

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta

Katedra Antropologie a genetiky člověka

**Genetické příčiny MODY**  
**(Maturity-Onset Diabetes of the Young) –**  
**sledování prevalence mutací „MODY“ genů**  
**v české populaci diabetiků a kontrol**

Dizertační práce

Praha 2007

Mgr. Petra Lukášová  
roz. Šamalíková

## PROHLÁŠENÍ

Tato dizertační práce završuje postgraduální studium na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze, které probíhalo na katedře Antropologie a genetiky člověka v letech 1999–2007. Práce byla vypracována v Endokrinologickém ústavu v Praze, v laboratoři Oddělení molekulární endokrinologie pod odborným vedením vedoucí tohoto oddělení RNDr. Běly Bendlové, CSc., jako součást řešení grantových projektů IGA MZ ČR NB/5395-5, KONTAKT CZE 020-00 MŠMT, KONTAKT ME 464, COST OC.B17.10 MŠMT, GA ČR 301/04/1085, IGA MZ ČR NR/7809-5.

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracovala samostatně a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Dále prohlašuji, že jsem tuto práci ani její podstatnou část nepoužila pro získání jiného ani stejného akademického titulu.

V Praze dne

2007

Mgr. Petra Lukášová

.....

## PODĚKOVÁNÍ

Především bych chtěla poděkovat své odborné školitelce doktorce RNDr. Běle Bendlové, CSc., za trpělivý a přátelský přístup, za nesmírnou ochotu, vstřícnost a neutuchající optimismus, které přispívaly k úspěšnému řešení menších i větších potíží, jež provázejí každou, nejen výzkumnou činnost. Velmi si cením odborného vedení a rad při řešení praktické části této práce i teoretických připomínek a diskuze nad samotným textem.

Dále bych ráda poděkovala všem svým kolegům z Oddělení molekulární endokrinologie včetně laborantek za vytvoření příjemného prostředí pro realizaci této práce. Jmenovitě bych uvedla své nejbližší spolupracovníky RNDr. Markétu Vaňkovou, Ph.D., RNDr. Danielu Vejražkovou a Mgr. Josefa Včeláka, kteří se spolupodíleli na organizaci sběru dat a jejich průběžném ukládání do databáze.

Děkuji doc. MUDr. Karlu Vondrovi, DrSc., Mudr. Haně Kvasničkové a samozřejmě i všem ostatním spolupracovníkům z Laboratoře funkčních testů, kteří zajišťovali zdárný průběh vyšetřování účastníků výzkumu.

Děkuji RNDr. Pavlovi Bláhovi, CSc., z katedry Antropologie a genetiky člověka PřF UK, že umožnil zpracovávat antropometrická data programem ANTROPO.

Můj dík patří i všem pacientům a jejich rodinným příslušníkům za jejich účast ve studii.

Na závěr bych chtěla vyjádřit vděčnost a lásku svému manželovi, svým rodičům a všem blízkým, jejichž morální podpora, trpělivost, důvěra a porozumění v průběhu celých mých studií mi umožnily vypracovat a dokončit tuto práci.

Zvláštní poděkování patří manželově mamince za pomoc s jazykovou a stylistickou úpravou následujícího textu.

**OBSAH**

1. ÚVOD .....	4
1.1 HISTORICKÝ PŘEHLED .....	4
1.2 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY MODY .....	7
1.3 INZULINOVÁ SEKRECE .....	10
2. HEPATOCYTÁRNÍ NUKLEÁRNÍ FAKTOR-4 $\alpha$ (MODY1) .....	13
2.1 HISTORIE .....	13
2.2 BIOCHEMICKÝ MECHANISMUS .....	13
2.3 GENETIKA .....	14
2.3.1 POLYMORFISMY ASOCIOVANÉ S DM2 .....	15
2.4 FENOTYP A LÉČBA .....	17
3. GLUKOKINÁZA .....	18
3.1 HISTORIE .....	18
3.2 BIOCHEMICKÝ MECHANISMUS .....	18
3.3 GENETIKA .....	23
3.3.1 MODY2 .....	25
3.3.2 PPHI .....	26
3.3.3 PNDM .....	26
3.3.4 POLYMORFISMUS -30G>A V B-PROMOTORU GCK GENU .....	27
3.4 FENOTYP A LÉČBA MODY2 .....	28
4. HEPATOCYTÁRNÍ NUKLEÁRNÍ FAKTOR-1 $\alpha$ (MODY3) .....	29
4.1 HISTORIE .....	29
4.2 BIOCHEMICKÝ MECHANISMUS .....	29
4.3 GENETIKA .....	31
4.3.1 POLYMORFISMY ASOCIOVANÉ S DM2 .....	31
4.4 FENOTYP A LÉČBA .....	33
5. INZULINOVÝ PROMOTOROVÝ FAKTOR-1 (MODY4) .....	35
5.1 HISTORIE .....	35
5.2 BIOCHEMICKÝ MECHANISMUS .....	35
5.3 GENETIKA .....	36
5.4 FENOTYP A LÉČBA .....	36

---

6. HEPATOCYTÁRNÍ NUKLEÁRNÍ FAKTOR-1 $\beta$ (MODY5) .....	37
6.1 HISTORIE .....	37
6.2 GENETIKA, FENOTYP A LÉČBA .....	37
7. NEUROGENNÍ DIFERENCIAČNÍ PROTEIN-1 (MODY6) .....	38
7.1 HISTORIE .....	38
7.2 BIOCHEMICKÝ MECHANISMUS .....	38
7.3 GENETIKA .....	38
7.3.1 POLYMORFISMUS A45T .....	39
8. MODYx .....	40
8.1 ISLET (Isl-1).....	42
8.2 NEUROGENIN3 (Ngn3).....	43
8.3 Pax4, Pax6.....	44
8.4 TCF7L2 .....	44
9. CÍLE PRÁCE .....	46
10. SOUBORY .....	48
11. METODY .....	51
11.1 KLINICKO-BIOCHEMICKÉ METODY .....	51
11.1.1 BIOCHEMICKÉ PARAMETRY .....	51
11.1.2 ORÁLNÍ GLUKÓZOVÝ TOLERANČNÍ TEST .....	54
11.1.3 INZULINOVÝ TOLERANČNÍ TEST .....	54
11.1.4 INDEXY .....	55
11.1.5 ANTROPOMETRICKÉ MĚŘENÍ .....	56
11.2 MOLEKULÁRNĚ-GENETICKÉ METODY .....	56
11.2.1 IZOLACE DNA.....	56
11.2.2 PCR AMPLIFIKACE .....	56
11.2.3 RFLP ANALÝZA .....	57
11.2.4 TGGE ANALÝZA .....	58
11.2.5 SSCP ANALÝZA .....	61
11.2.6 SEKVENAČNÍ ANALÝZA.....	61
11.2.7 SCREENING SEKVENČNÍCH VARIANT GCK GENU.....	62
11.2.8 DETEKCE POLYMORFISMU -30G>A V B-PROMOTORU GCK GENU .....	68

---

---

11.2.9 DETEKCE POLYMORFISMU A98V (292C>T) V <i>HNF-1<math>\alpha</math></i> GENU ..	70
11.3 STATISTICKÉ METODY .....	71
11.3.1 CHARAKTERIZACE SOUBORŮ.....	71
11.3.2 FREKVENČNÍ ANALÝZA.....	71
11.3.3 HODNOCENÍ VLIVU POLYMORFISMU .....	72
12. VÝSLEDKY .....	73
12.1 CHARAKTERIZACE SOUBORŮ.....	73
12.2 SCREENING SEKVENČNÍCH VARIANT V GENU PRO <i>GCK</i> .....	77
12.2.1 ZAVEDENÍ METODY TGGE .....	77
12.2.2 ZAVEDENÍ METODY SSCP .....	79
12.2.3 POROVNÁNÍ OBOU SCREENINGOVÝCH METOD .....	80
12.2.4 SEKVENACE <i>GCK</i> GENU .....	80
12.2.5 ZASTOUPENÍ MODY2 U MODY RODIN .....	87
12.3 POLYMORFISMUS -30G>A V B-PROMOTORU <i>GCK</i> GENU.....	88
12.4 POLYMORFISMUS A98V (292C>T) V GENU PRO <i>HNF-1<math>\alpha</math></i> .....	92
13. DISKUZE .....	95
13.1 SCREENINGOVÉ METODY TGGE A SSCP.....	96
13.2 SEKVENČNÍ VARIANTY <i>GCK</i> GENU .....	97
13.3 POLYMORFISMUS -30G>A V B-PROMOTORU <i>GCK</i> GENU.....	100
13.4 POLYMORFISMUS A98V (292C>T) V GENU PRO <i>HNF-1<math>\alpha</math></i> .....	102
14. SOUHRN A ZÁVĚR .....	103
15. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	106
16. LITERATURA .....	109
17. PŘÍLOHY .....	127
17.1 ÚČAST NA GRANTOVÝCH PROJEKTECH .....	127
17.2 PUBLIKAČNÍ ČINNOST.....	128
17.3 PŘEDNÁŠKOVÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST – ÚČAST NA ZAHRANIČNÍCH SYMPOZIÍCH .....	129
17.4 PŘEDNÁŠKOVÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST – ÚČAST NA DOMÁCÍCH SYMPOZIÍCH .....	132

# 1. ÚVOD

## 1.1 HISTORICKÝ PŘEHLED

Diabetes mellitus neboli cukrovka je jednou z nejstarších nemocí, které lidstvo poznalo. První zmínka sahá až do roku 1552 př. n. l. Roku 1862 byly v Thébách v hrobce vznešeného Egyptana objeveny papyrusové svitky, ve kterých se píše o diabetu jako o vzácné nemoci, jež se projevuje velkou žízní a jejíž příčina je neznámá (Polychronakos 2004). Toto onemocnění postihuje obyvatele naší planety až do dnešní doby.

Roku 1928 se anglický lékař Cammidge na základě pozorování glykosurie u pacientů a jejich rodinných příslušníků (Cammidge 1928) poprvé zmínil o možnosti existence zvláštní, mírné formy diabetu s vysokým familiárním výskytem, která se pravděpodobně dědí autozomálně dominantně.

Teprve o více než 30 let později, roku 1960, americká skupina vědců pod vedením prof. Fajanse zveřejnila studii, která popisuje rozvoj mírné formy diabetu u neobézních dětí, dospívajících či mladých dospělých jedinců – přímých potomků pacientů s diabetem 2. typu (DM2) (Fajans and Conn 1960). Roku 1965 poprvé použili termín „maturity-onset type diabetes of childhood or of young people“ a zdůraznili výraznou rodinnou asociaci diabetu (Fajans and Conn 1965).

O devět let později, roku 1974, prof. Tattersall z londýnské King's College Hospital popsal tři rodiny s mírnou formou diabetu mellitu, u kterých prokázal autozomálně dominantní dědičnost onemocnění (Tattersall 1974). Roku 1975 Fajans a Tattersall popsali rozdíly v dědičnosti mezi klasickým juvenilním diabetem 1. typu (DM1) a „maturity-onset diabetes of the young“ a poprvé použili zkratku MODY, která se používá dodnes (Tattersall and Fajans 1975).

Téměř o 20 let později se díky molekulárně genetickým metodám ukázalo, že MODY je heterogenní skupinou monogenních onemocnění.

Na počátku 90. let, v roce 1991, byl vymezen první chromozomový lokus na dlouhém raménku 20. chromozomu, který vykazoval asociaci s MODY (Bell et al. 1991). Trvalo však dalších pět let, než byl ve vymezeném lokusu určen gen pro hepatocytární transkripční faktor  $4\alpha$  (*HNF-4 $\alpha$* ) a nalezeny jeho mutace u rodiny s MODY. Tento podtyp byl označen jako MODY1 (Yamagata <sup>b)</sup> et al. 1996).

V roce 1993 byl identifikován gen pro glukokinázu (*GCK*), jehož mutace jsou příčinou podtypu MODY2 (Froguel et al. 1992; Froguel et al. 1993; Gidh-Jain et al. 1993).

Roku 1996 objeven genový lokus pro hepatocytární transkripční faktor  $1\alpha$  (*HNF-1 $\alpha$* ) (Yamagata <sup>a)</sup> et al. 1996), který je zodpovědný za podtyp MODY3, a bezprostředně následovalo určení jeho transkripčního aktivátoru *HNF-4 $\alpha$* , jehož mutace způsobují podtyp MODY1 (Yamagata <sup>b)</sup> et al. 1996).

O rok později byla v multigenerační rodině s výskytem diabetu v obou rodičovských liniích objevena homozygotní mutace v genu pro inzulinový promotorový faktor 1 (*IPF-1*), která způsobila posun čtecího rámce. Tím byl nalezen další genový lokus zodpovědný za 4. podtyp MODY (Stoffers <sup>a) b)</sup> et al. 1997).

Hepatocytární transkripční faktor  $1\beta$  (*HNF-1 $\beta$* ) účinkuje jako homodimer, ale též jako heterodimer s *HNF-1 $\alpha$* , proto byl jasným kandidátním genem pro MODY. V roce 1997 byla v Japonsku popsána rodina s mutací v tomto genu, podtyp byl označen jako MODY5 (Horikawa et al. 1997).

Posledním jasně prokázaným MODY genem je gen pro neurogení diferenciační protein (*NeuroD1*), jehož mutace popsané v roce 1999 (Malecki <sup>a)</sup> et al. 1999) jsou zodpovědné za rozvoj MODY6.

