



Gen-miljöinteraktioner i kardiovaskulär sjukdom

- NOS- och GST-gener samt luftföroreningar
från trafik

Anna Levinsson

Arbets- och Miljömedicin

Inst för medicin

Sahlgrenska Akademin vid Göteborgs Universitet

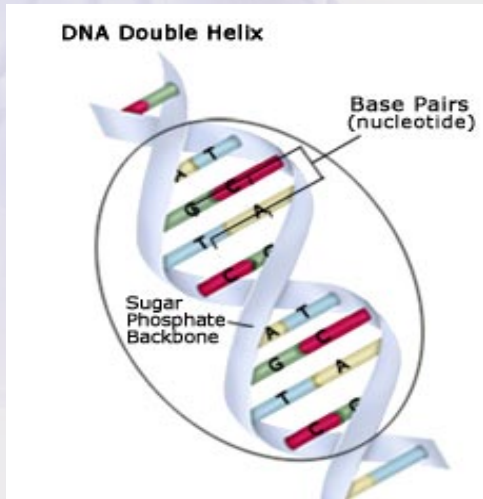
Projektets syfte

- Modifierar genetisk variation sambandet mellan luftföroreningsexponering och risk för hjärtkärlsjukdomar?

Studiepopulation

- INTERGENE
- 618 individer med kranskärlssjukdom (27% kvinnor)
- 3614 slumpmässigt utvalda populationskohortkontroller (53% kvinnor)
- Ålder 25-75

Vad är en SNP?



- Single Nucleotide Polymorphism
- Mutation av ett baspar i DNA
 - Allel = bas
- Genotyp
 - 'mutationsallel' = minor allel
 - Homozygot – heterozygot

Genetisk modell

- Genetiska modeller:

- Additiv



- Recessiv



- Dominant



● = Major allel

○ = Minor allel

Linkage disequilibrium (LD)

- Hur korrelerade två SNPar är
- Mäts med
 - $\underline{D'}$ (hur korrelerade SNParna är / hur korrelerade de kunde vara givet allelfrekvenserna)eller
 - $\underline{r^2}$ (korrelationskoefficient)

Mått på LD

- Två SNPar (A, B) med vardera två alleler (A1, A2, B1, B2)
- Haplotyp = kombination/sekvens av alleler på samma kromosom

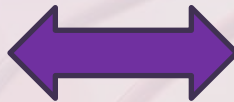
Haplotyp	Frekvens
----------	----------

A_1B_1	x_{11}
----------	----------

A_1B_2	x_{12}
----------	----------

A_2B_1	x_{21}
----------	----------

A_2B_2	x_{22}
----------	----------



Allel	Frekvens
-------	----------

A_1	$p_1 = x_{11} + x_{12}$
-------	-------------------------

A_2	$p_2 = x_{21} + x_{22}$
-------	-------------------------

B_1	$q_1 = x_{11} + x_{21}$
-------	-------------------------

B_2	$q_2 = x_{12} + x_{22}$
-------	-------------------------

- $D = x_{11}x_{22} - x_{12}x_{21}$

$$D' = D/D^{\max}$$

$$r^2 = D^2/[p_1p_2q_1q_2]$$

Delprojekt 1:

Varianter i kväveoxidsyntas-generna (NOS) är associerade med kranskärlssjukdom (CHD) och hypertoni i INTERGENE-studien

NOS



eNOS

Bild: Zemojtel et. Al (2003)

- Nitric oxide synthase (kväveoxidsyntas)
- 3 typer: neuronalt, inducibelt och endotelialt
- nNOS – *NOS1*, iNOS – *NOS2*, eNOS – *NOS3*
- Neuronalt NOS fungerar t.ex. som neurotransmitter i hjärnan
- Inducibelt NOS uttrycks vid t.ex. inflammation
- Endotelialt NOS påverkar t.ex. blodtryck
- Tidigare forskning har visat på samband mellan NO/NOS-generna och kardiovaskulära utfall, men det är oklart hur och vilka genetiska förändringar som påverkar

Syfte & metod

- Vilka SNPar kodade enligt vilka genetiska modeller är starkast associerade med CHD respektive hypertoni?
- INTERGENE: 618 CHD-fall, 3614 kontroller
- Genotypning av 58 SNPar i *NOS1*, *NOS2* och *NOS3*
 - Individer som saknade mer än 25% genotypdata exkluderades från analyserna

