

Tamizaje de genes candidatos para glaucoma mediante análisis sistemático del desequilibrio de ligamiento

Lorena Fernández Martínez

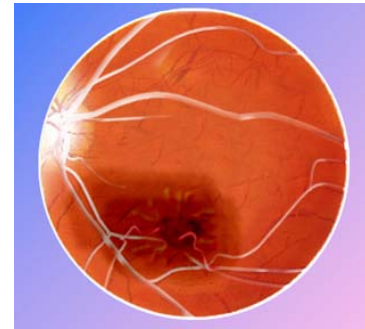
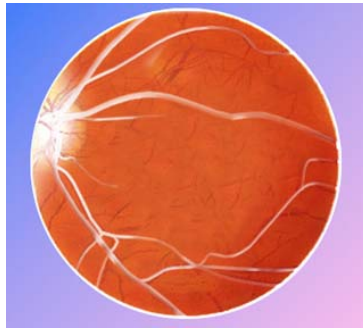
*Instituto de Genética Humana
Universidad de Erlangen-Nuremberg
Alemania*



Glaucoma

Conjunto de neuropatías clínica y genéticamente heterogéneo

- ▶ Degeneración característica del nervio óptico

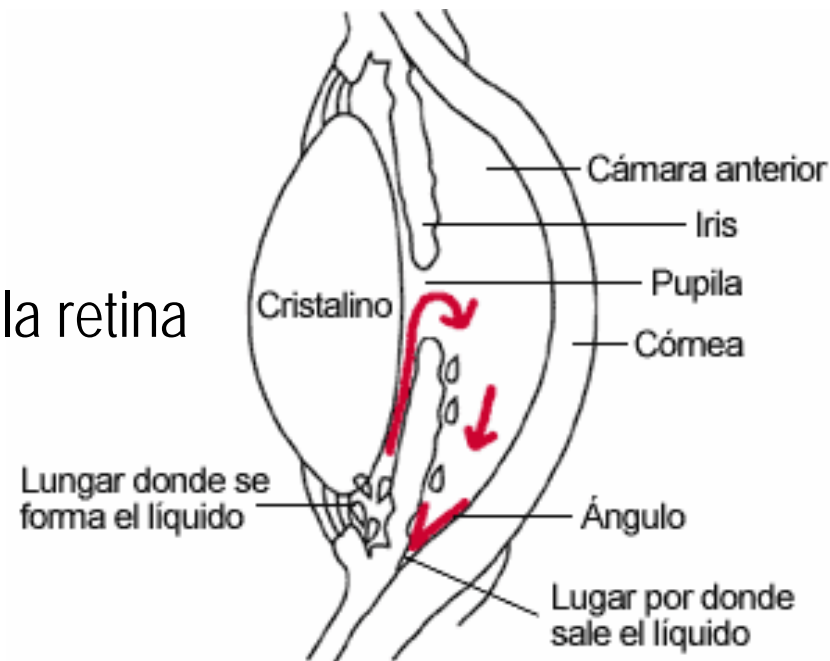


- ▶ Pérdida progresiva de campo visual (visión túnel)



Glaucoma primario de ángulo abierto (POAG)

- ▶ Presión intraocular superior a 22 mmHg en ambos ojos
- ▶ Pérdida de campo visual al menos en un ojo
- ▶ Edad de diagnóstico mayor de 35 – 40 años
- ▶ Daño al nervio óptico en ambos ojos:
 - *Aumento presión intraocular?*
 - *Hipoxia?*
 - Apoptosis de células ganglionares de la retina
- ▶ Progreso lento, crónico y asintomático



Aspectos problemáticos del POAG

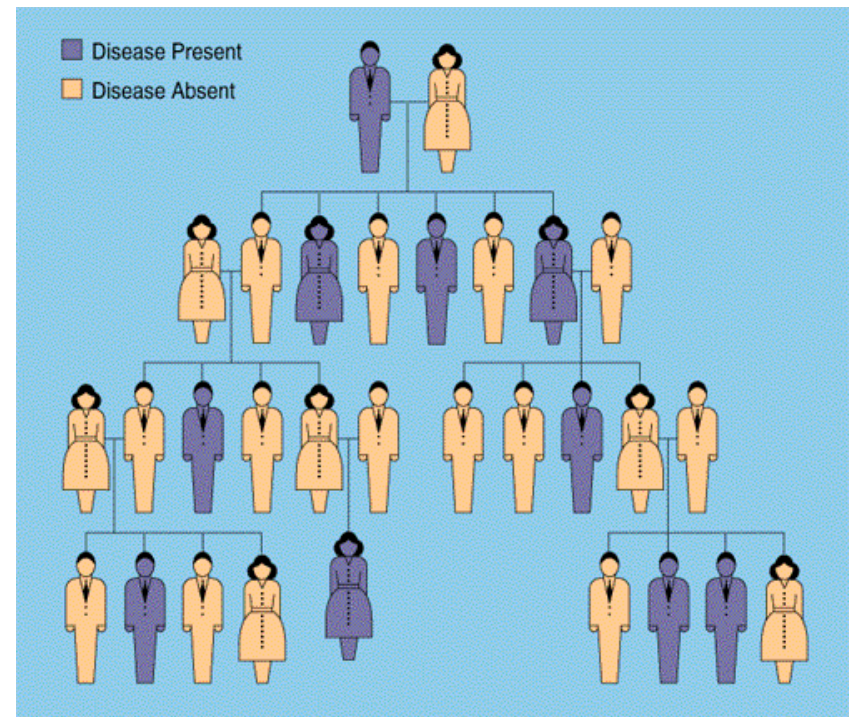
- ▶ Enfermedad genéticamente compleja (complex trait):
 - poligénica: varias mutaciones en distintos genes
 - penetrancia incompleta
 - influencia ambiental

- ▶ Manifestación tardía de la enfermedad:
 - dificultad de reclutar familias
 - problemas en la elección de controles

Estrategias de mapeo genético I

Análisis de ligamiento

- dificultad para establecer modelos de herencia mendeliana
- escasez de generaciones
- regiones cromosómicas muy amplias