V roce 2000 byla u jedné japonské rodiny s vysokým rodinným výskytem DM2 popsána nonsense mutace (způsobující záměnu aminokyseliny za stop kodón a vznik zkráceného proteinového řetězce) v genu pro transkripční faktor islet-1 (*Isl-1*) (Shimomura et al. 2000), nicméně tento gen zatím není běžně přijímán jako genový lokus pro MODY7. Pro vyloučení jiného typu



diabetu je potřeba provést další genetické a klinické studie (Fajans et al. 2001).

U 15–20 % ze všech diagnostikovaných MODY pacientů nebyla nalezena asociace s žádným ze zmíněných lokusů – MODYx, proto lze předpokládat, že v budoucnu budou identifikovány další, dosud nepopsané geny podmiňující vznik tohoto onemocnění (Chévre et al. 1998).

## **1.2 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY MODY**

MODY bylo nejdříve definováno jako specifická podtřída diabetu mellitu 2. typu. Na základě poslední přijaté verze klasifikace diabetu mellitu vydané Americkou diabetologickou asociací (ADA) je od roku 1998 MODY řazeno do samostatné skupiny „Jiné specifické formy diabetu mellitu – geneticky podmíněné defekty funkce  $\beta$ -buněk“ (The Expert Committee 1999).

MODY představuje přibližně 5 % všech případů DM. Předpokládá se, že v Evropě přibližně 2 % pacientů s DM2 (Ledermann 1995) a až 10 % pacientů s DM1 (Moller et al. 1998) ve skutečnosti trpí MODY. U 5–6 % gestačních diabetiček byla prokázána mutace v genu pro glukokinázu, tudíž se jedná o MODY2 (Ellard et al. 2000).

### **Definice MODY:**

- **časný počátek onemocnění**
- **autozomálně dominantní dědičnost**
- **primární defekt glukózou stimulované inzulínové sekrece**

MODY je vymezeno časným počátkem onemocnění, za což je považována manifestace diabetu do 25. roku života minimálně u jednoho člena rodiny. V důsledku pozdní diagnostiky může dojít u některých členů postižené rodiny k určení metabolické poruchy o něco později, zpravidla však do 40. roku života (Tattersall 1998).

Další charakteristikou MODY je autozomálně dominantní typ dědičnosti (AD), kdy podobná metabolická porucha bývá nalezena alespoň ve dvou, lépe ve třech generacích pacientovy rodiny.

MODY vzniká v důsledku geneticky podmíněného snížení funkce  $\beta$ -buněk pankreatu. Klinické studie prokázaly, že prediabetičtí MODY pacienti mají normální inzulínovou senzitivitu, ale mají sníženou glukózou stimulovanou sekreci inzulínu (GSIR = glucose stimulated insulin release). To dokazuje, že primární příčinou MODY není inzulínová rezistence, ale dysfunkce

pankreatických  $\beta$ -buněk. Toto selhání schopnosti udržet normální sekreci inzulínu pak vede ke vzniku hyperglykemie (Fajans 1990).

Nebyla prokázána asociace se specifickými HLA antigeny (Fajans 1990).

Původně bylo MODY považováno za onemocnění s polygenním typem dědičnosti jako DM2, ale ukázalo se, že se jedná o monogenní, i když geneticky heterogenní chorobu (Froguel and Velho 1999). Typická je variabilní expresivita a vysoká penetrance klinických projevů (Tattersall 1998, Průhová and Lebl 1999).

Dodnes je známo šest různých podtypů MODY, za každý podtyp je zodpovědný jiný genový lokus: MODY 1 = *HNF-4 $\alpha$* , MODY 2 = *GCK*, MODY 3 = *HNF-1 $\alpha$* , MODY 4 = *IPF-1*, MODY 5 = *HNF-1 $\beta$*  a MODY 6 = *NeuroD1* (Shih and Stoffel 2002). Jednotlivé podtypy MODY mají číselné označení podle pořadí postupně nalézáných genových kandidátů, proto toto rozdělení neodpovídá četnosti ani významnosti jednotlivých metabolických poruch. Podtypy se liší svými patofyziologickými i klinickými znaky a mají též rozdílnou progresi onemocnění (tab. 1).

Mutace způsobující MODY jsou kromě jediného případu (viz kap. 5.1) vždy heterozygotní, homozygotní mutace byly popsány pouze u genů pro *GCK* (v souvislosti s PNDM, viz kap. 3.3.3) a *IPF-1* (viz kap. 5.1). Homozygotní mutace mají velmi těžký fenotypový dopad a předpokládá se, že v ostatních genech zapříčiňujících MODY by nebyly slučitelné se životem.

Tab. 1: Přehled a základní charakteristiky podtypů MODY

	<b>MODY 1</b> <b>HNF-4<math>\alpha</math></b>	<b>MODY 2</b> <b>GCK</b>	<b>MODY 3</b> <b>HNF-1<math>\alpha</math></b>	<b>MODY 4</b> <b>IPF-1</b>	<b>MODY 5</b> <b>HNF-1<math>\beta</math></b>	<b>MODY 6</b> <b>NeuroD1</b>
Chromozómový lokus	20q12-q13.1	7p15-13	12q24.1	13q12.1	17cen-q21.3	2q32
Frekvence	nízká (< 5 %)	vysoká (15 – 60 %)	vysoká (30 – 75 %)	velmi nízká (< 4 %)	velmi nízká (< 1 %)	velmi nízká
Počátek choroby	adolescence, časná dospělost (< 30 let)	dětsví (od narození)	adolescence (< 25 let)	časná dospělost (< 35 let)	adolescence (< 25 let)	dospělost (< 40 let)
Primární defekt	pankreas/ játra/ ledviny	pankreas/ játra/ střeva/ mozek	pankreas/ játra/ ledviny	pankreas/ jiné?	pankreas/ ledviny/ jiné?	pankreas/ střeva/ mozek
Funkce gen. produktu	transkripční faktor	enzym	transkripční faktor	transkripční faktor	transkripční faktor	transkripční faktor
Působení na inzulinový gen	přímé; nepřímé (přes HNF-1 $\alpha$ )	–	přímé	přímé	přímé	přímé
Mutace	bodové, delece	bodové, delece, rozsáhlé delece	bodové, delece, inverze	bodové, delece	bodová, delece	bodová, inverze
Stupeň postižení	závažné, velká progresse	mírné, neprogreduje	závažné, velká progresse	střední	těžší	střední/ těžší
Komplikace diabetu	časté	zřídka	časté	zřídka ?	diabetická nefropatie	zřídka ?
Jiné komplikace	snížená porodní váha	snížená porodní váha	nízký renální práh, acidourie	homozygota = ageneze pankreatu	renální cysty, proteiurie, renální selhání	
Léčba	PAD, inzulin	dieta, PAD	PAD, inzulin	PAD, inzulin	inzulin	PAD, inzulin

### 1.3 INZULINOVÁ SEKRECE

Postprandiálně mnoho nutričních a hormonálních činitelů stimuluje sekreci inzulínu z  $\beta$ -buněk pankreatických ostrůvků. Primární roli hraje glukóza, nicméně při její nízké koncentraci široká škála látek (např. mastné kyseliny či některé aminokyseliny) přebírá její stimulační efekt.

Klíčovou roli v sekreci inzulínu  $\beta$ -buňkami pankreatických ostrůvků hraje ATP-dependentní draselný kanál, což je oktamerický komplex tvořený regulační částí a vlastním pórem kanálu. ATP-dependentní draselné kanály jsou přítomné v membránách mnoha typů buněk různých tkání (např. v buňkách kosterního a srdečního svalu, v hladkých svalech cév, neuronech), v  $\beta$ -buňkách pankreatu je jejich počet odhadován na 600–1200 na buňku (Ohno-Shosaku et al. 1987; Schmidt-Antomarchi et al. 1987). Uzavření kanálu spouští inzulínovou sekreci, zatímco jeho otevření vede k inhibici sekrece tohoto hormonu (Gribble and Reimann 2003).

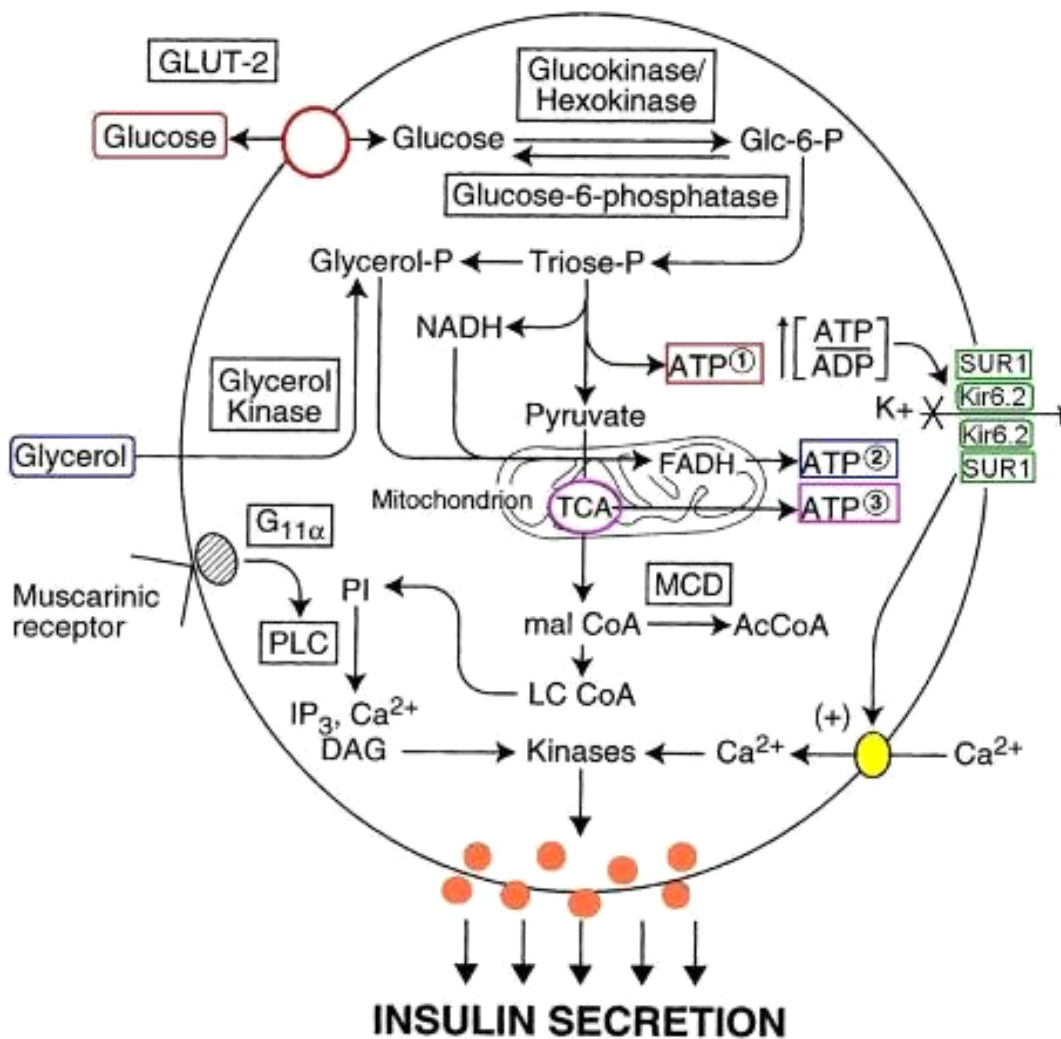
Regulační část se skládá z tetrameru sulfonylureových receptorů typu 1 (SUR1), pór kanálu je také tetramer, který sestává z podjednotek nazývaných Kir6.2 (potassium inward rectifier) (gen *KCNJ11*) (Clement et al. 1997). Pro metabolickou regulaci funkce kanálu je stěžejní koncentrace ATP uvnitř buňky, respektive poměr ATP/ADP. Při nízkých koncentracích ATP jsou draselné kanály otevřené, umožňují tok draslíku po směru elektrochemického gradientu ven z buňky, membránový potenciál je udržován v hyperpolarizovaném stavu. Příjem glukózy a následný vzestup intracelulárního ATP vede k uzavření kanálu vazbou ATP na Kir6.2 podjednotky, což spouští kaskádu reakcí vedoucích k zahájení inzulínové sekrece. Dochází k depolarizaci membrány a k otevření vápníkových kanálů. Po vzestupu intracelulární koncentrace vápníku následuje exocytóza inzulínových granulí z  $\beta$ -buněk pankreatu (obr. 1).

Vliv na regulaci inzulínové sekrece má též fosfoinozitolový (PI) metabolismus, exprese glukokinázy, glukózo-6-fosfatázy a inzulínu či aktivace membránové fosfolipázy (PLC).