3351 individer: 560 CHD-fall, 2791 kontroller

Demografi

Characteristic	Total study population	
	CHD cases No. (%)	Population Control Sample No. (%)
Total	560 (16.7%)	2791 (83.3%)
Age		
≤34 years	2 (0.36%)	389 (14.0%)
35-44 years	12 (2.14%)	611 (21.9%)
45-54 years	96 (17.1%)	592 (21.2%)
55-64 years	206 (36.8%)	652 (23.4%)
≥65 years	244 (43.6%)	547 (19.6%)
Women	149 (26.6%)	1490 (53.4%)
Ever smokers	411 (73.4%)	1389 (49.8%)
Diabetes	101 (18.0%)	102 (3.67%)
	Mean (SD)	Mean (SD)
BMI, kg/m ²	27.9 (4.18)	26.0 (4.06)
LDL cholesterol, mM	2.48 (0.84)	3.25 (0.97)
HDL cholesterol, mM	1.35 (0.38)	1.63 (0.44)
Total cholesterol, mM	4.59 (1.05)	5.49 (1.10)
SBP, mmHg	134 (21.1)	132 (21.5)

CHD: coronary heart disease; BMI: Body Mass Index; LDL: low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein; SBP: systolic blood pressure

Metod, forts.

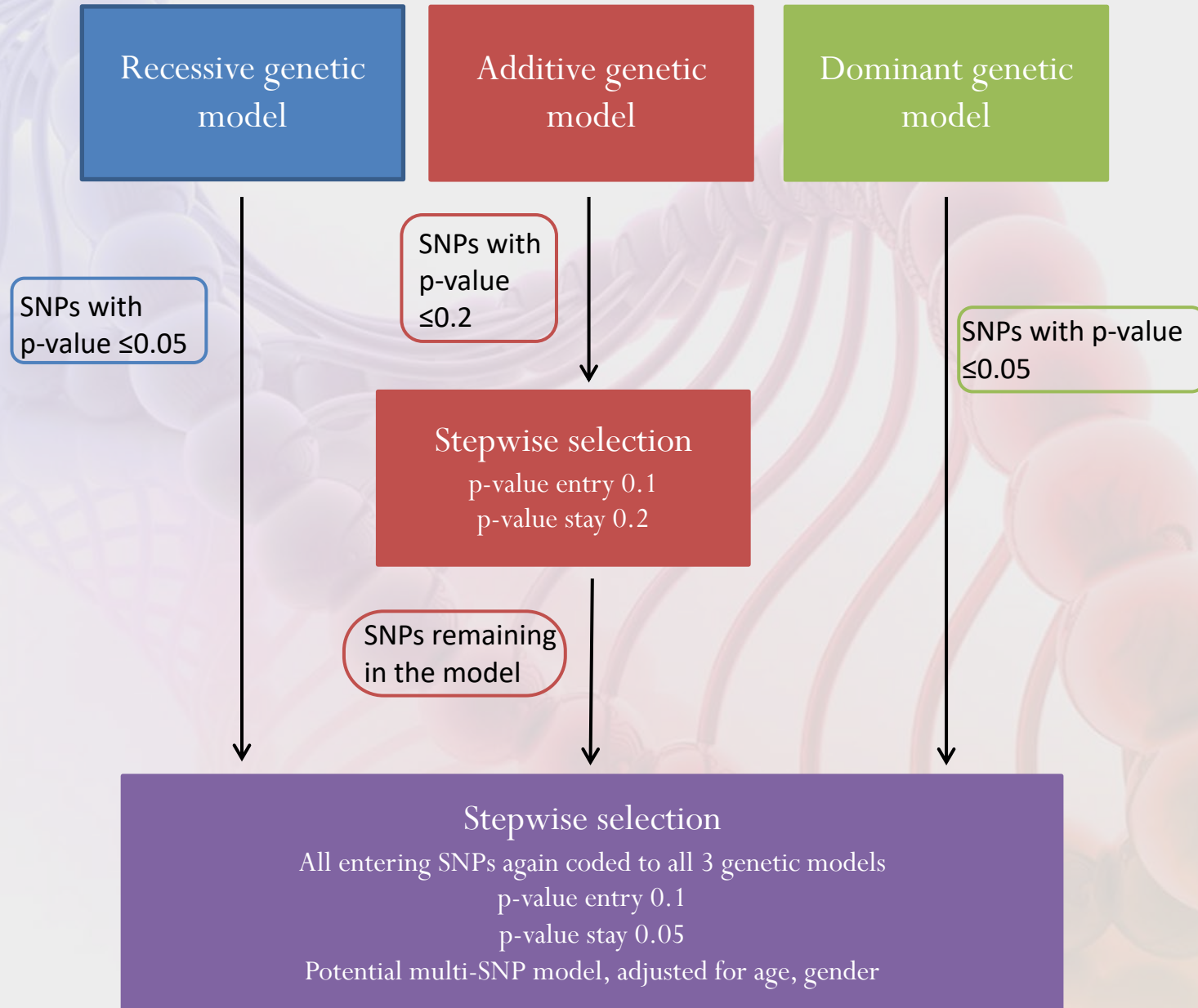
- Stegvis analys, logistisk regression i SAS
- Single-SNP-modeller