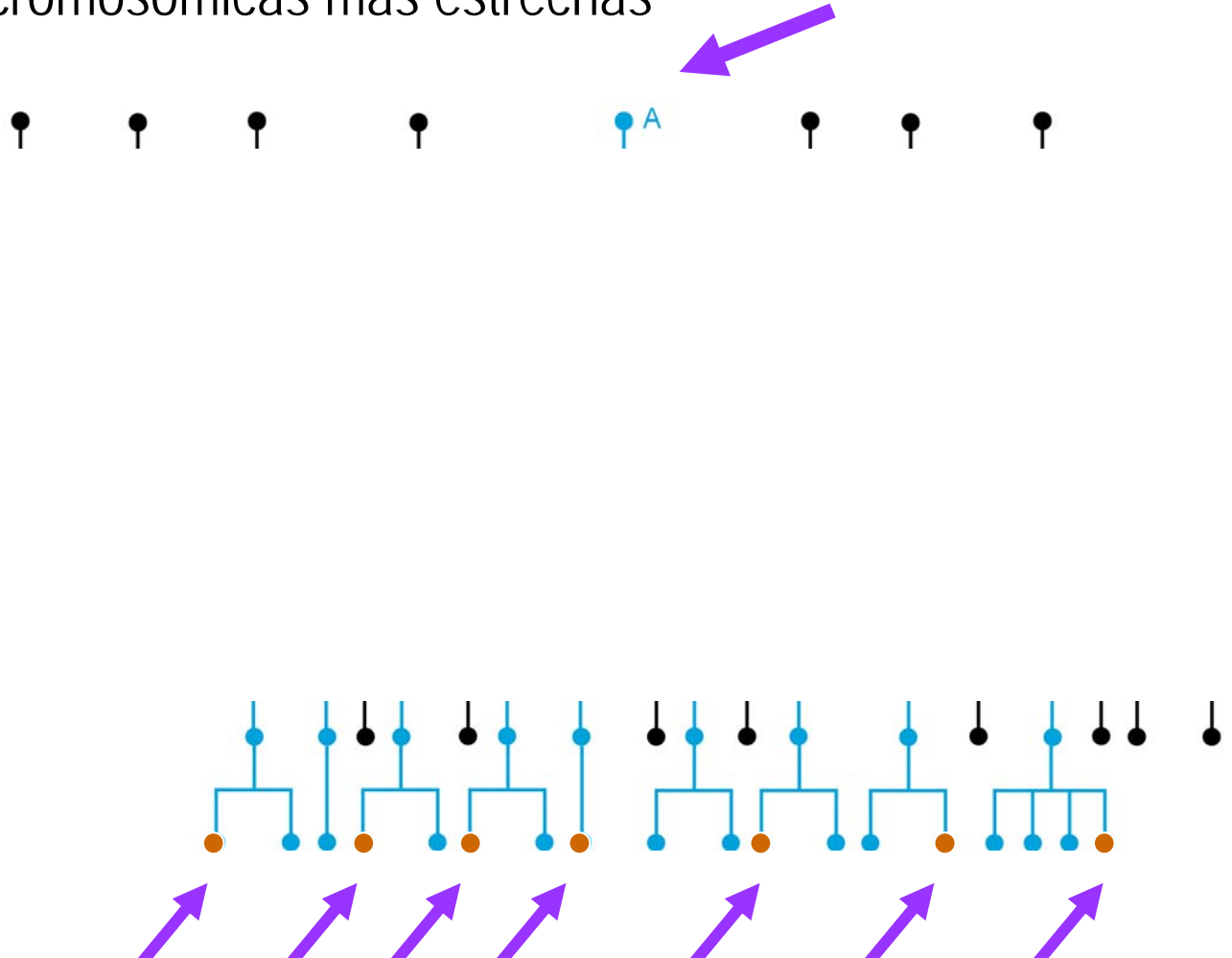


Símbolo	Locus	Tipo de herencia	OMIM#	Gen
GLC1A	1q23-q25	AD	601652	MYOC
GLC1B	2cen-q13	AD	606689	?
GLC1C	3q21-q24	AD	601682	?
GLC1D	8q23	AD	602429	?
GLC1E	10p15-p14	AD	602432	OPTN
GLC1F	7q35-q36	AD	603383	?