### Obr. 1: Biochemický mechanismus inzulínové sekrece

Poměr ATP/ADP nezbytný pro regulaci aktivity ATP-dependentních draselných kanálů je ovlivňován různými metabolickými pochody:

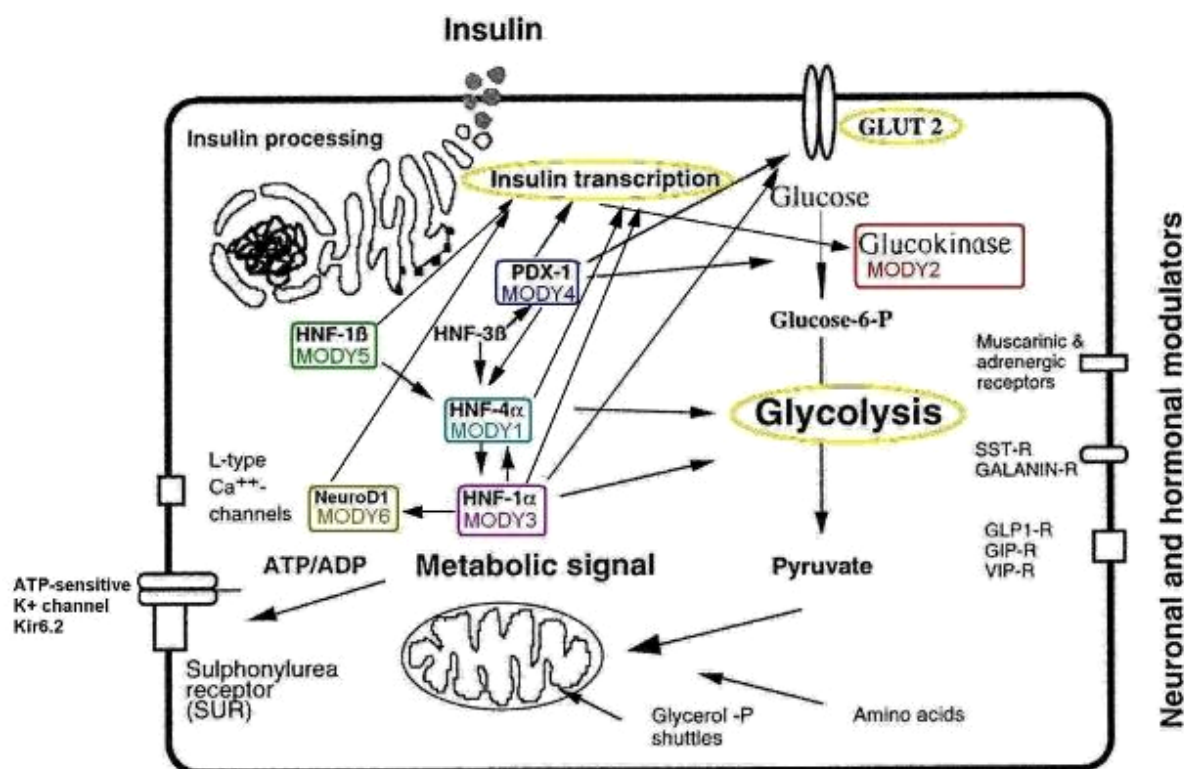
- 1) přenos glukózy do buňky a následná glykolýza
- 2) štěpení glycerolfosfátu
- 3) oxidativní procesy během Krebsova cyklu (TCA = tricarboxylic acid cycle)



GLUT-2 = glukózový transportér 2; Glc-6-P = glukózo-6-fosfát; TCA = Krebsův cyklus; MCD = malonyl CoA dekarboxyláza; mal CoA = malonyl koenzym A; AcCoA = acetyl koenzym A; LC Co A = dlouhý řetězec (long-chain) koenzymu A;  $G_{11\alpha}$  =  $\alpha$ -podjednotka G-proteinu; PI = fosfoinositid; PLC = fosfolipáza C;  $IP_3$  = inositol trifosfát; DAG = diacylglycerol  
(Berman et al. 2000; upraveno)

Jak již bylo uvedeno, hlavní roli pro zahájení sekrece inzulínu má vstup glukózy do  $\beta$ -buňky, který je zprostředkován glukózovým transportérem GLUT2, a následné metabolické štěpení glukózy (obr. 1, 2). Expresi enzymů účastnících se glykolýzy stejně jako expresi GLUT2 a inzulínu ovlivňují různé transkripční faktory (Shih et al. 2001), které jsou součástí rozsáhlé tzv. regulační sítě (obr. 2). Inzulín stimuluje syntézu GCK, která zahajuje glykolýzu. Je tedy zřejmé, že všechny MODY geny mají přímý vliv na inzulínovou sekreci.

Obr. 2: Vliv transkripční regulační sítě na inzulínovou sekreci



GLUT2 = glukózový transportér 2; PDX-1 = pankreatický duodenální homeobox = IPF-1 = inzulínový promotorový faktor 1; HNF (-1 $\beta$ ; -1 $\alpha$ ; -3 $\beta$ ; -4 $\alpha$ ; -6) = hepatocytární nukleární faktory; NeuroD1 = neurogení diferenciální protein 1; SST-R = receptor pro somatostatin; GLP1-R = receptor pro glukagon-like peptid; GIP-R = receptor pro gastrický inhibiční protein; VIP-R = receptor pro vasoaktivační inhibiční peptid (Stoffel 2000; upraveno)

## 2. HEPATOCYTÁRNÍ NUKLEÁRNÍ FAKTOR-4 $\alpha$ (MODY1)

### 2.1 HISTORIE

Jako první byl v roce 1991 popsán v souvislosti s MODY1 chromozomový lokus nacházející se na dlouhém raménku 20. chromozomu (Bell et al. 1991). Frekvence MODY1 je nízká (<1:10.000 případů diabetu), proto veškeré mapování bylo založeno na jediném rodokmenu – tzv. R-W rodokmen. Tento sedmigenerační rodokmen je odvozen od manželského páru, který roku 1861 emigroval z východního Pruska do Detroitu, a do současnosti zahrnuje 445 jedinců, z toho 75 jedinců s diabetem. Genetickým mapováním byla vymezena poměrně rozsáhlá oblast (do 13 cM) v oblasti chromozomu 20q12–q13, která však zahrnovala příliš velké množství genů. K identifikaci kandidátního genu došlo až o pět let později, po nalezení genu *HNF-1 $\alpha$*  zodpovědného za MODY3 (Yamagata <sup>a)</sup> et al. 1996), jehož transkripční aktivátor HNF-4 $\alpha$  mapuje do vymezené chromozomové oblasti. Záhy došlo k určení nonsense mutace Q268X v genu *HNF-4 $\alpha$*  vedoucí k syntéze zkráceného proteinu a kosegregující s onemocněním v R-W rodokmenu (Yamagata <sup>b)</sup> et al. 1996). Celosvětově bylo dosud popsáno jen velmi málo dalších rodokmenů s MODY1.

### 2.2 BIOCHEMICKÝ MECHANISMUS

HNF-4 $\alpha$  je transkripční faktor, který patří do rodiny steroido/tyreoidálních hormonálních jaderných receptorů (Sladek et al. 1990). HNF-4 $\alpha$  se skládá z transaktivační domény AF1 na –NH<sub>2</sub> konci ve formě  $\alpha$ -helixu (24 AK), z DNA-vazebné domény, kterou tvoří dva motivy zinkových prstů, a z transaktivační domény AF2, která v sobě zahrnuje dimerizační a ligand vázající doménu (128-366 AK).



HNF-4 $\alpha$  se váže jako homodimer na DNA sekvence promotorů a enhancerů cílových genů, které kódují sérové proteiny, enzymy účastníci se lipidového, aminokyselinového i glukózového metabolismu, ale i tkáňově specifický transkripční faktor HNF-1 $\alpha$ . Expresi genu pro inzulin aktivuje nepřímo přes HNF-1 $\alpha$ , nebo přímo vazbou na promotor inzulinového genu (Bartoov-Shifman et al. 2002). Hraje významnou roli v embryogenezi, ve vývoji a buněčné diferenciaci, v metabolických procesech, zajišťuje normální aktivitu viscerálního endodermu jater, střev, ledvin a  $\beta$ -buněk pankreatu (Stoffel and Duncan 1997, Lausen et al. 2000).

Existuje devět různých izoform HNF-4 $\alpha$ , které vznikají dvěma možnými mechanismy: alternativním sestřihem a/nebo zahájením transkripce z alternativního promotoru P1 nebo P2 (obr. 3) (Nakhei et al. 1998; Eeckhoute et al. 2003). Promotor P1 iniciuje transkripci HNF-4 $\alpha$  v játrech a ledvinách (Nakhei et al. 1998). Promotor P2 byl považován za specifický pro pankreatické  $\beta$ -buňky, ale ukázalo se, že  $\beta$ -buňky obsahují oba transkripty. Dokonce izoformy, které mají počátek transkripce v P1, obsahují AF-1 transaktivační doménu a díky tomu vykazují vyšší transkripční aktivitu a vyšší efektivity ve vazbě koaktivátorů než izoformy pocházející z P2 promotoru (Eeckhoute et al. 2003).

### 2.3 GENETIKA

Gen pro HNF-4 $\alpha$  je tvořen deseti exony a má dva alternativní promotory P1 a P2, který leží ~ 46 kb od 5' konce P1. P2 promotor obsahuje vazebné domény pro transkripční faktory HNF-1 $\alpha$ , HNF-1 $\beta$ , IPF-1 (MODY geny) a pro HNF-3 $\beta$ , HNF-6, GATA 6 a Pax4.

V souvislosti s MODY byly nalezeny mutace postihující vazebné místo pro HNF-1 $\alpha$  v P2 promotoru, DNA-vazebnou doménu a transaktivační doménu AF2, kde byly nalezeny bodové mutace v dimerizační i ligand-vázající doméně (obr. 3) (Furuta et al. 1997, Malecki et al. 1999<sup>b</sup>), Moller et al.

1999, Lausen et al. 2000; Thomas et al. 2001; Hansen et al. 2002; Raeder et al. 2006).

Delece v DNA-vazebné doméně vedou k posunu čtecího rámce. Spolu s mutacemi vedoucími ke vzniku stop kodónu (nonsense mutace) v AF2 jsou příčinou vzniku zkráceného proteinu s defektem transkripční transaktivační aktivity, proto takový mutantní protein nemůže plnit svou transkripční funkci. Mutace, které zapříčiňují zařazení jiné aminokyseliny do proteinového řetězce (missense mutace) a které postihují oblast AF2, snižují v různé míře transaktivační schopnost faktoru. Jejich biologický efekt je však menší než u delecí a nonsense mutací (Stoffel and Duncan 1997, Furuta et al. 1997, Navas et al. 1999, Lausen et al. 2000; Gragnoli et al. 2004; Raeder et al. 2006).

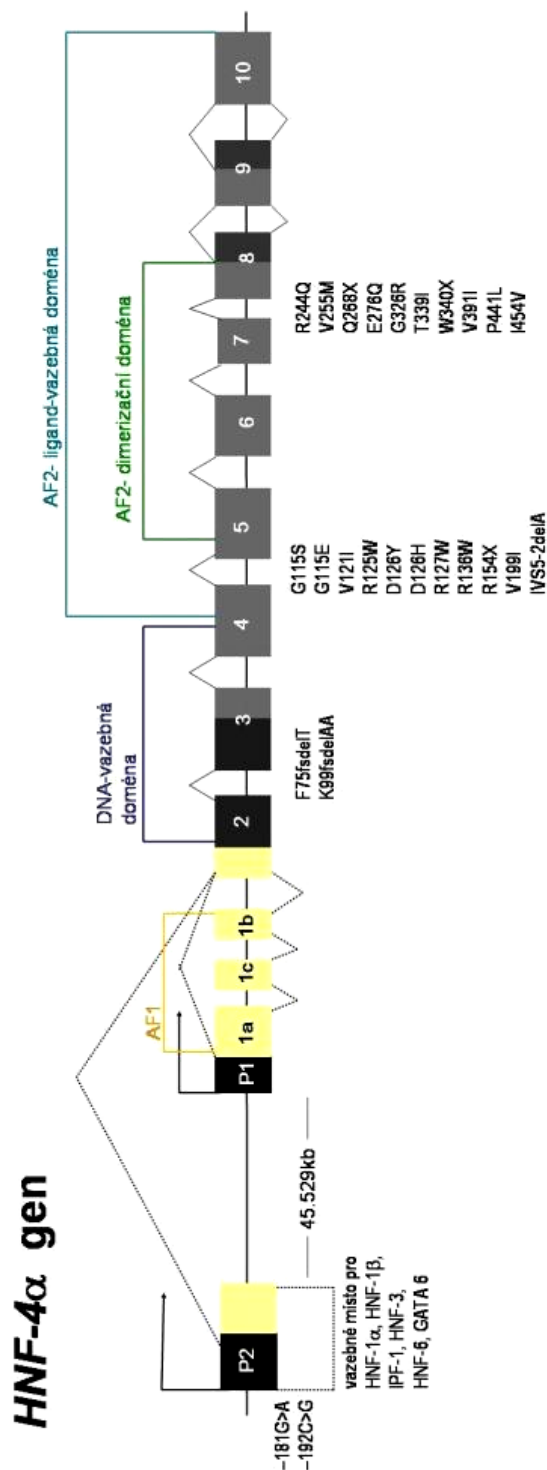
### **2.3.1 POLYMORFISMY ASOCIOVANÉ S DM2**

Pomocí vazebných studií byly nalezeny jednonukleotidové polymorfismy (SNPs – single nucleotide polymorphisms), a to zejména poblíž oblasti promotoru P2, které asociovaly s DM2. Mezi nejběžnější patří: rs2144908 (G>A) a rs4810424 (C>G). Nejsilnější asociaci s DM2 vykazuje rs2144908 u populace Židů Ashkenazi (Love-Gregory et al. 2004), u finské (Silander et al. 2004) a britské populace (Weedon et al. 2004). Oproti tomu v polské populaci se frekvence minoritních alel polymorfismů rs2144908 a rs4810424 u diabetiků 2. typu a kontrolních jedinců nelišily (Wanic et al. 2006), u francouzské populace dokonce vyšla minoritní alela A polymorfismu rs2144908 jako protektivní vzhledem k patogenezi DM2 (Vaxillaire et al. 2005).