CHD = ålder kön SNP

Hypertoni = ålder kön SNP

- Varje SNP analyseras kodad till alla 3 genetiska modellerna additiv, recessiv och dominant

Single-SNP models, adjusted for age, gender



Resultat – CHD

Gene: SNP (genetic model)	Genotype	SNP association with CHD*			
		OR	95% CI		p-value
NOS1: rs3782218 (additive)	TT	0.59†	0.44	0.80	0.0006
	CT				
	CC	Ref			
NOS1: rs2682826 (recessive)	AA	1.73	1.07	2.82	0.03
	AG	} Ref			
	GG				
NOS3: rs1549758 (dominant)	TT	} 1.38	1.05	1.82	0.02
	CT				
	CC	Ref			

*Adjusted for gender, age, diabetes status, smoking status, SBP, LDL and HDL and the other SNPs

† Effect is per T-allele

Resultat – hypertoni

Gene: SNP (genetic model)	Genotype	SNP association with hypertension*			
		OR	95% CI		p-value
<i>NOS1</i> : rs3782218 (additive)	TT				
	CT	0.81†	0.68	0.97	0.02
	CC	Ref			
<i>NOS1</i> : rs7314935 (recessive)	AA	2.15	1.06	4.37	0.03
	AG	Ref			
	GG				
<i>NOS2</i> : rs2255929 (additive)	AA	1.18†	1.03	1.34	0.02
	AT				
	TT				
<i>NOS3</i> : rs3918226 (dominant)	TT	1.32	1.01	1.72	0.04
	CT				
	CC	Ref			
<i>NOS3</i> : rs3918227 (dominant)	AA	0.79	0.62	1.01	0.06
	AC				
	CC	Ref			

* Adjusted for gender, age, diabetes status, body mass index (BMI), total cholesterol and the other SNPs

† Effect is per T-allele

Resultat – haplotypanalys

CHD

Haplotype*	Sample frequency	Modelling of all haplotypes ^				Modelling haplotype GT against all others ^	
		Odds ratio	95% Confidence interval	p-value		Odds ratio	95% Confidence interval
GT	0.11	0.50	0.34 - 0.71	<0.01	} Reference	0.43	0.30 - 0.61
AT	0.05	0.61	0.35 - 1.05	0.07			
GC	0.61	Reference					
AC	0.23	1.14	0.96 - 1.35	0.15			

* For rs2682826: A is the minor allele, for rs3782218: T is the minor allele

^ Model is adjusted for gender, age, diabetes status, smoking, systolic blood pressure, high- and low-density lipoprotein and the other haplotypes

Hypertoni

Haplotype*	Sample frequency	Modelling of all haplotypes ^				Modelling haplotype GT against all others ^	
		Odds ratio	95% Confidence interval	p-value		Odds ratio	95% Confidence interval
GT	0.17	0.86	0.73 - 1.01	0.06	} Reference	0.84	0.72 - 0.98
AT	< 0.01	1.45	0.11 - 18.57	0.77			
GC	0.70	Reference					
AC	0.13	1.14	0.96 - 1.34	0.13			

* For rs7314935: A is the minor allele, for rs3782218: T is the minor allele

^ Model is adjusted for gender, age, diabetes status, body mass index, total cholesterol and the other haplotypes

Diskussion

- *NOS1* SNP rs3782218 skyddande effekt båda utfallen
- Haplotypanalysen indikerar att för CHD är T-allelen i rs3782218 den viktigaste för den observerade effekten, för hypertoni tycks båda *NOS1*-SNParna vara en markör för samma effekt
- SNP:ar i *NOS1*, *NOS2* och *NOS3* associerade med risk för CHD, hypertoni eller båda utfallen
- Funna *NOS3* SNP-associationer för hypertoni är i högt LD med tidigare publicerade SNP:ar, kan vara markörer för samma effekt