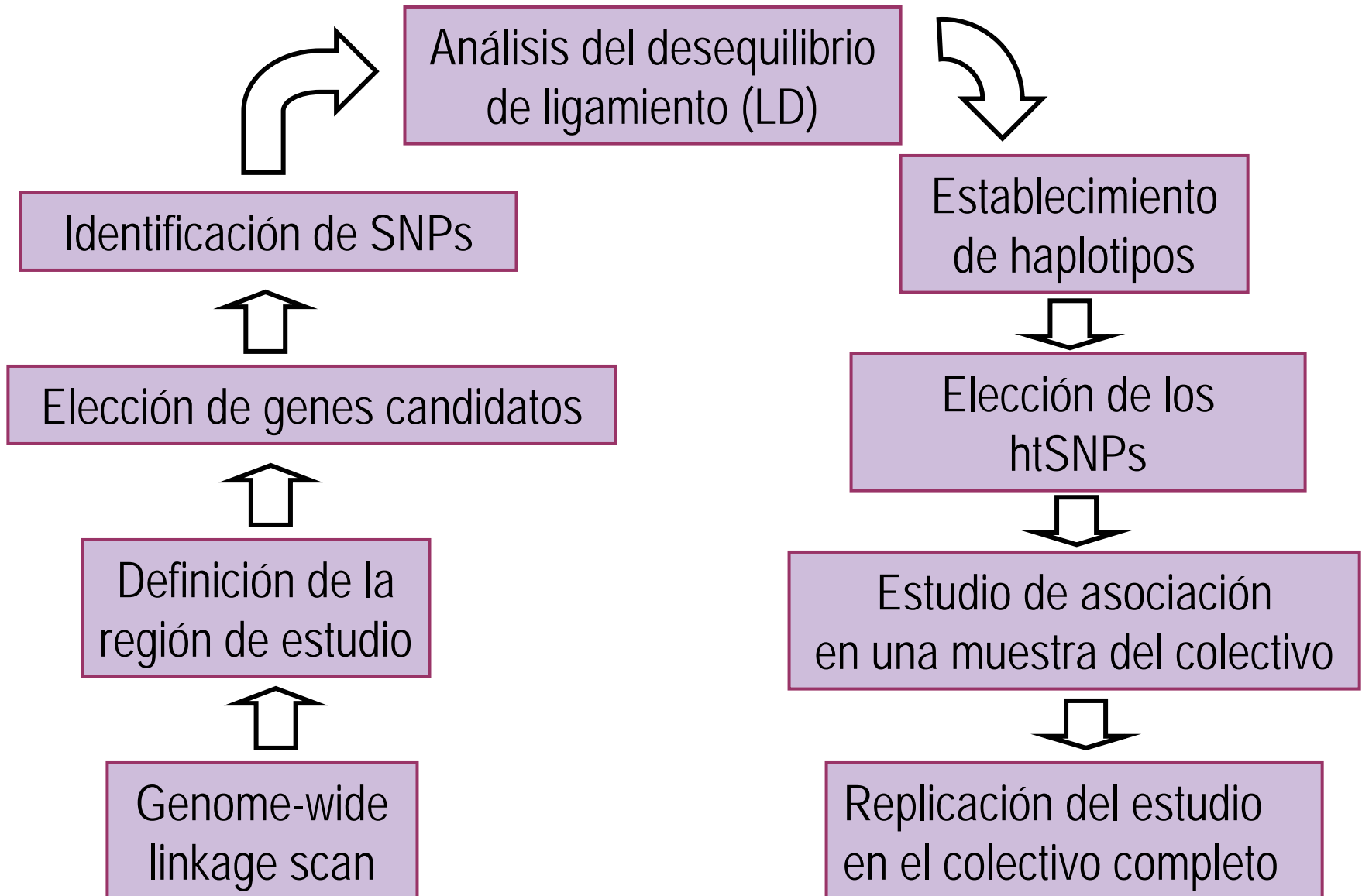
Estrategias de mapeo genético II

Estudios de asociación (casos – controles)

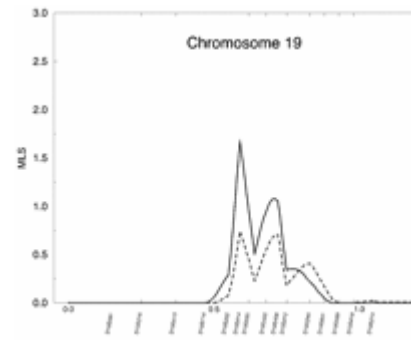
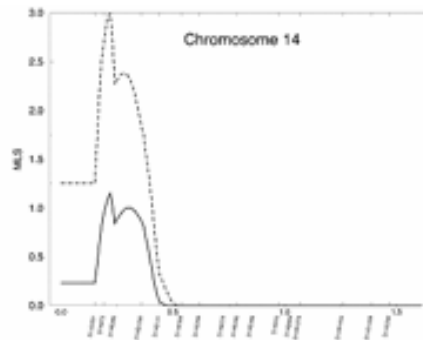
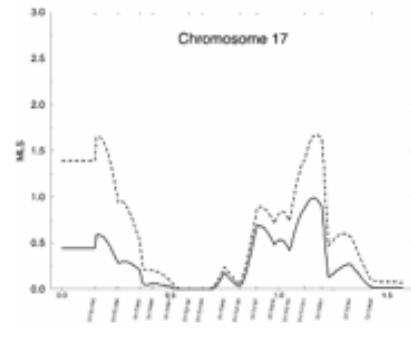
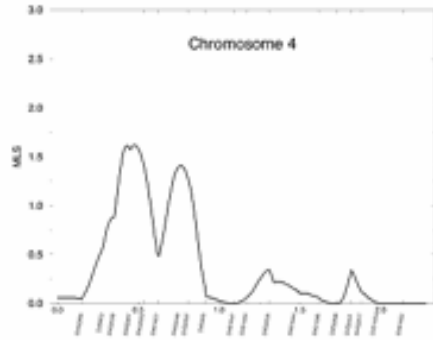
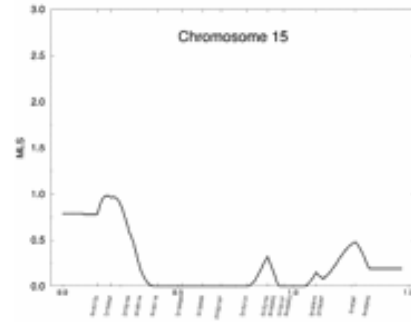
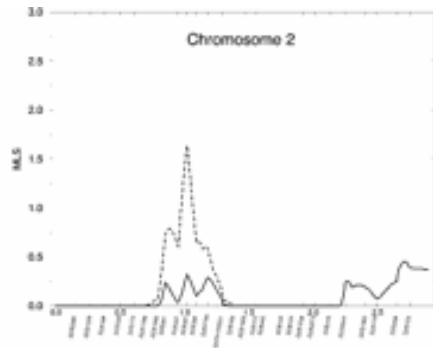
- facilidad en el reclutamiento de pacientes
- regiones cromosómicas más estrechas