Polymorfismus v kódující oblasti T130I (záměna threoninu za izoleucin) postihuje DNA-vazebnou doménu. Byl popsán u DM2 v japonské populaci (Zhu et al. 2003) a v dánské populaci (Ek et al. 2005), kde byl zkoumán i polymorfismus V255M (záměna valinu za methionin). Oba polymorfismy vykazovaly snížení transkripční aktivity HNF-1 $\alpha$ , ale u V255M nebyla zjištěna

vyšší frekvence minoritní alely u DM2 oproti kontrolám, nicméně nositelé této alely měli sníženou sérovou hladinu lačného C-peptidu (Ek et al. 2005).

Obr. 3: HNF-4 $\alpha$  gen a MODY1 mutace



(Furuta et al. 1997; upraveno)

## 2.4 FENOTYP A LÉČBA

MODY1 je charakterizován hyperglykemií, která bývá diagnostikována v období puberty, někdy až v rané dospělosti, přestože progresse onemocnění začíná už během dětství. Hyperglykemie je často provázena inzulinopénií už v počátku manifestace. Pacienti vykazují normální inzulinovou senzitivitu po intravenózním podání inzulínu, příčinou hyperglykemie tudíž není inzulinová rezistence (Herman et al. 1994), ale nedostatečná inzulinová sekrece.

Pacienti bývají léčeni inzulínem, u lehčích forem mohou být dostatečně dobře kompenzováni perorálními antidiabetiky (PAD). Nebyla zjištěna ketoacidóza. Riziko vzniku mikro- i makrovaskulárních diabetických komplikací je vysoké (Hattersley 1998).

### 3. GLUKOKINÁZA

#### 3.1 HISTORIE

Glukokináza (GCK) je klíčovým enzymem v regulaci glukózového metabolismu, proto byla pro MODY jasným kandidátním genem. Roku 1992 byl u postižených rodin vymezen její genový lokus na krátkém raménku 7. chromozomu (7p13) (Froguel et al. 1992) a roku 1993 byly popsány první mutace v genu pro GCK zodpovědné za vznik MODY 2 (Froguel et al. 1993; Gidh-Jain et al. 1993). Tento podtyp tvoří 15 % (Velká Británie) až 60 % (Francie) všech případů MODY (Velho et al. 1997).

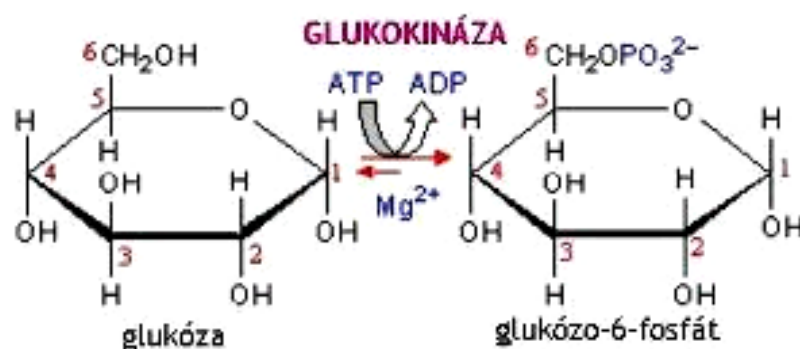
#### 3.2 BIOCHEMICKÝ MECHANISMUS

Glukokináza patří do rodiny hexokináz.

GCK katalyzuje první krok glykolýzy – ATP-dependentní fosforylaci glukózy na glukózo-6-fosfát (G-6-P) (obr. 4) (Matschinsky et al. 1993; Matschinsky 1996) a hraje klíčovou roli v regulaci glukózového metabolismu (obr. 5).

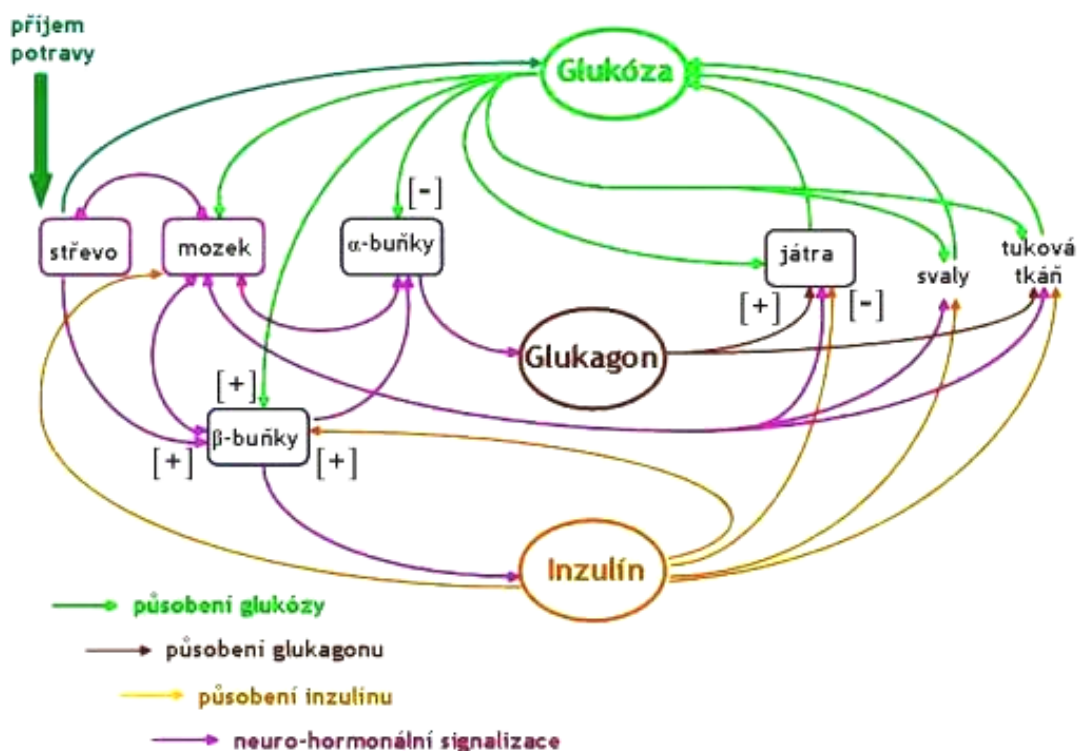
GCK působí jako monomer, obsahuje vazebná místa pro glukózu a ATP a místo pro nasedání alosterického glukokinázového aktivátoru GKA (Matschinsky et al. 2006).

**Obr. 4: Katalytické působení glukokinázy**



GCK je exprimovaná nejen v pankreatických  $\beta$ -buňkách a hepatocytech, ale i v řadě neuronálních, neuroendokrinních a enteroendokrinních buněk (obr. 5), jako jsou např. pankreatické  $\alpha$ -buňky, střevní L- a K-enterocyty, nebo některé neurony centrálního nervového systému (CNS), zejména v hypothalamu a hypofýze (Schuit et al. 2001).

**Obr. 5: Metabolismus glukózy: glukózová homeostáza je udržována zpětnovazebným působením GCK senzitivních buněk**



(Matschinsky et al. 2006; upraveno)

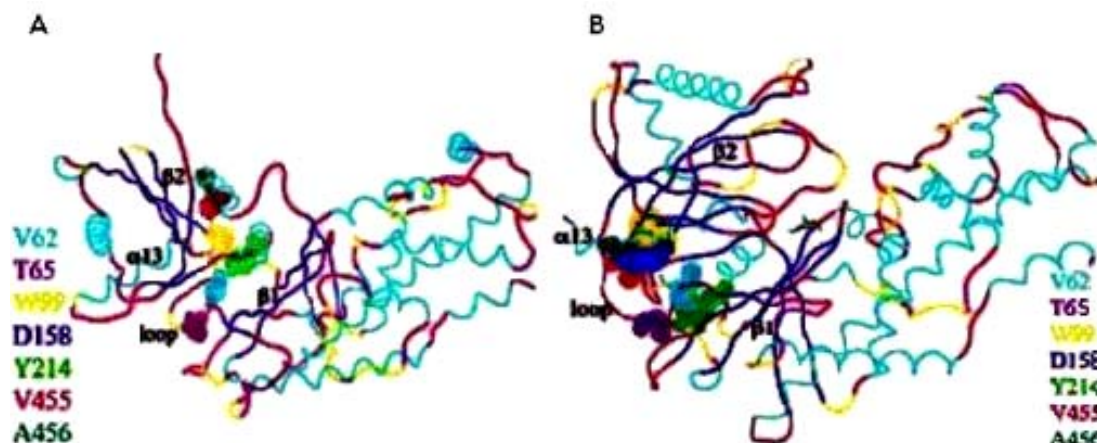
Glukokináza plní funkci senzoru pro glukózu. To je umožněno některými jedinečnými vlastnostmi GCK (Matschinsky et al. 2006):

1) GCK vykazuje nižší afinitu k substrátu – glukóze – než ostatní hexokinázy. Mění svou konformaci a/nebo funkci souběžně se stoupající koncentrací glukózy ve fyziologickém rozmezí 4–10 mmol/l. Hladinu poloviční saturace glukózou  $S_{0.5}$  (koncentrace, při které je enzym saturován

substrátem a aktivní z 50 %) dosahuje GCK při koncentraci glukózy  $\sim 8$  mmol/l. Inflexního bodu, kdy je aktivita GCK necitlivější k výkyvům v glukózové koncentraci, dosahuje při koncentraci glukózy  $\sim 3,5\text{--}4$  mmol/l.

2) GCK má pouze jedno vazebné místo pro glukózu, přesto jako jediný monomerní enzym vykazuje kinetickou kooperativitu. Principem její substrátové kooperativity je přechod z otevřené formy bez přítomnosti ligandu do uzavřené, vázané formy, která má zúžené vazebné místo pro substrát a otevřenější místo pro nasednutí glukokinázového aktivátoru GKA. GKA zvyšuje afinitu ke glukóze, snižuje  $S_{0,5}$  a zvyšuje  $K_{cat}$ , maximální specifickou aktivitu enzymu. Přechod z uzavřené do otevřené formy je doprovázen značnými konformačními změnami enzymu (obr. 6).

**Obr. 6: Otevřená (A) uzavřená (B) forma GCK**



Struktury GCK jsou vyznačeny následovně:  $\alpha$ -šroubovice světle modře,  $\beta$ -struktury tmavě modře a vazebné místo pro GKA černě; NH<sub>2</sub>-koncová část červeně a COOH-koncová část žlutě. Uzavření vazebného místa pro substrát je doprovázeno značným posunem malého levého laloku, zatímco velký pravý lalok svou pozici příliš nemění. Na obrázku jsou uvedeny aminokyseliny, které vytváří místo pro nasedání alosterického aktivátoru GKA.

(Matschinsky et al. 2006; upraveno)

3) Vazba GCK s druhým substrátem – MgATP<sup>2-</sup> – vykazuje klasickou kinetickou křivku,  $K_M \sim 0,3\text{--}0,4$  mmol/l (konstanta Michaelis–Mentenové; koncentrace substrátu, při které rychlost reakce dosahuje 50 % svého maxima). Obvyklá intracelulární koncentrace ATP je několikanásobně vyšší

(~ 2,5 mmol/l), a tudíž nebude mít téměř žádný vliv na regulaci GCK aktivity.

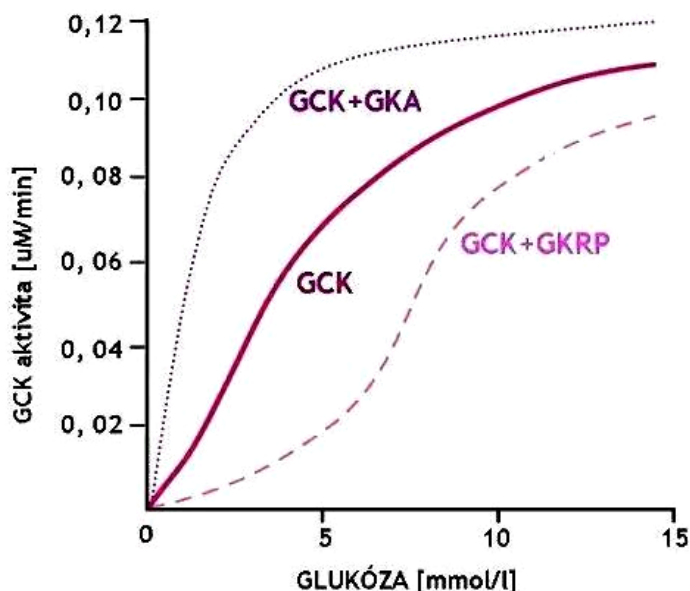
4) Na rozdíl od jiných hexokináz není GCK zpětnovazebně inhibována G-6-P. Její aktivita je tedy řízena dostupností glukózy, nikoliv akumulací konečných metabolických produktů.

V hepatocytech je enzymatická aktivita GCK ovlivňována dvěma různými mechanismy (obr. 7):

1) Vazba GKA zvyšuje její aktivitu (viz výše) a také podněcuje její disociaci od regulačního proteinu GKRP (glukokinázový regulační protein) a translokaci z jádra do cytoplazmy.

2) Naopak GKRP snižuje afinitu GCK ke glukóze a ovlivňuje vnitrobuněčnou lokalizaci enzymu. GKRP se nachází v buněčném jádře hepatocytů, kde zadržuje navázanou GCK, a tím znemožňuje její rychlé přemístění do cytoplazmy (Brocklehurst et al. 2004).

