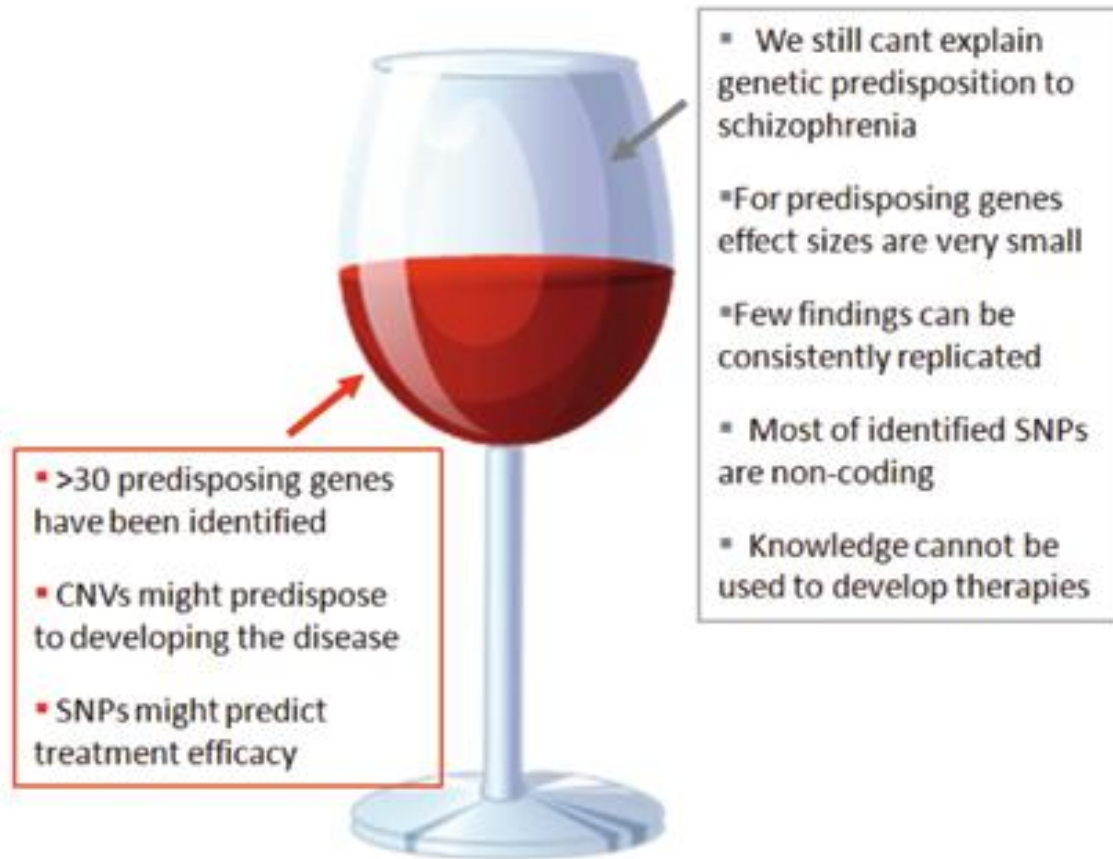
Gene, metabolic pathway	Locus	Earlier linkage study focused attention to the gene region	Confirmed by others	Mouse model
<i>RGS4</i> (regulator of G-protein signalling-4). Shown to be down-regulated on microarray studies and is an inhibitor of the glutamate receptors (these are the predominant excitatory neurotransmitter receptors in the mammalian brain).	1q21-22	Yes	Yes	No
<i>DTNBP1</i> (dysbindin). Acts through the NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptors (NMDA represents one particular class of glutamate receptors).	6p22	Yes	Yes	No
<i>NRG1</i> (neuregulin 1). Present in glutamatergic synaptic vesicles and involved with NMDA receptors. One haplotype with this gene increased two-fold the risk for schizophrenia.	8p12-p21	Yes	Yes	Yes
<i>PPP3CC</i> . Gene that encodes the calcineurin γ catalytic subunit. Involved in both the dopaminergic pathway and the NMDA receptors, hence, a link between the dopamine and glutamine theories for schizophrenia.	8p21.3	Yes	Recently described	Yes
<i>DAAO</i> (D-aminoacid oxidase). See <i>G72</i> for mode of action. Although both are associated with increased risk for schizophrenia, a combination of risks for <i>G72</i> and <i>DAAO</i> was shown to be synergistic.	12q24	No	No	No
<i>G72</i> . This gene and <i>DAAO</i> have key effects on the NMDA receptors.	13q34	Yes	Yes	No
<i>COMT</i> (catechol-O-methyltransferase). Although this gene directly affects monoaminergic neurotransmission, it is likely to have an indirect effect also on other synaptic populations, including glutamatergic ones.	22q11	Yes	Yes/No ^a	Yes
<i>PRODH</i> (proline dehydrogenase). This gene potentially affects glutamatergic synapses via several mechanisms.	22q11	Yes	No ^a	Yes

^aBoth *COMT* and *PRODH* were suitable candidate genes for study because they resided within the region that is deleted in the genetic disorder velocardiofacial syndrome. In this syndrome there is a high rate of psychosis.