Diseño experimental



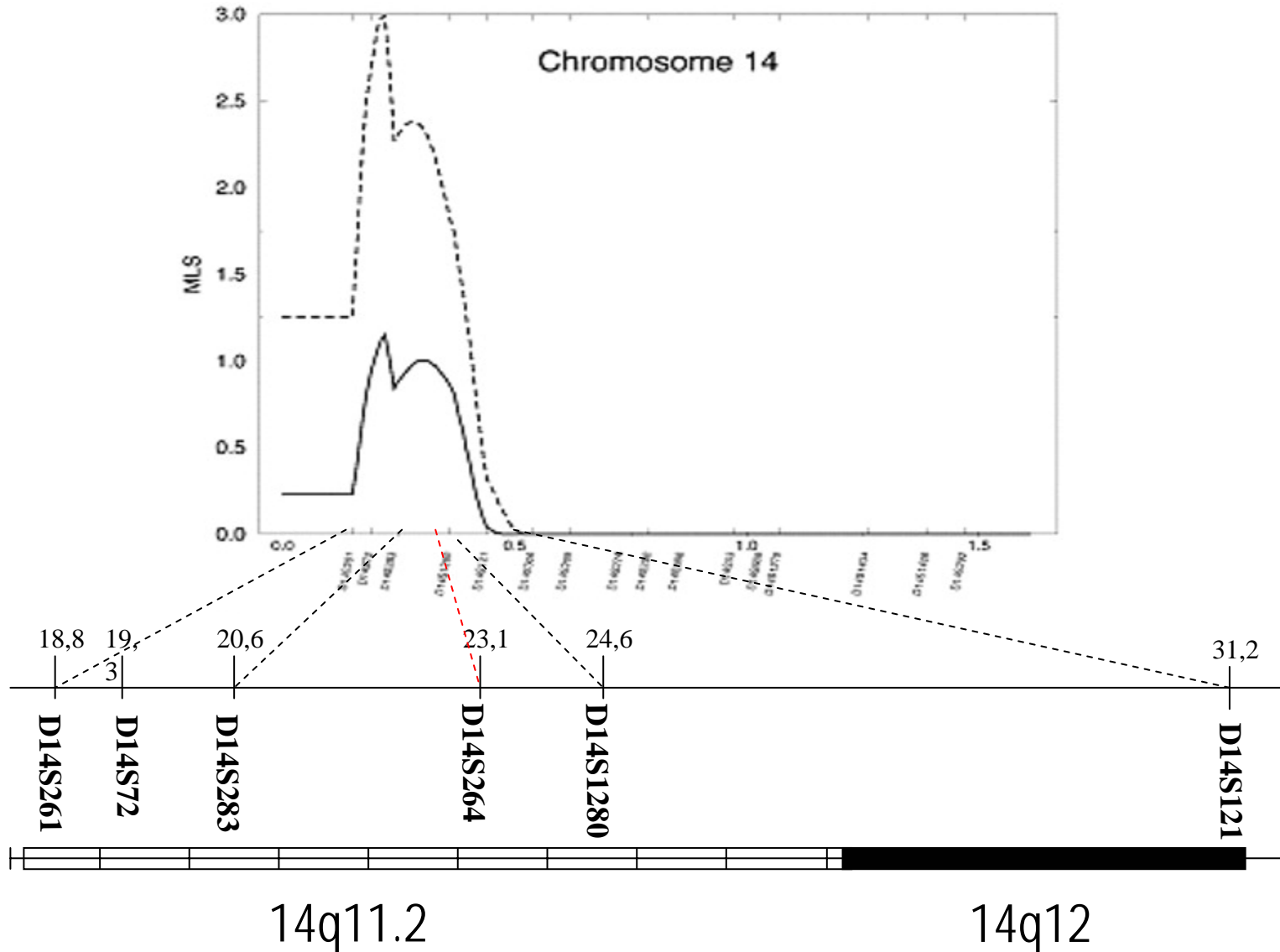
Genome-wide linkage scan



Posibles localizaciones:

- chr 2
- chr 4
- chr 14
- chr 15
- chr 17
- chr 19

Definición de la región de estudio



Elección de genes candidatos

1. Localización en 14q11.2 – q12
2. Expresión en tejidos afectados en POAG

www.ncbi.nlm.nih.gov

genome.ucsc.edu

www.cmbi.kun.nl/GeneSeeker

neibank.nei.nih.gov

3. Dominios estructurales presentes en MYOC y OPTN

www.sanger.ac.uk/Software/Pfam

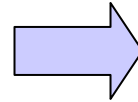
www.expasy.org

Genotipado

Secuenciación directa de exones y regiones intrónicas adyacentes:



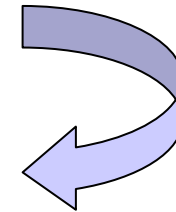
Amplificación de fragmentos



Purificación de amplicones



Secuenciación
ABI 3730



SNPs

SNP- *Single Nucleotide Polymorphism*

A T **G** T C G
A T **A** T C G

- frecuentes: 1 SNP / 1000 pb

- estables, no mutables

- binarios → automatización

- causantes de enfermedad ?