**Obr.7: Vliv GKA a GKRP na aktivitu glukokinázy**



(Matschinsky et al. 2006; upraveno)



Heterozygotní inaktivační mutace v genu pro GCK jsou příčinou MODY2, vedou ke vzniku enzymu se sníženou enzymovou aktivitou a/nebo s nižší afinitou k substrátu – ke glukóze. GCK podléhá fenoménu haploinsuficience, což je stav, kdy exprese pouze jedné plně funkční kopie genu nestačí zajistit dostatečnou funkci proteinu. Zhoršení enzymové aktivity mutantní GCK má za následek snížení glykolytických pochodů v  $\beta$ -buňkách pankreatu. Tento defekt (tzv. defekt citlivosti  $\beta$ -buněk ke glukóze) vede ke zvýšení prahu krevní glukózy, který funguje jako spouštěcí mechanismus sekrece inzulínu. Dochází tedy ke zvýšení koncentrace glukózy, jež je potřebné k vyvolání inzulínové sekrece (obr. 1, 2). U pacientů s MODY2 byl pozorován pokles inzulínové sekrece v průměru o 60 % (Byrne et al. 1994).

Postprandiálně bylo pozorováno, že mutantní GCK v hepatocytech způsobuje snížení akumulace jaterního glykogenu o 30–60 % a zvýšení jaterní glukoneogeneze. Tyto popsané charakteristiky mutantního enzymu jsou příčinou chronické hyperglykemie (Tappy et al. 1997, Miller et al. 1999).

Zhoršení enzymatické aktivity mutantní GCK má většinou menší fenotypový dopad, než by se dalo předpokládat. To vypovídá o existenci nějakého kompenzačního mechanismu, který zvyšuje inzulínovou sekreci. Na myších modelech byla pozorována glukózou stimulovaná zvýšená exprese wild-type (nemutantní) GCK alely (Sreenan et al. 1998). U pacientů s MODY2 také dochází ke snížení přímé (GCK-dependentní) glykogeneze a ke zvýšení nepřímé (glukoneogenní, GCK-independentní) syntézy glykogenu. Zvýšení postprandiální GCK-independentní glykogeneze je tedy zřejmě důležitým faktorem ke zmírnění hyperglykemie po požití jídla (Velho et al. 1996).

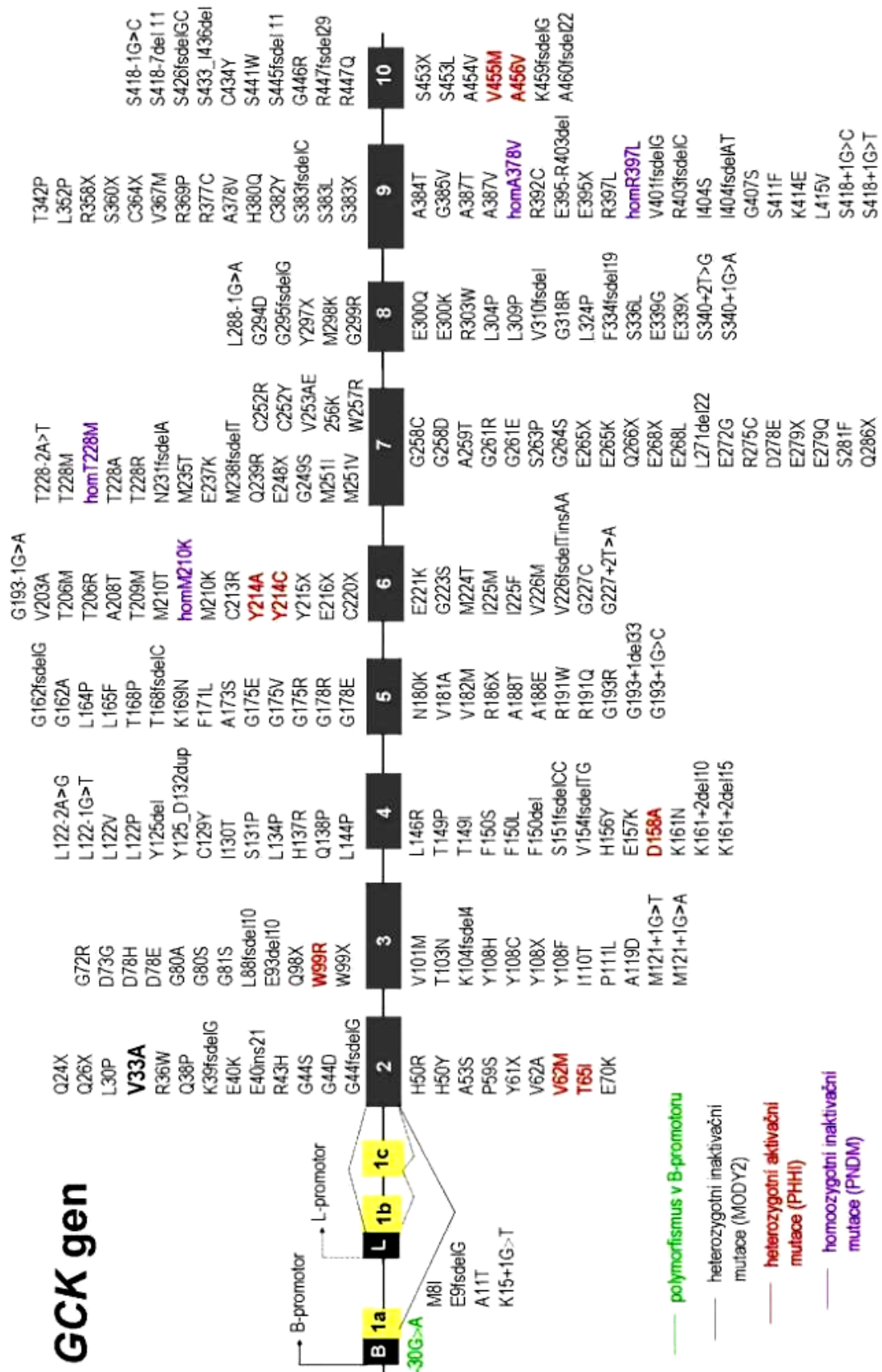
### 3.3 GENETIKA

Přestože GCK exprimovaná v pankreatu, v játrech i v mozku se vyznačuje stejnou kinetickou aktivitou a je kódována jediným genem lokalizovaným na krátkém raménku 7. chromozomu (7p15.3–p15.1), její primární struktura na NH<sub>2</sub>-konci se liší v důsledku alternativního sestřihu transkriptu mRNA. Enzym se skládá z 465 aminokyselin, jeho molekulová hmotnost je 50 kD.

Gen pro GCK je tvořen 10 exony. Exon 1a přilehlé promotorové oblasti se liší v různých tkáních. Tzv. „upstream“ promotor, ležící blíž 5' konci genu, ovlivňuje expresi GCK v  $\beta$ -buňkách pankreatu a v neurálních a neuroendokrinních buňkách, proto se nazývá neuroendokrinní, nebo též B-promotor. Tzv. „downstream“ promotor leží blíž 3' konci genu a je specifický pro hepatocyty. Je označován jako L-promotor (liver specific) (obr. 8).

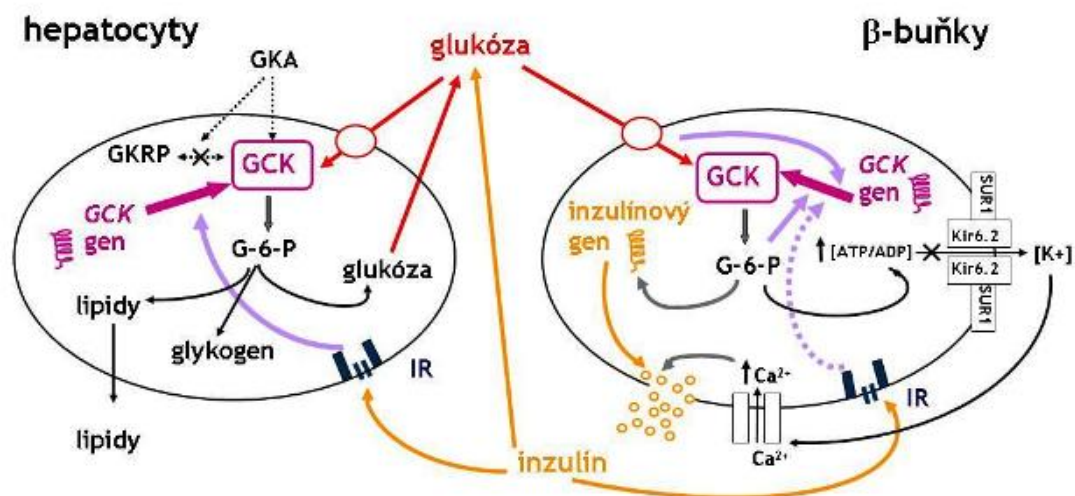
Existence alternativních promotorů umožňuje tkáňově specifickou regulaci genové exprese. V játrech je hlavním regulátorem exprese GCK inzulin, v ostatních buňkách je exprese GCK řízena především intracelulární koncentrací glukózy (obr. 9). Inzulin reguluje expresi GCK zejména na transkripční úrovni, glukózový metabolismus a/nebo glukóza na úrovni translační a/nebo posttranslační (Matschinsky 2002).

Obr. 8: GCK gen



(Velho et al. 1997; upraveno)

Obr. 9: Rozdílná regulace exprese GCK genu v pankreatických  $\beta$ -buňkách (počátek od B-promotoru) a v hepatocytech (počátek od L-promotoru)



IR = inzulinový receptor; GKA = glukokinázový aktivátor; GKR = glukokinázový regulační protein  
(Matschinsky 2002; upraveno)

S ohledem na rozhodující úlohu GSK v regulaci glukózou stimulované inzulinové sekrece je pochopitelné, že mutace v GSK mohou způsobit jak hyperglykémii, tak hypoglykémii. Genetické studie prokázaly, že GSK mutace vedou ke vzniku tří různých poruch v regulaci glukózové homeostáze.

### 3.3.1 MODY2

Nejčastější jsou heterozygotní inaktivační mutace. Většinou se jedná o bodové missense mutace, které vedou k záměně aminokyseliny. Do dnešní doby bylo v souvislosti s MODY2 popsáno přes 200 mutací GSK (obr. 8) (Matschinsky et al. 1998; Massa et al. 2001; Pruhova et al. 2003; Toaima et al. 2005; Johansen et al. 2005; Codner et al. 2006; Sagen et al. 2006).

Tyto mutace byly také nalezeny u 5–6 % žen diagnostikovaných jako gestační diabetičky. Těhotenství může být spouštěcím mechanismem pro výraznější penetranci dosud nediodagnostikované hyperglykémie (Ellard et al. 2000).

### 3.3.2 PHHI

Heterozygotní aktivační mutace *GCK* genu vedou naopak k hypoglykémii, nositelé těchto mutací trpí od narození persistentní hyperinzulinemickou hypoglykemií (PHHI = persistent hyperinsulinemic hypoglycaemia of infancy).

Změny v kinetických vlastnostech mutantního enzymu (viz výše) jsou u různých mutací velmi rozdílné, proto i míra zvýšení inzulínové sekrece v důsledku snížení mezní koncentrace glukózy potřebné ke spuštění sekrece a následná hladina hypoglykémie závisí na typu mutace. Nicméně, tyto mutace postihují vazebné místo pro *GCK* alosterický aktivátor (obr. 6). Dosud byly popsány tyto mutace: V62M, T65I, W99R, D158A, Y214A, Y214C, V455M a A456V (Glaser et al. 1998; Glaser et al. 2000; Christensen et al. 2002; Gloyn et al. 2003; Gloyn 2003; Cuesta-Munoz et al. 2004).

PHHI je heterogenní onemocnění, také mutace v dalších genech vedou ke vzniku této choroby. Nejčastější jsou inaktivační mutace sulfonylureového receptoru *SUR1*, méně časté inaktivační mutace v genu *Kir6.2 (KCNJ11)*, nebo aktivační mutace v genu pro mitochondriální enzym glutamát dehydrogenázu *GLUD1* (Darendeliler et al. 2002; Gloyn et al. 2003; Gloyn 2003).

### 3.3.3 PNDM

V důsledku homozygotní inaktivační mutace *GCK* vzniká nefunkční enzym. Takto postižení jedinci trpí už od narození permanentním neonatálním diabetem mellitem (PNDM) (Njølstad et al. 2001; Njølstad et al. 2003; Gloyn 2003). Mají narušenou regulaci funkce ATP-dependentního draselného kanálu a inzulínovou sekreci (viz kap. 1.3). Homozygotní absence *GCK* je spojena s výrazně nižší porodní váhou a vyšším rizikem intrauterinního nebo neonatálního úmrtí (Gloyn 2003).

Dosud identifikované mutace T228M, M210K, A378V a R397L postihují substrátové vazebné místo, nebo aktivní místo enzymu (Njølstad et al. 2003; Porter et al. 2005).

V souvislosti s PNDM byly také identifikovány aktivační mutace genu *Kir6.2* (Massa et al. 2005) či kompletní deficiencie transkripčního faktoru IPF-1 (Stoffers<sup>b)</sup> et al. 1997).

Fenotypově se PNMD projevuje těžkým postižením, byly pozorovány další přidružené projevy, jako např. opožděný vývoj, svalová nedostatečnost či epilepsie (Proks et al. 2004; Hattersley and Ashcroft 2005). Takto postižení jedinci musí být léčeni inzulínem od prvních měsíců života. Studie v posledních letech prokázaly, že někteří nositelé aktivační mutace genu *Kir6.2* dobře reagují na perorální sulfonylureovou léčbu (Sagen et al. 2004; Zung et al. 2004).