Slutsats

- Polymorfismer i *NOS*-gener är associerade med risk för CHD och hypertoni

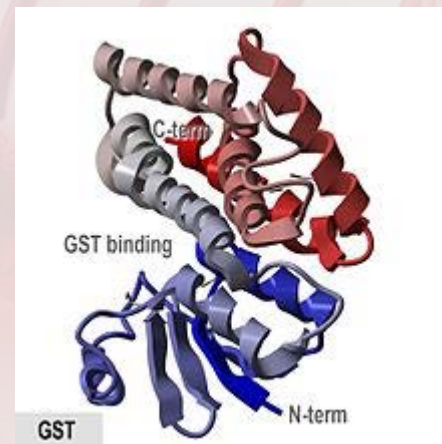
Delprojekt 2:

Interaktionseffekter av långtidsexponering för
trafikrelaterade luftföroreningar
och varianter i GSTP1-, GSTT1-
& GSTCD-generna

på risk för akut hjärtinfarkt (AMI) och hypertoni

GST

- Glutathione S-Transeferase
- Enzym med antioxidantisk verkan, dvs motverkar de skadliga effekterna av oxidativ stress
- Kodas av ett antal olika gener i olika familjer, t.ex. de vi tittat på (GSTP1, GSTT1 och GSTCD)



Delprojekt 2: Frågeställningar

- Är långtidsexponering för trafikrelaterade luftföroreningar associerat med (ökad) risk för akut hjärtinfarkt (AMI) och hypertoni?
- Är genetisk variation i GSTP1, GSTT1 och GSTCD associerat med risk för AMI och hypertension?
- Modifierar dessa genetiska varianter associationen mellan långtidsexponering för trafikrelaterade luftföroreningar och de två fenotyperna?

Trafikrelaterade luftföroreningar - exponeringsdata

- NO_2 och NO_x anv. ofta som markörer för luftföroreningar i form av avgaser
- NO_x har mätts på en plats (väderstationen på Femmans tak)
- Studieindividernas hemadresser vid tidpunkten för inklusion i studien har konverterats till koordinater
- Årsmedelvärden för NO_x på dessa koordinater har beräknats med hjälp av de uppmätta värdena och en GIS (Geographical Information System)-modell – Miljökontoret i Göteborgs kommun
- NO_2 beräknat från NO_x mha lokal empirisk formel
- Intergene upprättades 2001-2004, pga tillgång till data hos Miljökontoret har vi årsmedelvärden för 2006 & 2007, där 2007 använts i första hand eftersom det geografiska området är större för detta år

Databehandling

- INTERGENE: 192 AMI-fall, 3614 kontroller
 - Kombinera med exponeringsdata (NO_2 och NO_x)
 - Individer som saknar exponeringsdata utesluts
 - Kombinera med genotypsdata (7 SNPar i GSTP1, en SNP som fångar null-genotypen av GSTT1 och en SNP i GSTCD)
 - Individer som saknar mer än 25% av genotypdata utesluts

Återstår 1429 individer: 119 AMI-fall och 1310 kontroller

Resultat - luftföroreningsexponering

Indicator of air pollution exposure	Effect per 10µg/m ³ increase of annual mean *					
	AMI			Hypertension		
	OR	95% CI	p-value	OR	95% CI	p-value
NO ₂	1.69	1.00-2.87	0.05	0.81	0.57-1.14	0.22
NOx	1.38	0.98-1.95	0.06	0.90	0.72-1.13	0.35

* Adjusted for gender, age, age squared and residential area

AMI: acute myocardial infarction, OR: odds ratio, CI: confidence interval

Resultat – GST-gener

Gene: SNP	Outcome	Genetic model	Effect estimates and precision*		
			OR	95% CI	p-value
<i>GSTP1</i> : rs596603	AMI	(TT + GT) vs. GG	0.77	0.51-1.16	0.21
<i>GSTP1</i> : rs1871042	Hypertension	(TT + TC) vs. CC	0.66	0.50-0.87	<0.01
<i>GSTP1</i> : rs749174	Hypertension	(AA + AG) vs. GG	0.66	0.50-0.88	<0.01
<i>GSTP1</i> : rs762803	Hypertension	(AA + CA) vs. CC	0.66	0.49-0.89	<0.01
<i>GSTCD</i> : rs10516526	AMI	(GG + AG) vs. AA	0.65	0.32-1.28	0.21
	Hypertension	(GG + AG) vs. AA	0.88	0.57-1.36	0.55
<i>GSTT1</i> : rs2266637	AMI	Null vs. Non-null	0.65	0.33-1.27	0.20
	Hypertension	Null vs. Non-null	0.88	0.59-1.33	0.55

*Adjusted for age, age squared, BMI and gender, ^Percent of non-missing, AMI: acute myocardial infarction, OR: odds ratio, CI: confidence interval.