Estudios de
asociación

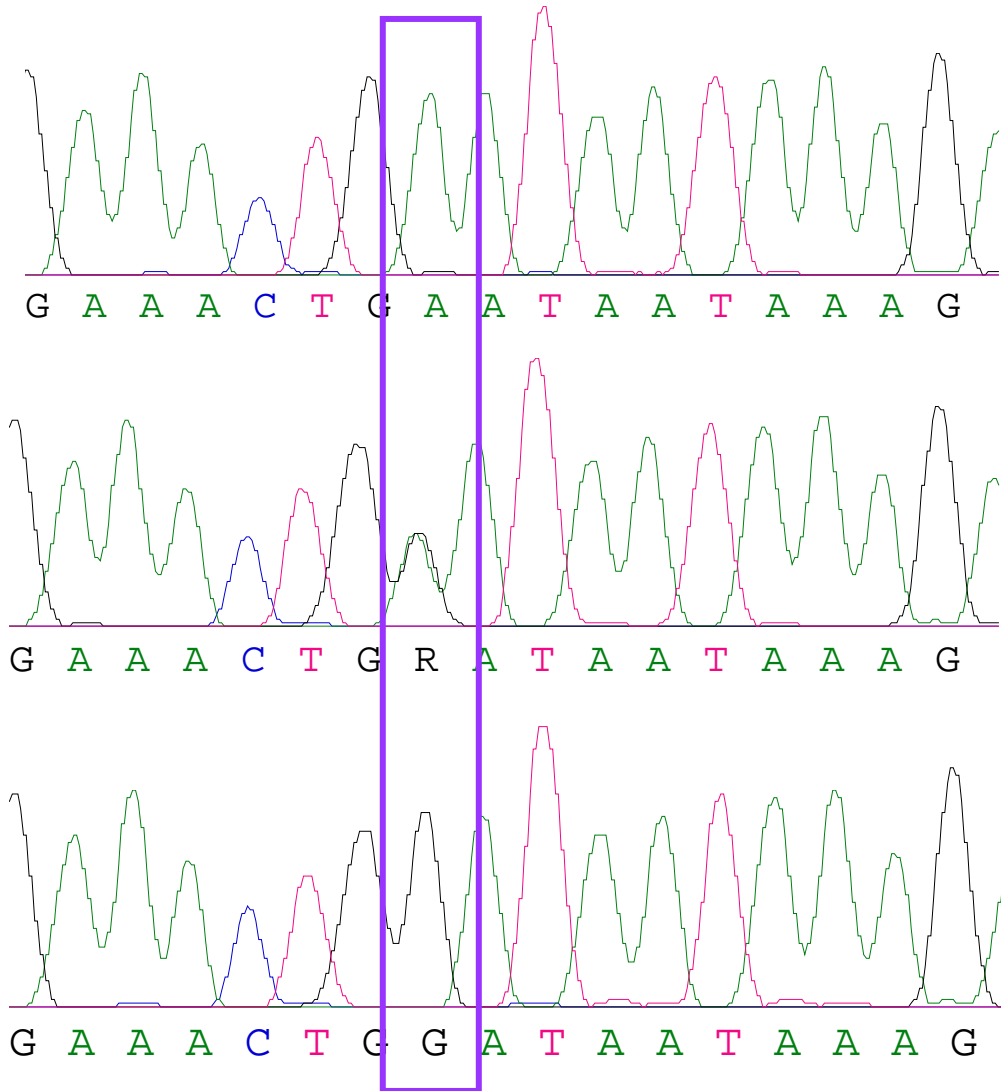
Screening
mutacional

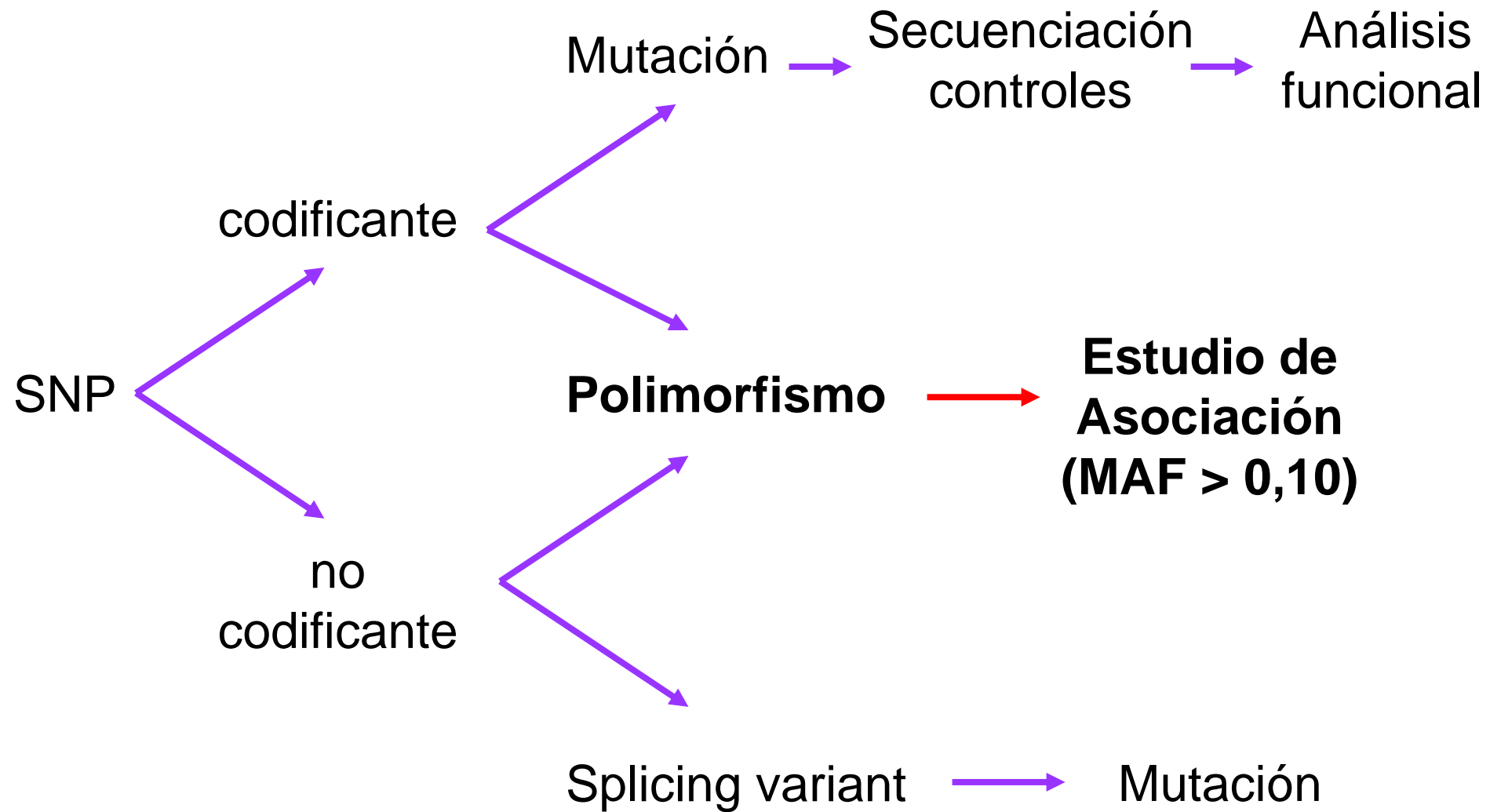
Position: 1

424 bp

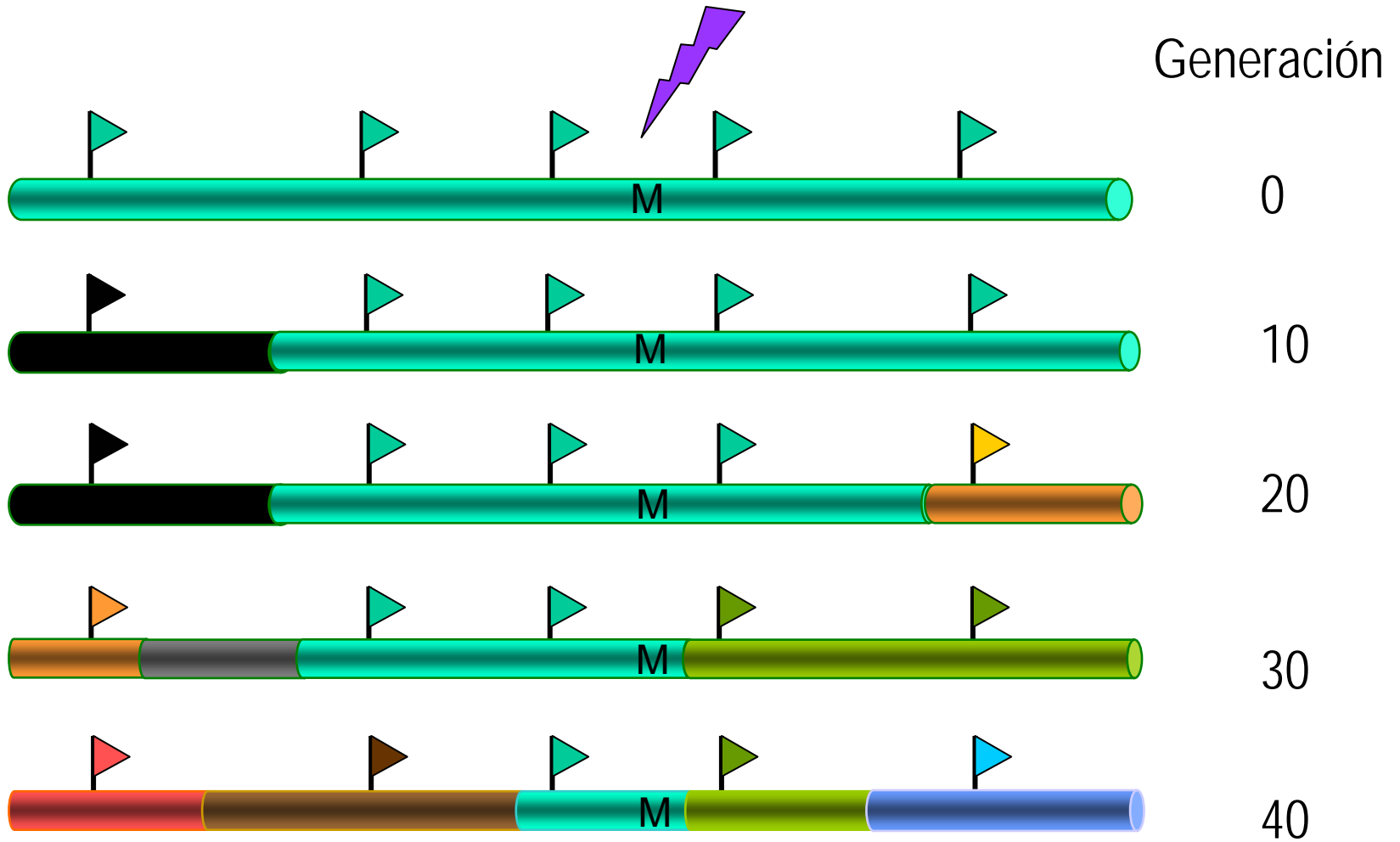


Identificación de SNPs





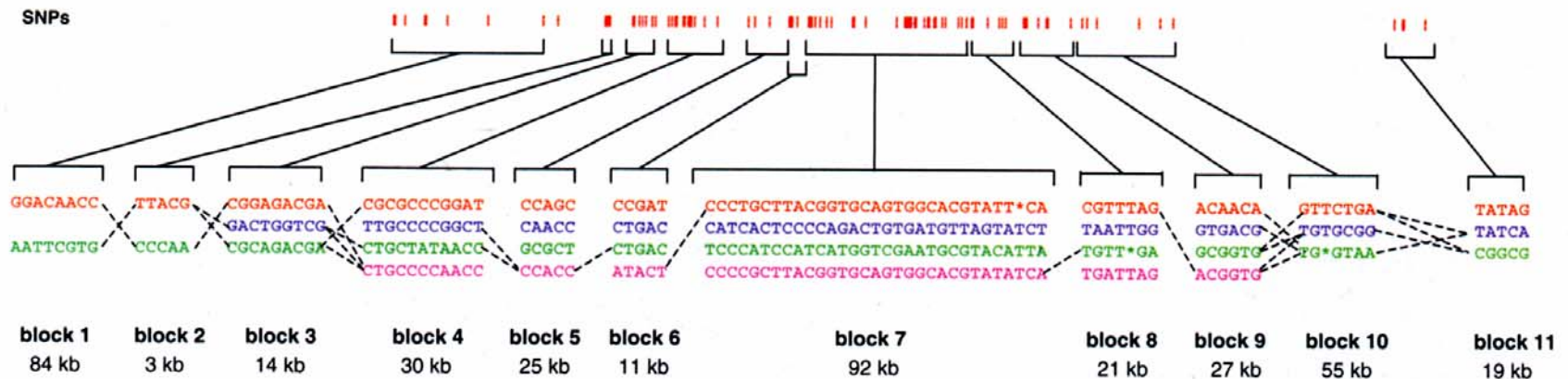
Desequilibrio de ligamiento (LD) I



Desequilibrio de ligamiento (LD) II

Patrones específicos de LD a lo largo del genoma:

- bloques separados por hot-spots de recombinación