#### **3.3.4 POLYMORFISMUS -30G>A V B-PROMOTORU GCK GENU**

Polymorfismus -30G>A (záměna adeninu za guanin) v B-promotoru *GCK* genu (rs1799884) byl popsán nejen v evropské (Zaidi et al. 1997, Rissanen et al. 1998, März et al. 2004, Rose et al. 2005, Weedon<sup>a)</sup> et al. 2005, Shaat et al. 2006), ale i v asijské populaci (Chiu et al. 1994, Stone et al. 1996, Yamada et al. 1997).

Vyšší frekvence minoritní alely A byla pozorována u žen s gestačním diabetem ve francouzské (Zouali et al. 1993), skandinávské (Shaat et al. 2006) a britské (Zaidi et al. 1997) populaci, ale také u osob s metabolickým syndromem a u osob s porušenou glukózovou tolerancí (PGT) (Rose et al. 2005). Nositelé alely A měli zvýšenou hladinu lačné i postprandiální glykemie a sníženou glukózou stimulovanou inzulínovou sekreci. Tento polymorfismus je také spojován se zvýšeným rizikem postižení věnčitých tepen (coronary artery disease = CAD) a vyšší prevalencí diabetu 2. typu (März et al. 2004), nebo s vyšší porodní hmotností dětí, jejichž matky jsou nositelkami alely A (Weedon<sup>a)</sup> et al. 2005).

Ve většině případů byl pozorován efekt dávky, kdy nositelé genotypu AA vykazovali vyšší fenotypový dopad než heterozygoti GA a homozygoti GG (Zaidi et al. 1997, März et al. 2004).

### **3.4 FENOTYP A LÉČBA MODY2**

Osoby s MODY2 mají pravděpodobně zvýšenou glykemií už od narození. K diagnostice metabolické poruchy však dochází většinou náhodně, protože dosažené hodnoty hyperglykemie nebývají výrazné a pacienti jsou zpravidla asymptomatictí. Míra hyperglykemie se s věkem příliš nemění, progresse k diabetu je vzácná. Pacienti mají normální hladinu lipidů, nebývají obézní, nemívají zvýšené riziko diabetických makro- ani mikrovaskulárních komplikací (Miller et al. 1999, Ellard et al. 2000).

Mutace lze rozdělit do tří skupin s různým fenotypovým projevem:

- 1) postihující chráněné aktivní místo enzymu, které velmi výrazně omezují jeho katalytickou aktivitu;
- 2) zasahující do struktury enzymu mimo aktivní místo, které mají menší vliv na jeho katalytickou schopnost;
- 3) mutace povrchových struktur ovlivňující interakce s ostatními proteiny, které mohou snížit stabilitu enzymu a omezit jeho schopnost vázat glukózu, mající většinou jen mírný fenotypový dopad.

Všechny mutace GCK se vyznačují vysokou penetrancí, téměř všichni nositelé mutovaného genu mají porušenou glukózovou homeostázu (Velho et al. 1997). Diabetičtí pacienti s MODY2 jsou většinou dostatečně kompenzováni dietetickými opatřeními.

## 4. HEPATOCYTÁRNÍ NUKLEÁRNÍ FAKTOR-1 $\alpha$ (MODY3)

### 4.1 HISTORIE

Prevalence MODY3 se pohybuje v různých populacích MODY pacientů v rozmezí od 30 % v Německu, přes 40 % ve Francii až po 75 % ve Velké Británii (Yamada et al. 1999; Fajans et al. 2001). V důsledku vysokého výskytu MODY3 bylo možné sestavit dostatečně početný vzorek postižených rodin a provést u nich genetické mapování. V koncové oblasti dlouhého raménka 12. chromozomu – 12q22-qter – byl nalezen odpovědný lokus do velikosti 5 cM. Při fyzikálním mapování byly nalezeny nové polymorfní genetické markery v klonované sekvenci DNA a zpřesněním pozic rekombinačních zlomů došlo k zúžení intervalu na 3 cM, kde pomocí genetických metod sloužících k identifikaci genů (testování známých genů a expresních štítků, exon trapping, hledání potenciálních čtecích rámců) byl roku 1996 nalezen gen *HNF-1 $\alpha$* , jehož mutace striktně kosegregovaly s MODY fenotypem v postižených rodinách (Yamagata <sup>a)</sup> et al. 1996; Hatina and Sykes 1999).

### 4.2 BIOCHEMICKÝ MECHANISMUS

HNF-1 $\alpha$  působí jako transkripční faktor, řídí expresi některých genů v různých tkáních – v játrech,  $\beta$ -buňkách pankreatu, ledvinách a střevních buňkách (Wang et al. 1998). Hraje významnou roli v embryogenezi těchto orgánů. Podléhá autoregulaci a pozitivní regulaci HNF-4 $\alpha$ .

HNF-1 $\alpha$  se váže jako homodimer nebo heterodimer s HNF-1 $\beta$  na DNA sekvence promotorů a enhancerů cílových genů, které kódují sérové proteiny, s důležitou úlohou v glukózovém transportu a metabolismu, ale i na promotor *HNF-4 $\alpha$* . V  $\beta$ -buňkách přímo aktivuje expresi inzulínového genu a genu pro glukózový transportér *GLUT2* (Okita et al. 1999; Fajans et



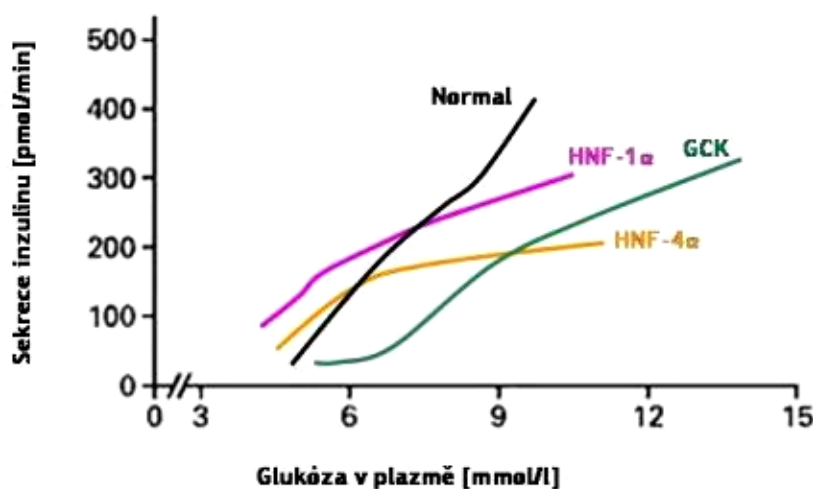
al. 2001; Wang et al. 1998). HNF-1 $\alpha$  pozitivně reguluje enhancer genu *IPF-1* (Ben-Shushan et al. 2001).

HNF-1 $\alpha$  se skládá ze čtyř domén: z promotorové oblasti, která zahrnuje vazebné místo pro transkripční faktor HNF-4 $\alpha$ , z dimerizační, DNA-vazebné a transaktivační domény (obr. 11). Podle polohy ovlivňují mutace transkripční aktivitu proteinu nebo jeho schopnost vázat se na DNA. Mutace v promotorovém úseku může vést k nadprodukci HNF-1 $\alpha$ , jenž paradoxně zpětnovazebně tlumí expresi HNF-4 $\alpha$ , který jej reguluje. Tím dochází k poruše exprese dalších genů (Godart et al. 2000, Rose et al. 2000).

Mutace v *HNF-4 $\alpha$*  a *HNF-1 $\alpha$*  vykazují stejné biochemické účinky na glukózový metabolismus: zhoršují glukózou stimulovanou inzulinovou sekreci aniž by snižovaly inzulinovou senzitivitu. Dochází tedy k defektu ve funkci  $\beta$ -buněk, nikoliv v inzulinové aktivitě.

Na rozdíl od *GCK* mutací, kdy ke snížení inzulinové sekrece dochází i při nízkých koncentracích glukózy, u nositelů *HNF-4 $\alpha$*  nebo *HNF-1 $\alpha$*  mutací je při nízké koncentraci glukózy (např. po nočním lačnění) zachována normální sekrece inzulinu. Ta kontinuálně stoupá s růstem koncentrace glukózy. Ale po dosažení hladiny glukózy  $\sim 7,0$ – $8,0$  mmol/l se vzestup inzulinové sekrece zastaví a ta naopak začne klesat (obr. 10).

**Obr. 10: Vliv mutací v genech pro *GCK*, *HNF-1 $\alpha$*  a *HNF-4 $\alpha$*  na inzulinovou sekreci v závislosti na hladině glukózy**



(Fajans et al. 2001; upraveno)

Prediabetičtí pacienti s mutací v genu *HNF-1 $\alpha$*  mají jako zdraví jedinci a nositelé *GCK* mutací zachovaný stimulační efekt glukózy na inzulinovou sekreci. U prediabetických pacientů s mutací v genu *HNF-4 $\alpha$*  není tato schopnost reagovat zvýšenou inzulinovou sekrecí na zvyšující se hladinu glukózy zachována (Fajans et al. 2001).

Pacienti s *HNF-1 $\alpha$*  mutací mají snížený renální práh pro reabsorpci glukózy, bývá u nich pozorována glykosurie (Fajans et al. 2001).

### 4.3 GENETIKA

Gen pro *HNF-1 $\alpha$*  se skládá z deseti exonů. V souvislosti s *MODY3* bylo již objeveno více než 130 mutací, převážně bodových missense a nonsense substitucí, ale byly nalezeny i delece, inserce a inverze (obr. 11) (Kaisaki et al. 1997, Hattersley 1998, Yamada et al. 1999, Ellard 2000, Ellard et al. 2000 b, Bjørkhaug et al. 2003; Toaima et al. 2005).

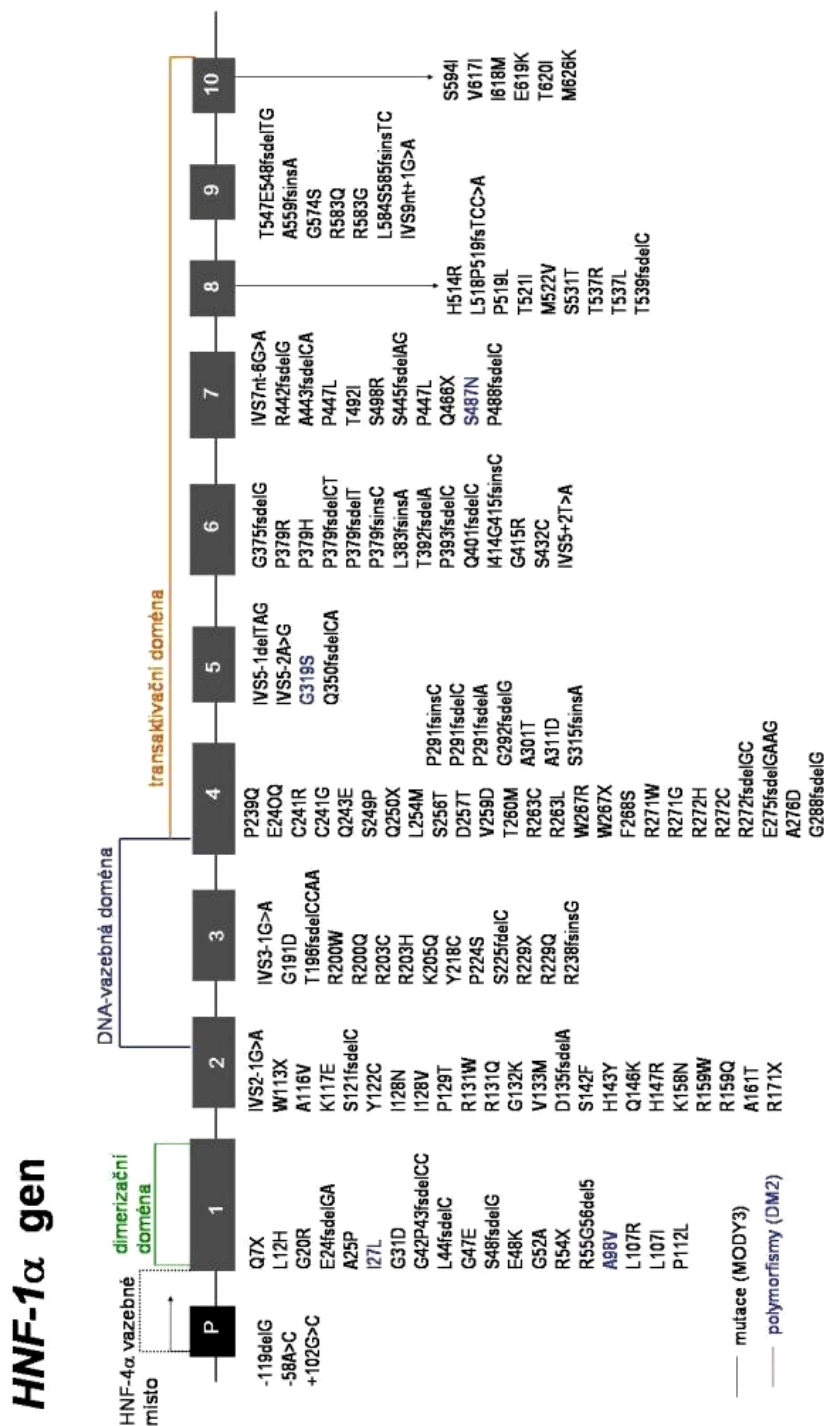
#### 4.3.1 POLYMORFISMY ASOCIOVANÉ S DM2

Obecné varianty v *HNF-1 $\alpha$*  genu A98V (záměna alaninu za valin) a I27L (záměna izoleucinu za leucin) jsou celosvětově rozšířeny a byly popsány v souvislosti se zhoršenou inzulinovou sekrecí, silnější asociace s DM2 byla zjištěna u I27L (Chiu et al. 2003). Nejvíce zkoumaným polymorfismem je A98V, který vykazuje asociaci s DM2 u celé řady populací. Nicméně v rozsáhlých populačních studiích na jedincích ze Severní Ameriky, Polska (Winckler et al. 2005) a Velké Británie (Weedon<sup>b)</sup> et al. 2005) nebyla asociace těchto polymorfismů s DM2 přímo potvrzena, byl uveden pouze pravděpodobný vliv na zvýšené riziko vzniku onemocnění.