Genetika shizofrenije

- Pomembni **kandidatni geni zaradi delovanja antipsihotičnih zdravil**:
 - Serotoninski receptor 2A, polimorfizem T102C; zmanjšano izražanje v prisotnosti alela C; potrdili tudi z meta analizo
 - Dopaminski receptor D3, polimorfizem Ser9Gly; pri homozigotih povezava z motnjo
- **Polimorfizem različic števila kopij (CNV, angl. copy number variation)**:
 - Uporaba čipov, vključenih veliko št. oseb
 - Odkrili velike delecije (kr. 22, DISC, kr. 17, gen za dedno nevropatijo, HNPP in kr. 2, cinkov prst, ZNF804A, nevropsihološka vloga oz trenutno še neznana vloga)
- **Študije celotnega genoma** doponjujejo genetske označevalce:
 - Regija velikega histokompatibilnostnega kompleksa, MHC: vsebuje številne gene povezane z imunostjo, avtoimunostjo in infekcijskimi motnjami; odkrili kar nekaj primerov kjer avtoimuni encefalitis vodi v očitne duševne sindrome → del shizo. torej lahko izvira iz mehanizmov imunosti ali pa ima MHC vlogo pri delovanju možgan (sinaps)
- Verjetno bodo metode “sekveniranja nove generacije” prevzele prvo mesto in omogočile analizo še več označevalcev in oseb ter tudi prevzele iskanje “**de novo**” mutacij

Schizophrenia genetics today: the half-full or half-empty glass?



Genetika depresivne motnje

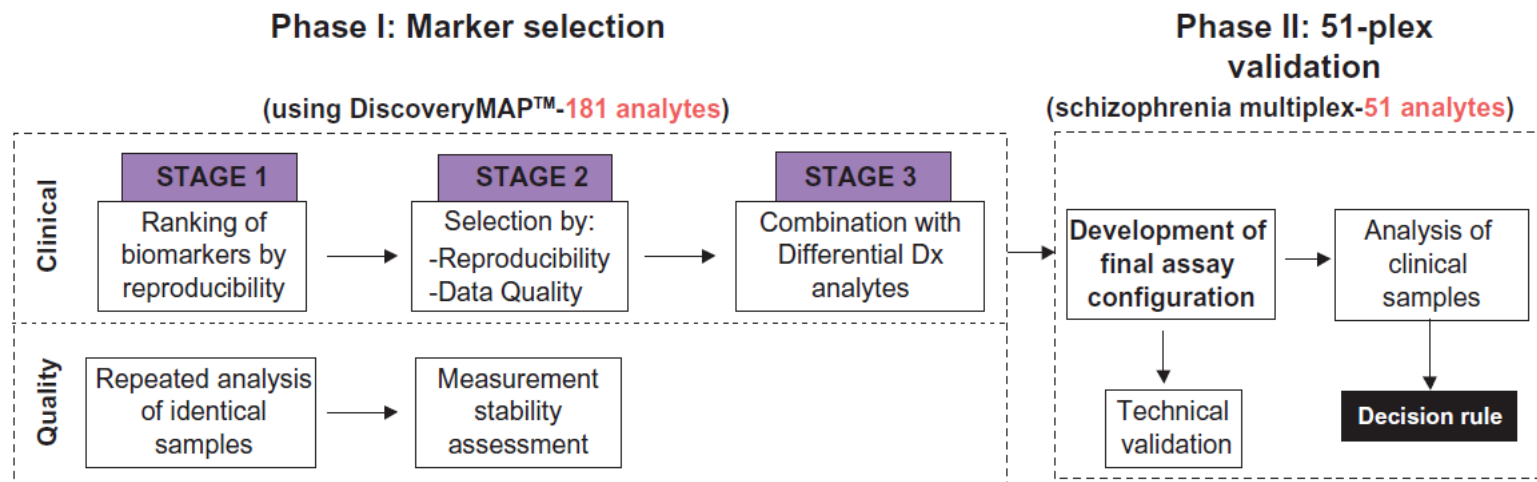
- Prizadane 10 do 15 % populacije
- **Genetski prispevek** na osnovi kliničnih študij je **48 do 75 %**
- **Študije dvojčkov:** splošna populacija, ženske, **21- 45 % genetski prispevek**, brez skupnih vplivov okolja/družine; konkordanca 70 do 90 % pri enojajčnih, 16 do 35 % pri dvojajčnih dvojčkih
- Študije posvojencev: pokazale bistveno višji odstotek motnje pri bioloških starših kot pri posvojiteljih
- Družinske študije: povečano tveganje med sorodniki v prvem kolenu; večje št. epizod → večji genetski vpliv