- cada bloque presenta un limitado número de haplotipos
- posibilidad de identificar los distintos haplotipos mediante htSNPs



Análisis del desequilibrio de ligamiento (LD)

GOLD software *(Abecasis and Cookson, 2000)*

- Estimación del LD entre los SNP, por pares
- Representación gráfica de los resultados obtenidos

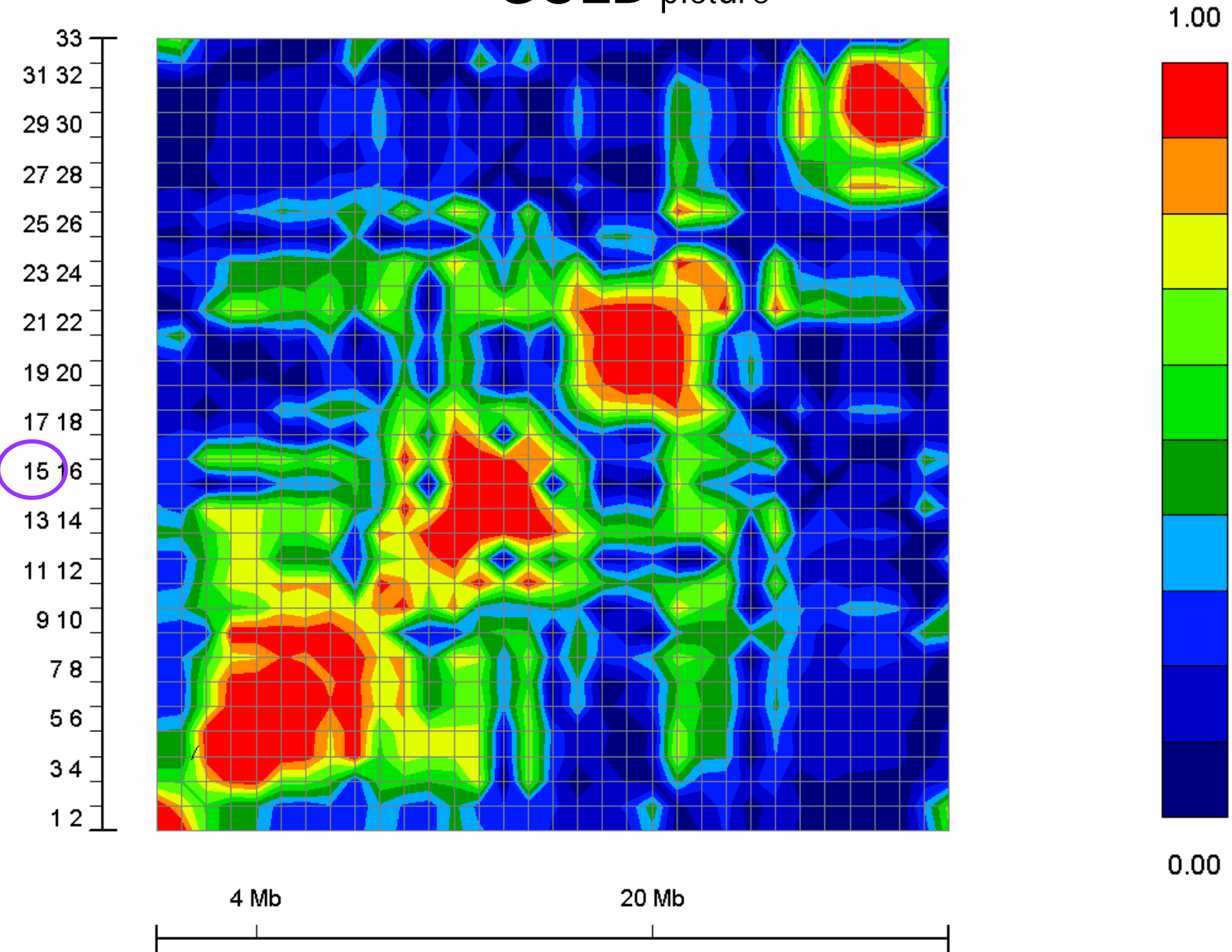
csg.sph.umich.edu/pn/index.php?furl=/abecasis/GOLD/index.html