Avšak např. v populační studii na 4100 jedincích ze Skandinávie byla nalezena spojitost mezi polymorfismy A98V, I27L, ale i S487N (záměna serinu za asparagin) a sníženou transkripční aktivitou *HNF-1 $\alpha$*  v oblasti promotoru glukózového transportéru GLUT2, sníženou glukózou

stimulovanou sekrecí inzulínu, zvýšenou inzulínovou senzitivitou a vyšším rizikem DM2 zejména u starších jedinců (>60 let) s nadváhou (BMI>25 kg/m<sup>2</sup>) (Holmkvist et al. 2006).

Obr. 11: HNF-1 $\alpha$  gen a MODY3 mutace



(Ellard 2000; upraveno)

#### 4.4 FENOTYP A LÉČBA

Fenotypový projev opět závisí na místě a typu mutace. Je zřejmé, že mutace, které vedou k posunu čtecího rámce nebo k předčasnému vzniku stop-kodónu, mají za následek těžší klinické projevy metabolické poruchy. Při působení mutantního fenotypu se uplatňuje efekt dávky a dominantně negativní mechanismus, dochází ke snížení sekrece inzulínu, přesný mechanismus však dosud není přesně objasněn (Wang et al. 1998, Yang et al. 1999, Yoshiuchi et al. 1999, Frayling et al. 2001).

Onemocnění MODY3 se většinou manifestuje až v postpubertálním věku (22–26 let), v dětství bývá zachována normální funkce  $\beta$ -buněk pankreatu. Pacienti nebývají obézní (BMI < 25 kg/m<sup>2</sup>), mívají prostou hyperglykémii bez známek metabolického syndromu a ketoacidózy (Isomaa et al. 1998, Timsit et al. 2005). Často se přidružují osmotické poruchy – polyurie a polydipsie – v důsledku snížení renálního prahu vnímavosti vůči glukóze. Riziko výskytu a rychlé progresy diabetických mikrovaskulárních komplikací, zejména retinopatie, je vysoké. Po 16 letech trvání diabetu byla prevalence retinopatie až 50 %, z toho těžkou formou trpělo až 20 % MODY3 pacientů (Hattersley 1998). Přesto výskyt těchto komplikací je srovnatelný s prevalencí u diabetiků 1. i 2. typu (Isomaa et al. 1998). Naopak prevalence makroangiopatických komplikací – např. hypertenze a dyslipidemie – je výrazně nižší oproti stejně starým diabetikům 2. typu (Isomaa et al. 1998, Owen et al. 2002).

Metabolická porucha s věkem výrazně progreduje a často musí být dietetická opatření nahrazena inzulínovou léčbou nebo PAD – deriváty sulfonylurey (Hattersley 1998). V posledních letech se stále častěji přistupuje k alternativě léčby deriváty sulfonylurey i u pacientů dlouhodobě léčených inzulínem (Shepherd and Hattersley 2004). Předpokladem úspěšnosti této terapie je zachovaná dobrá inzulínová senzitivita pacientů. Určitým rizikem dlouhodobé léčby PAD by mohla být s věkem se snižující sekrece inzulínu, ale tyto obavy zatím nebyly potvrzeny (Pearson 2000, Shepherd et al. 2003, Shepherd and Hattersley 2004).

Penetrance choroby není úplná, klinická manifestace se liší nejen mezi rodinami, ale i mezi členy jedné rodiny. Na fenotypu se podílejí další genetické či environmentální faktory – např. inzulinová rezistence během těhotenství či z důvodu váhového přírůstku (Lehto et al 1997, Timsit et al. 2005).

## 5. INZULINOVÝ PROMOTOROVÝ FAKTOR-1 (MODY4)

### 5.1 HISTORIE

V roce 1997 byl nalezen u jedné rodiny s onemocněním MODY, u které nebyla prokázána vazba s žádným dosud známým lokusem MODY, nový lokus pro tuto chorobu. U dítěte s agenezí pankreatu byla objevena homozygotní mutace - delece v 63. kodónu (P63fsdelC→X) v genu pro *IPF-1* (inzulinový promotorový faktor) nacházejícím se na dlouhém raménku 13. chromozomu, která vedla k posunu čtecího rámce (frame-shift). Mutace má za následek vznik inaktivního proteinu s poruchou vazby na DNA. U osmi příslušníků této rodiny byly nalezeny další tři missense mutace *IPF-1* genu (C18R, D76N, R197H), které zapříčiňují DM2 s výrazným familiárním výskytem (Stoffers et al. 1997<sup>a) b)</sup>).

### 5.2 BIOCHEMICKÝ MECHANISMUS

IPF-1, uváděný též pod jménem pankreatický duodenální homeobox-1 (Pdx-1), je transkripční faktor, který je hlavním aktivátorem a regulátorem vývoje exokrinního i endokrinního pankreatu. Hraje klíčovou roli v prvním stadiu pankreatického vývoje. Je rovněž nezbytný pro funkci dospělého pankreatu, kde je exprimován v  $\beta$ - i  $\delta$ -buňkách. Jak napovídá jeho název, nasedá přímo na promotor inzulinového genu. Kromě toho působí jako transkripční faktor na další geny specifické pro Langerhansovy buňky: gen pro *GLUT2*, *Nkx6.1*, *Pax4*, amyloidní polypeptid IAPP (islet amyloid polypeptide) a pro *GCK*. Ovlivňuje také expresi genu pro somatostatin v  $\delta$ -buňkách pankreatu (Hara et al. 1998).

### 5.3 GENETIKA

*IPF-1* gen se skládá ze dvou exonů. Obsahuje tři konzervativní regulační oblasti: PH1, PH2 a PH3. Nejrozšířenější mutací v evropské populaci je D76N (záměna kyseliny asparagové za asparagin) (Macfarlane et al. 1999, Hani et al. 1999). Mezi další popsané substituce patří C18R (záměna cysteinu za arginin) a R197H (záměna argininu za histidin) ve Velké Británii (Macfarlane et al. 1999), Q59L (záměna lysinu za leucin) a insP243 (inzerce prolinu na 243. pozici) ve Francii (Hani et al. 1999) a G212R (záměna glycinu za arginin) a P239Q (záměna prolinu za glutamin) ve Skandinávii (Weng et al. 2001). Zmíněné mutace mají za následek sníženou vazebnou aktivitu IPF-1 na inzulinový promotor a následnou sníženou transkripci inzulinu, což vede k hyperglykemii. Předpokládá se, že výskyt těchto mutací může v některých populacích dosahovat >1 % (Hui et al. 2002).

V populaci amerických bělochů a Afroameričanů nebyla prokázána souvislost DM2 s žádnou z těchto mutací (Karim et al. 2005). Avšak u Afroameričanů (nikoliv u bělošských Američanů) byly nalezeny asociované polymorfismy v oblasti  $\beta$ -buněčného enhanceru (-3766 bp C>T), v regulační oblasti PH1 (-2877 bp A>T; rs2293943) a v promotorové oblasti (-108 bp insG), který vykazoval statisticky nejsilnější asociaci s DM2 (Hui et al. 2002) a byl popsán i v japonské populaci (Yamada et al. 1998).

### 5.4 FENOTYP A LÉČBA

U pacientů s MODY4 byly nalezeny klasické projevy DM2 a bylo prokázáno zvýšené riziko mikrovaskulárních poruch, zejména nefropatie. Přesný mechanismus postižení není vzhledem k velmi nízké frekvenci znám. Průměrný věk při diagnóze je 35 let (Stoffers et al. 1997<sup>a) b)</sup>, Yamada et al. 1998).

## 6. HEPATOCYTÁRNÍ NUKLEÁRNÍ FAKTOR-1 $\beta$ (MODY5)

### 6.1 HISTORIE

Roku 1997 byl objeven další genový lokus zodpovědný za MODY. Jedná se o gen pro *HNF-1 $\beta$* , který kóduje další transkripční faktor, jenž patří do komplexu regulační sítě ovlivňující vývoj a funkceschopnost pankreatických buněk. HNF-1 $\beta$  vykazuje vysoký stupeň strukturní homologie s HNF-1 $\alpha$ . Na DNA se váže ve formě homodimeru nebo heterodimeru s HNF-1 $\alpha$  (Beards et al. 1998).

### 6.2 GENETIKA, FENOTYP A LÉČBA

Výskyt MODY5 je velmi vzácný. Dosud byla popsána jedna nonsense mutace R177X (záměna argininu za stop kodón), která vede ke vzniku zkráceného proteinu s výrazně sníženou transkripční aktivitou. U pacienta byla kromě hyperglykemie nalezena i diabetická nefropatie (Horikawa et al. 1997). Další dosud známou mutací tohoto genu je rozsáhlá delece (R137del75), která má za následek rozvoj diabetu a polycystické postižení ledvin s abnormální histologií meganefronů (Nishigori et al. 1998). Je tedy zřejmé, že HNF-1 $\beta$  hraje důležitou roli v embryogenezi nejen pankreatu, ale i ledvin. MODY 5 bylo diagnostikováno v adolescenci (<25 let) a pro kompenzaci metabolické poruchy glukózy je většinou potřebná inzulinová léčba.



## **7. NEUROGENNÍ DIFERENCIAČNÍ PROTEIN-1 (MODY6)**

### **7.1 HISTORIE**

První nalezené mutace v genu *NeuroD1* byly popsány roku 1999 u pacientů s DM2 (viz 7.3). V souvislosti s onemocněním MODY zmiňuje mutace v *NeuroD1* Fajans, který nazval tento genový lokus lokusem MODY6 (Fajans et al. 2001).

### **7.2 BIOCHEMICKÝ MECHANISMUS**

Protein neurogenní diferenciaci (NeuroD1), známý též jako  $\beta$ -buněčný E-box transaktivátor (BETA2), patří do skupiny basic helix-loop-helix (bHLH) proteinů (nazývajících se podle supersekundárních struktur šroubovice–smyčka–šroubovice, které zaujímají). Proteiny bHLH jsou transkripční faktory, jež se účastní buněčné diferenciaci. Gen pro *NeuroD1* je exprimován v neuronech CNS, kde se podílí na jejich konečné diferenciaci. Dále bylo zjištěno, že NeuroD1 tvoří heterodimer se všudypřítomným bHLH proteinem E47 a ve formě tohoto heterodimeru se váže na důležitou oblast – tzv. E-box – inzulinového promotoru, čímž přímo ovlivňuje expresi inzulinového genu (Naya et al. 1995). Kromě toho se váže i na promotory *GCK*, *IAPP*, *Nkx2.2* a *Pax4* (Moates et al. 2003).

### **7.3 GENETIKA**

Roku 1999 byly u dvou různých rodin s DM2 popsány dvě heterozygotní mutace v genu pro *NeuroD1*. První mutace byla nalezena u šesti příslušníků jedné rodiny, u čtyř byl diagnostikován DM a dva jedinci měli zhoršenou glukózovou toleranci, průměrný věk při zjištění DM byl 40 let. Všichni jedinci byli obézní a měli poměrně vysokou sérovou hladinu inzulinu. U dvou

pacientů léčených inzulínem byla naměřena dostatečně vysoká hladina sérového C-peptidu, tudíž u nich byla zachována endogenní sekrece inzulínu. Všichni pacienti vykazovali typický fenotyp DM2. Tato missense mutace R111L (záměna argininu za leucin) postihuje DNA-vazebnou doménu proteinu a narušuje jeho vazebnou aktivitu na E-box inzulínového promotoru (Malecki et al. 1999<sup>a)</sup>).

Další mutace v genu pro *NeuroD1* byla nalezena u devíti příslušníků jiné rodiny, sedm z nich bylo diagnostikováno jako diabetičtí pacienti, dva jedinci byli nediabetičtí, zřejmě u nich nedošlo k penetranci onemocnění. Průměrný věk při diagnóze DM byl 31 let. Na rozdíl od příslušníků první rodiny nebyli tito pacienti obézní a u všech byla naměřena nízká sérová hladina inzulínu. U dvou pacientů léčených inzulínem byl nedetekovatelný C-peptid v séru, což svědčí o nepřítomnosti endogenní inzulínové sekrece. Fenotypově se tito pacienti blížili MODY3 pacientům. Touto druhou mutací je inserce jednoho nukleotidu (206fsinsC), která vede k posunu čtecího rámce a k předčasnému vytvoření stop-kodónu. Mutovaný protein je zkrácen o COOH-koncovou transkripční doménu, což je oblast proteinu, která asociuje s buněčnými koaktivátory CBP a p300. Klinický dopad metabolické poruchy je větší u pacientů s mutací 206fsinsC než u pacientů s mutací R111L (Malecki et al. 1999<sup>a)</sup>).

U obou rodin, u nichž byla nalezena mutace v genu *NeuroD1*, byl zjištěn značný familiární výskyt DM. U žádného z těchto pacientů nebylo zjištěno onemocnění CNS nebo gastrointestinálního traktu – dalších dvou tkání, ve kterých je gen pro *NeuroD1* exprimován (Malecki et al. 1999<sup>a)</sup>).