Genetika depresivne motnje

- **Kandidatni geni na osnovi nevrobiološke verjetnosti :**
 - Tri glavne poti pri študiju: **serotoninska, dopaminska in norepinefrinska pot** (študij genov sinteze, prenašalcev, razgradnje, receptorjev, transporterjev).
 - Serotoninski transporter (5-HTT; povezava preko stresnih dogodkov), serotoninski receptor 2A (HTR2A; povezava preko slabega ravnanja s potomci), možganski nevrotrofni faktor (BDNF; povezava preko stresnih dogodkov) in triptofan hidroksilaza 2 (TPH2; povezava preko zmanjšane količine serotonina zaradi različic v genu)
- **Študije celotnega genoma** (pari starši-otroci): pokazale na kromosom 12, ki vsebuje DAO (že povezan s shizofrenijo in bipolarno motnjo), kr. 1 metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR), gen povezan z napakami v nevralni cevi

Novi pristopi – analiziranje krvnih označevalcev pri shizofreniji

- Neinvazivni pristopi, kjer bi analizirali označevalce v krvi
- Iskanje **podpisa biooznačevalcev**, ki loči bolnike s shizofrenijo od zdravih kontrol
- Študije so v fazi testiranja
- Namen testiranja: pomoč pri identifikaciji, razvrščanju in spremljanju bolnikov, kar bi pripomoglo k zgodnejšim intervencijam in boljšemu izhodu bolezni
- Postopek (imunske tehnike) za izdelavo serumskega profila:



- Označevalci morajo biti izbrani na osnovi biološke in tehnične ponovljivosti
- Dobro izbrani označevalci bi omogočali natančno identifikacijo bolnikov ne glede na trajanje bolezni ali stopnjo zdravljenja

Primer izbire označevalcev:

A) Analytes

Reproducibility

Cortisol	+++++
Haptoglobin	+++++
Interleukin 10	+++++
α -1 antitrypsin	++++
Apolipoprotein H	++++
CA	++++
complement 3	++++
Ferritin	++++
Interleukin 7	++++
Trail R3	++++
Betacellulin	+++
CTGF	+++
Endothelin 1	+++
ICAM 1	+++
MDC	+++
MIF	+++
Prolactin	+++
Serum Amyloid P	+++
Sortilin	+++
TIMP 1	+++
TNF R 2	+++
VEGF	+++

B) Analytes

Apolipoprotein A1
BDNF
Beta-2 Microglobulin
Fetuin A
IgA
LH (Luteinizing Hormone)
MIP-1 alpha
Prostatic AcidPhosphatase
Testosterone

C) Analytes

Apolipoprotein B
Apolipoprotein A2
Apolipoprotein C1
Cancer Antigen 125
Calbindin
CD5L
EGF -R
FSH (Follicle Stimulation
Hormone)
IgM
IL-6 Receptor
IL-11
IL-17
KIM-1
MCP - 2
MMP-2
PYY
Thyroid stimulating hormone
Transferrin
Vitronectin
Thrombopoietin