ldmax (output)

$D' > 0,8$
 $p\text{-value} < 0,05$

M1	M2	a1	a2	N	df(0)	df(1)	ChiSq	pvalue	delta2	D'
15	8	2	2	370	368	367	25.51	0.00000	0.071	0.266
15	9	2	2	371	369	368	5.08	0.02424	0.013	0.315
15	10	2	2	367	365	364	29.51	0.00000	0.078	0.351
15	11	2	2	368	366	365	57.10	0.00000	0.129	0.833
15	12	2	2	373	371	370	82.48	0.00000	0.159	0.891
15	13	2	2	371	369	368	92.72	0.00000	0.191	0.951
15	14	2	2	370	368	367	143.50	0.00000	0.268	1.000
15	16	2	2	368	366	365	12.24	0.00047	0.035	0.305
15	17	2	2	364	362	361	18.69	0.00002	0.049	0.342
15	18	2	2	364	362	361	3.80	0.05136	0.010	0.456
15	19	2	2	370	368	367	0.00	0.98789	0.000	0.001

GOLD picture



Reconstrucción de haplotipos

PHASE v 1.0 *(Stephens et al. 2001)*

- reconstruye los haplotipos a partir de datos poblacionales
- número ilimitado de haplotipos
- posibilidad de manejo de genotipos que faltan
- *sólo para SNPs con MAF > 0,10*

www.stat.washington.edu/stephens/software.html

PHASE v 1.0

List of haplotypes found in best reconstruction,
with frequencies in parentheses.

(output)

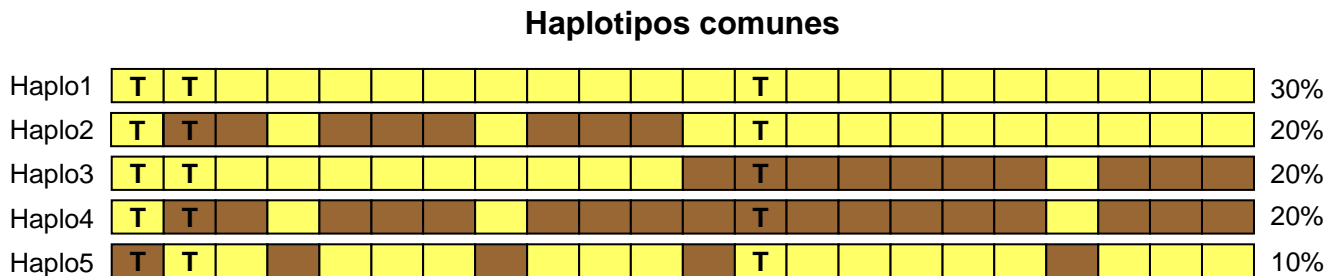
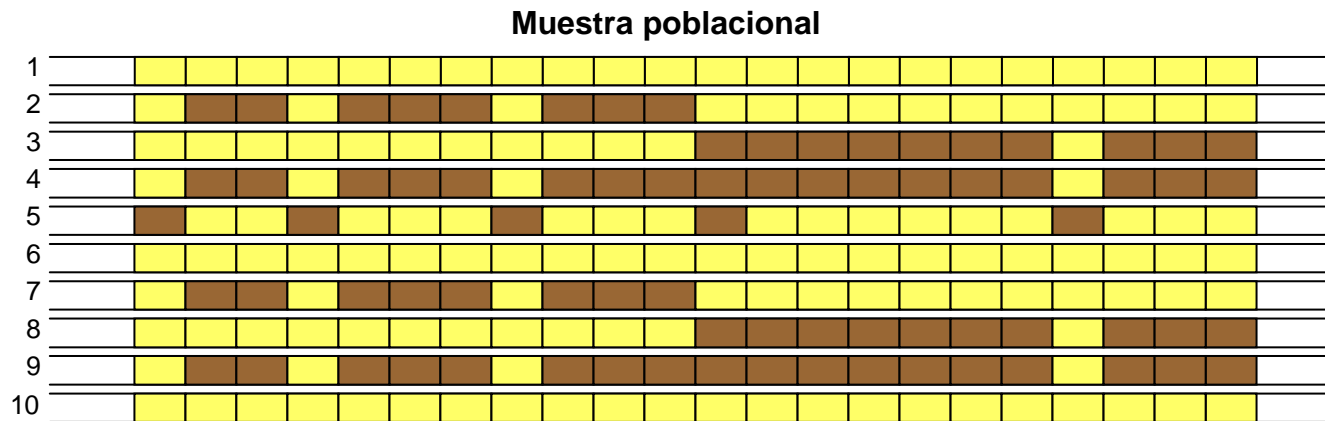
```
1: 1 1 1 1 2 2 2 2 1 2 2 2 (335)
2: 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 (208)
3: 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2 (12)
4: 2 1 1 1 2 2 2 2 1 2 2 2 (70)
5: 1 1 1 1 2 2 2 2 1 2 1 2 (53)
6: 1 1 1 1 2 1 2 2 2 2 2 2 (3)
7: 1 2 1 1 2 2 2 2 1 2 2 2 (1)
```

Summary of best reconstruction
(numbers refer to the list of haplotypes given above)

```
7995: (1,2)
7996: (1,1)
7997: (3,4)
7998: (5,1)
7999: (2,1)
8000: (2,2)
8001: (2,2)
```