Resultat – interaktion

			Markers for long-term air pollution exposure, effects per 10µg/m ³ increase of annual mean *					
			NO ₂			NO _x		
Gene: SNP	Outcome	Genotype	OR	95% CI	p-value	OR	95% CI	p-value
GSTP1: rs596603	AMI	GG	1.40	0.73-2.68	0.31	1.24	0.81-1.90	0.32
		GT + TT	1.92	1.01-3.67	0.05	1.49	0.96-2.31	0.08
GSTP1: rs1871042	Hypertension	CC	0.85	0.55-1.33	0.48	0.95	0.72-1.27	0.73
		TC + TT	0.74	0.47-1.17	0.20	0.84	0.62-1.15	0.29
GSTP1: rs749174	Hypertension	GG	0.87	0.56-1.34	0.20	0.96	0.72-1.27	0.77
		AG + AA	0.75	0.48-1.17	0.60	0.84	0.63-1.14	0.27
GSTP1: rs762803	Hypertension	CC	0.75	0.46-1.22	0.25	0.87	0.63-1.20	0.40
		CA + AA	0.90	0.59-1.36	0.61	0.98	0.74-1.30	0.86
GSTT1: rs2266637	AMI	Null	1.29	0.31-5.33	0.73	1.23	0.44-3.43	0.70
		Non-null	1.93	1.09-3.41	0.02	1.51	1.04-2.20	0.03
	Hypertension	Null	0.76	0.35-1.66	0.49	0.92	0.54-1.56	0.76
		Non-null	0.85	0.57-1.26	0.41	0.94	0.73-1.22	0.65
GSTCD: rs10516526	AMI	AA	1.86	1.07-3.24	0.03	1.48	1.03-2.13	0.04
		AG + GG	0.87	0.24-3.19	0.83	0.89	0.35-2.30	0.81
	Hypertension	AA	0.85	0.58-1.26	0.43	0.95	0.74-1.22	0.67
		AG + GG	0.91	0.45-1.86	0.80	0.97	0.59-1.60	0.91

* Adjusted for age, age squared, gender, BMI and residential area
OR: odds ratio; CI: confidence interval, AMI: acute myocardial infarction

AMI-risk utan
genotypstratifiering:
1.69 resp 1.38

Diskussion

- Associationen mellan luftföroreningsexponering och AMI är konsistent med tidigare forskning
- G-allelen i GSTCD rs10516526 ej tidigare rapporterad i samband med kardiovaskulär sjukdom, dock som gynnsam för lungfunktion; tycks vara gynnsam för både lungfunktion och kardiovaskulär sjukdom
- Studiens power skulle kunna ökas om luftföroreningsdata kunde tas fram för ett större geografiskt område
- Justering för bostadsområde medför risk för att tappa exponeringskontrast, dock fångar justeringen potentiell confounding av geografisk selektionsbias och till viss del SES. Slutligen har vi fått ett signifikant samband mellan exponering och AMI

Slutsats

- Exponering för trafikrelaterade luftföroreningar medför en ökad risk för AMI
- Effekten av exponering för trafikrelaterade luftföroreningar är olika i olika genotypstrata för varianter i GSTP1, GSTT1 och GSTCD men interaktionen är inte statistiskt signifikant

Epidemiologi: statistiker & läkare



?



Hur bygger man en modell?

- Statistisk signifikans (prediktor)
- Påverkar estimatet av intresse
- Är en erkänd riskfaktor/brukar inkluderas

Hur många kovariater kan/ska/bör man ha?

- Fall-per-frihetsgrad-principen
 - 5? 15?

Bonferroni-korrektion?

- Ska man korrigera för multiple testing? När?
 - „Biologisk underliggande rational“
- Hur?

Hur beräknar man interaktion?

- Interaktionsterm (statistisk interaktion)
- Synergi-index (Rothman, biologisk interaktion)
- Stratifierad effekt („epidemiologisk modell“)



Tack!