A) Označevalci izbrani iz 181 markerjev na osnovi testiranja shizofrenikov

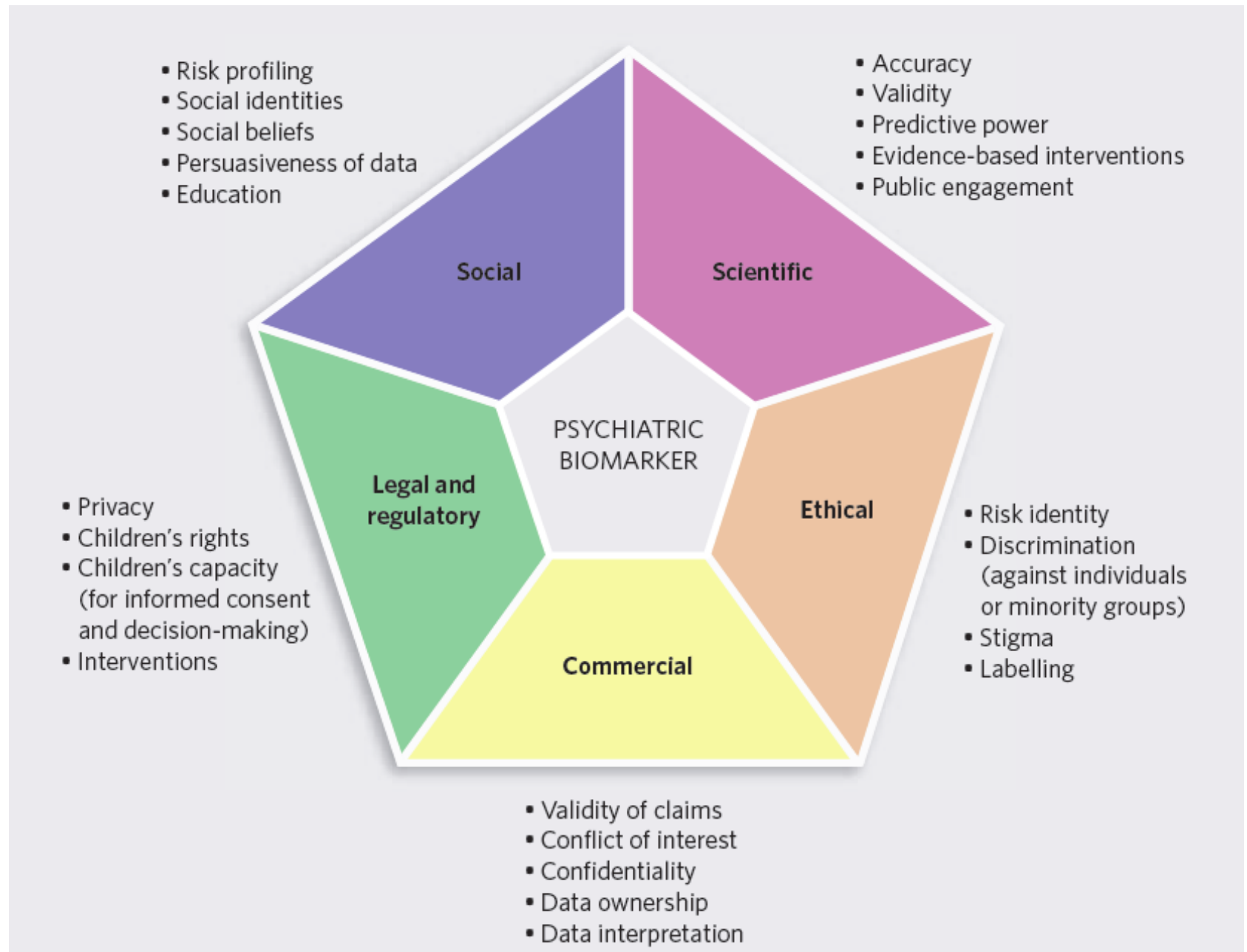
B) Označevalci izbrani iz literature

C) Označevalci za bipolarno motnjo za diferencialno diagnostiko

Prednosti za človekovo zdravje ali kaj lahko uporabi zdravnik?

Razumevnje molekularnih osnov zapletenih bolezni je pomembno ker:

1. Identifikacija oseb, ki imajo genetsko predispozicijo, bo omogočila razvoj bolj usmerjene preventivne programe (tudi osebno diagnostiko).
2. Genetske informacije kot identificirane nove trapevtske tarče ali strategije, seveda tudi farmakoterapijo.
3. S pomočjo biooznačevalcev bi lahko določali razvoj bolezni ter tudi njen potek in izid.
4. Ko bomo razumeli genetsko komponento zapletenih bolezni, bo vplive okolja lažje odkriti in razumeti ter tako uporabiti v smislu preventive.
5. Presimptomatsko DNA testiranje – tesno povezano z etičnimi vprašanji.



Literatura

- R.J. Trent, Molecular Medicine, Third Edition: Genomics to Personalized Healthcare
- A. Wright, N. Hastie: Genes and Common Diseases: Genetics in Modern Medicine, poglavje 30
- Pregledni članki:
 - Depresija (Lohoff F. W., Overview of the Genetics of major Depressive Disorder, 2010)
 - Članki navedeni na diapozitivih
- OMIM