Identificación de haplotype-tagging SNPs

ht-SNPs - mínimo set de SNPs que permiten distinguir los distintos haplotipos dentro de un bloque



SNPtagger

[Haplotype data \(pattern + frequency\)](#)

```
1 1 1 1 2 2 2 2 1 2 2 2 0.491
1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 0.305
1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2 0.017
2 1 1 1 2 2 2 2 1 2 2 2 0.102
1 1 1 1 2 2 2 2 1 2 1 2 0.077
1 1 1 1 2 1 2 2 2 2 2 2 0.004
1 2 1 1 2 2 2 2 1 2 2 2 0.001
```

[Markers to be included \(starting from 1 and separated by ","\)](#)

[Markers to be excluded \(starting from 1 and separated by ","\)](#)

[Fraction of haplotype patterns to be covered](#)

[\(Rare\) haplotypes to be included \(separated by ","\)](#)

[Number of output sets](#)

[Help](#)

Any comment or questions, please contact xiayi@well.ox.ac.uk

*****OUTPUT SETS OF htSNPS*****

*****Set 1*****

htSNP set

1 1 2
1 2 2
2 1 2
1 1 1

Positions of htSNPs

htSNP 1 corresponds to SNP 1
htSNP 2 corresponds to SNP 9
htSNP 3 corresponds to SNP 11

V								V	V						
1	1	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	0.491			
1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	0.305			
2	1	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	0.102			
1	1	1	1	2	2	2	2	1	2	1	2	0.077			

Completed!

Estudio del colectivo completo

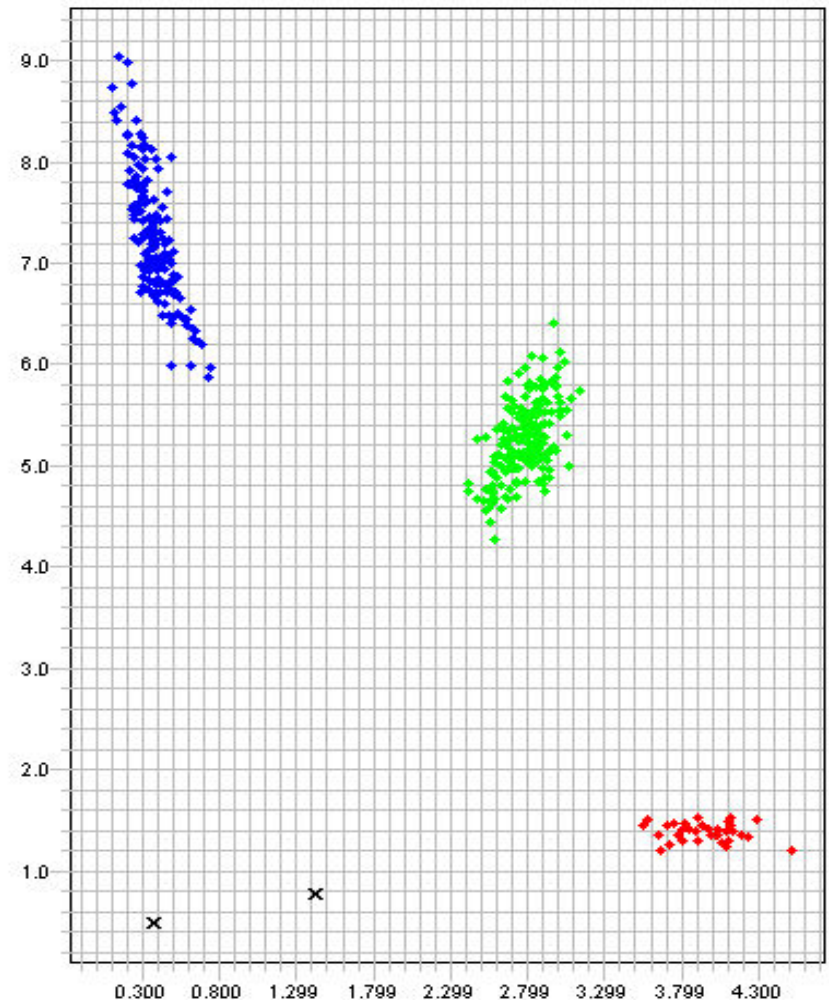
Taqman

- genotipado de los htSNPs en los colectivos de pacientes y controles

- ABI 7900 HT

- SDS software

- T homocigotos
- T/A heterocigotos
- A homocigotos
- X Controles



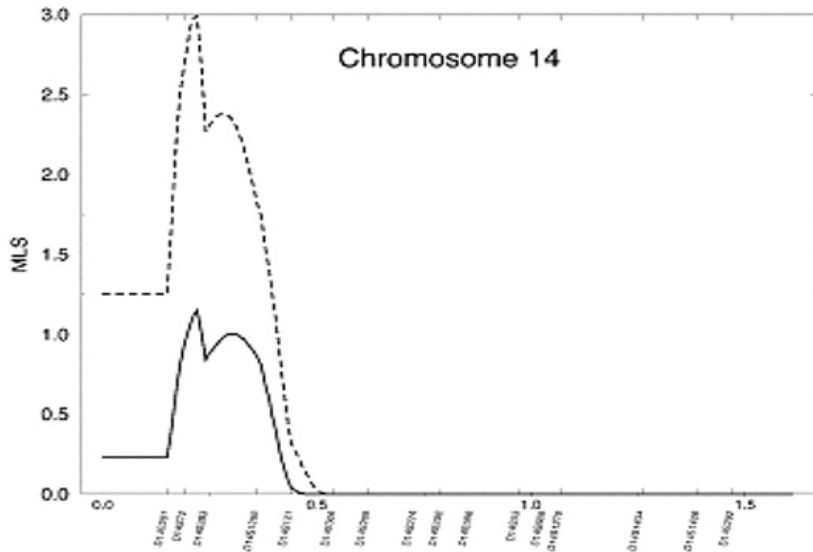
Situación actual

Reclutamiento de individuos:

- 53 pacientes JOAG
- 76 pacientes POAG
- 150 controles

Colectivo exploratorio → 46 pacientes

(descartadas mutaciones en MYOC, CYP1B1 y OPTN)



14q11.2 → 6,3 Mb

266 genes

9 candidatos

- ▶ 2 genes secuenciados → no mutación → Patrón de LD en construcción
- ▶ 7 genes en proceso de screening mutacional



Agradecimientos

André Reis

Francesca Pasutto

Gabriela Chavarría

Jesús Lascorz

Christian Thiel

Adrian Frisch

Petra Rothe

Andreas Welsch