### **7.3.1 POLYMORFISMUS A45T**

Dosud byl popsán jediný obecný polymorfismus A45T (záměna alaninu za threonin) v genu pro *NeuroD1* (Malecki et al. 1999<sup>a)</sup>), který je spojován se zhoršenou sekrecí C-peptidu. Někdy je uváděn v souvislosti s DM2 (Malecki et al. 1999<sup>a)</sup>), ale častěji s DM1 (Malecki et al. 2003).

## 8. MODYX

Přes značný výskyt mutací v genech pro *GCK* (*MODY2*) a *HNF1 $\alpha$*  (*MODY3*) v *MODY* rodinách, zůstává dosud neobjasněno 15–20 % ze všech případů *MODY*. Ani v dalších popsanych *MODY* genech nebyla nalezena příčinná mutace u těchto pacientů. S největší pravděpodobností tedy existují ještě jiné genové lokusy, které jsou zodpovědné za vznik *MODY* (Chévre et al. 1998).

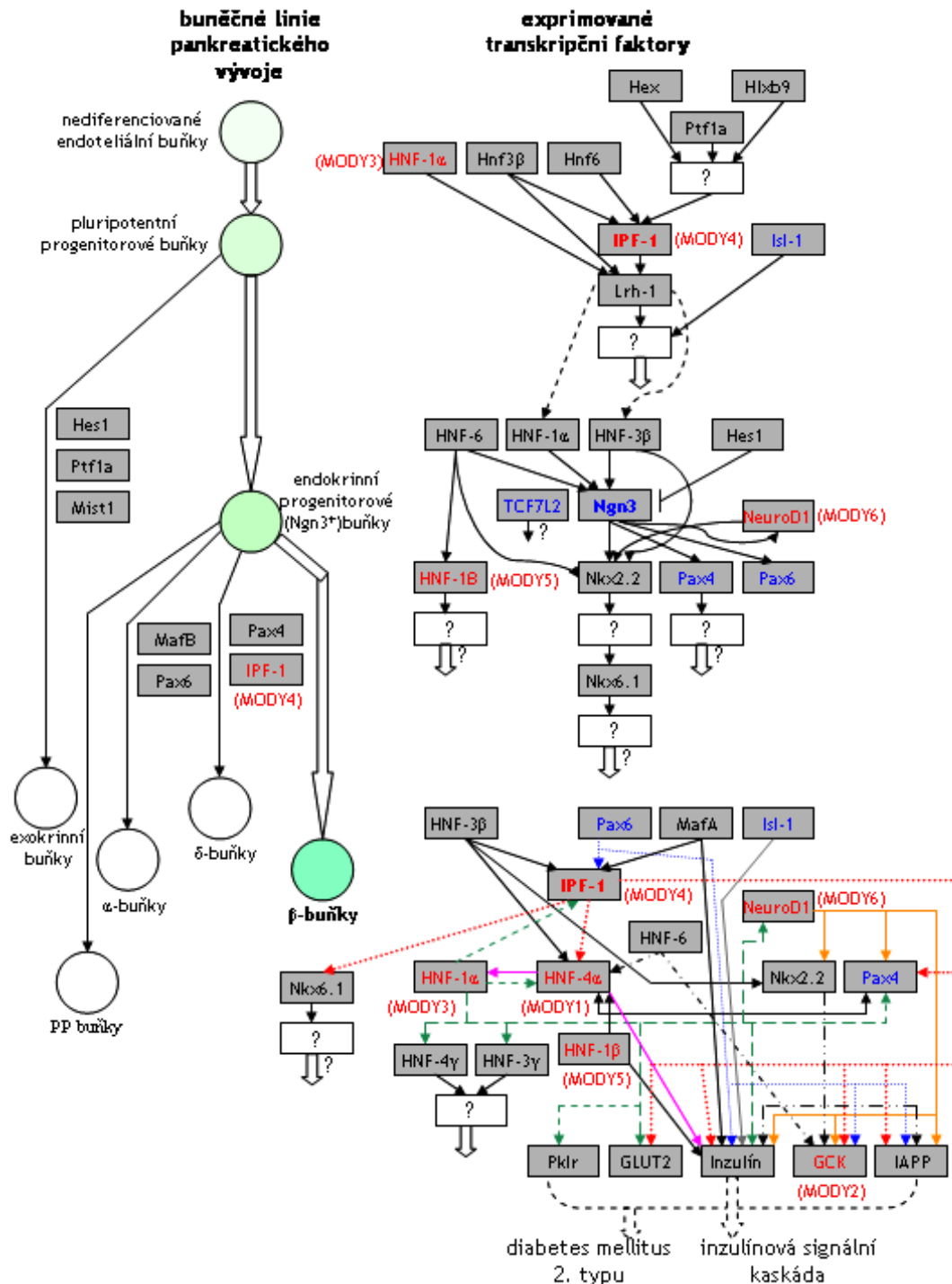
Většina *MODY* genů funguje jako transkripční faktory. Jsou to vlastně všechny dosud popsané *MODY* geny, kromě *MODY2* genu pro *GCK*. Tyto transkripční faktory jsou nezbytné pro embryogenezi a diferenciaci pankreatu a pro správné dodržování genetického programu, a tím správné funkčnosti u dospělých diferencovaných pankreatických buněk (Servitja et al. 2004).

Původně se předpokládalo, že jednotlivé transkripční faktory jsou specifické pro určitý fenotyp dané buňky. Ukázalo se však, že působí jako tzv. regulační síť, kde některé faktory regulují transkripci dalších faktorů přímo vazbou na jejich promotor, případně vazbou na jiná regulační místa v blízkosti jejich genů (enhancer, silencer). Každá buňka je tedy řízena nejen jedinečnou kombinací transkripčních faktorů, ale i specifickou sítí působení těchto faktorů.

Regulační síť transkripčních faktorů nezbytných pro vývoj a funkci pankreatu je velmi složitá. Přestože poznatky o této síti jsou značné a stále nové přibývají, její komplexnost je natolik velká, že dosud nebyly objeveny všechny zúčastněné transkripční faktory a některé trasy nejsou kompletní (obr. 12). Během časných stadií vývoje pankreatu jsou exprimovány transkripční faktory *IPF-1*, *Ptf1a*, *Hlxb9*, *Isl1*, *Hex*, *Hes1*, *Mist1*, *Lrh-1*, hepatocytární nukleární faktory *HNF-6*, *HNF-3 $\beta$*  a *HNF-1 $\alpha$* . Ve druhém vývojovém stadiu dochází k rozšíření regulační sítě o další transkripční faktory: *HNF-1 $\beta$* , *Ngn3*, *NeuroD1*, *Pax4* a *Pax6*, *Nkx6.1* a *Nkx2.2*, *MafA* a *MafB*. V dospělých pankreatických  $\beta$ -buňkách byla kromě aktivity výše uvedených transkripčních faktorů zjištěna exprese dalších hepatocytárních

transkripčních faktorů HNF-3 $\gamma$ , HNF-4 $\gamma$  a HNF-4 $\alpha$  (Servitja et al. 2004, Habener et al. 2005) (obr. 12).

**Obr. 12: Schematické znázornění exprese transkripčních faktorů během jednotlivých stadií vývoje pankreatu**



(<http://cgap-stage.nci.nih.gov/Pathways/Kegg/hsa04950>; upraveno)

Funkce transkripčních faktorů – MODY genů je uvedena výše. Podrobný popis všech dalších faktorů účastnících se embryogeneze pankreatu přesahuje rámec této práce. Nicméně, chtěla bych zmínit alespoň ty transkripční faktory, které hrají klíčovou roli ve vývoji a funkci endokrinního pankreatu, a tudíž i v patogenezi DM.

### **8.1 ISLET (Isl-1)**

Isl-1 patří do rodiny transkripčních faktorů s motivem LIM/homeodomény, váže se na oblast enhanceru inzulinového genu a ovlivňuje jeho expresi (Tanizawa et al. 1994). Je nezbytný pro vývoj endokrinního pankreatu, ale i pro vývoj centrálního nervového systému. Cílený knockout *Isl-1* vede k embryonální letalitě. Ve zralém pankreatu je exprimován ve všech buňkách Langerhansových ostrůvků produkujících hormony (Habener et al. 2005).

V roce 2000 byla u jedné japonské rodiny s vysokým familiárním výskytem DM2 popsána nonsense mutace v genu pro transkripční faktor *Isl-1*. Nonsense mutace Q310X (záměna glutaminu za stop kodón) byla nalezena u 49letého muže, u něhož však diabetes mellitus byl diagnostikován už ve 32 letech. Pacient byl léčen PAD a nebyl obézní. Zmíněná mutace byla nalezena i u pacientovy matky s diagnostikovaným DM a jeho 14leté dcery, u níž byla zjištěna normální glukózová tolerance, ale snížená inzulinová odpověď. Mutace postihuje transaktivační doménu faktoru a má za následek vznik proteinu zkráceného na COOH-konci o 40 aminokyselin. Bylo zjištěno 50% snížení aktivity mutovaného transkripčního faktoru v porovnání s nemutovaným (Shimomura et al. 2000).

Je zřejmé, že mutace v transkripčním faktoru Isl-1 mohou mít vliv na patogenezi DM, nicméně tento gen zatím není běžně přijímán jako MODY7 genový lokus (Fajans et al. 2001).

## 8.2 NEUROGENIN3 (Ngn3)

Ngn3 patří do rodiny bHLH transkripčních faktorů. Mimo to, že ovlivňuje determinaci neuronálních prekursorových buněk neuroektodermu, je klíčovým transkripčním faktorem v organogenezi pankreatu. Během druhého vývojového stadia řídí diferenciaci všech buněčných linií endokrinního pankreatu, indukuje expresi endokrinních transkripčních faktorů NeuroD1, Nkx2.2, Pax4 a Pax6 (Gradwohl et al. 2000) (obr. 12). Buňky exprimující neurogenin3 (Ngn3<sup>+</sup> buňky) jsou často vmezeřeny mezi embryonální epitelové buňky kanálek exprimující HNF-1 $\beta$  (HNF-1 $\beta$ <sup>+</sup>) a předpokládá se, že tyto HNF-1 $\beta$ <sup>+</sup> buňky jsou v daném vývojovém stadiu přímými prekuzory Ngn3<sup>+</sup> buněk (Maestro et al. 2003). Exprese Ngn3 je aktivována vazbou HNF-6, HNF-1 $\alpha$  a HNF-3 $\beta$  na distální oblasti promotoru. Naopak Hes-1 (Hairy and Enhancer of Split), bHLH transkripční represor, je hlavním negativním regulátorem exprese Ngn3 (obr. 12). Předpokládá se, že je součástí zpětnovazebné smyčky. Pokud v určité buňce dosáhne aktivita Ngn3 prahové hodnoty, sepne se inhibiční kaskáda vazbou Hes-1 na silencersy v blízkosti iniciačního místa transkripce (Lee et al. 2001).

Ve zralém pankreatu je exprese Ngn3 téměř nedekovatelná, přesto byly popsány polymorfismy asociované s DM fenotypem. Celosvětově rozšířeným polymorfismem je S199F (záměna serinu za fenylalanin). V dánské studii byla u nositelů minoritní alely zjištěna vyšší hladina lačné glykemie, sérového C-peptidu a lačného inzulínu (Jensen et al. 2001). Také další nalezený polymorfismus G167R (záměna glycinu za arginin) zasahuje do konzervativní sekvenční oblasti genu (stejně jako S199F) a minoritní alela s sebou nese zvýšené riziko vzniku DM2 (Gragoli et al. 2006).

Mutace v *Ngn3* byly studovány i v souvislosti s MODY u americké (Kim et al. 2001) a japonské (del Bosque-Plata et al. 2001) populace, žádná souvislost ale nebyla prokázána.

### 8.3 Pax4, Pax6

Pax4 (paired-box) je homeoprotein, k jehož expresi dochází výlučně v centrálním nervovém systému a v časných vývojových stádiích organogeneze pankreatu, v době porodu je jeho exprese omezena pouze na pankreatické  $\beta$ -buňky. Podporuje diferenciaci  $\beta$ - a  $\delta$ -buněk. Lidský *Pax4* promotor obsahuje vazebná místa pro IPF-1, Ngn3, NeuroD1, HNF-1 $\alpha$  a HNF-4 $\alpha$  (Stuart et al. 2003).

V Japonské populaci byl přibližně u 2 % diabetiků 2. typu nalezen polymorfismus R121W (záměna argininu za tryptofan) v genu *Pax4*, který vede ke snížení vazebné aktivity transkripčního faktoru. Byl také pozorován rychlejší rozvoj inzulinové deficiencie (Shimajiri et al. 2003). V populaci západních Afričanů byly v souvislosti se zvláštním typem DM2, jenž se vyznačuje zvýšenou náchylností ke ketóze (KPD = ketosis-prone diabetes), popsány další dvě mutace: heterozygotní R133W (záměna argininu za tryptofan) a homozygotní R37W (záměna argininu za tryptofan). Nositelé těchto mutací měli výrazně zhoršenou inzulinovou sekreci a progresi k závislosti na inzulinu byla rychlejší (Mauvais-Jarvis et al. 2004).

Pax6 je homeoprotein nezbytný při organogenezi oka, centrálního nervového systému, nosu a endokrinního pankreatu, kdy podporuje diferenciaci  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ - i PP buněk. V dospělých  $\beta$ -buňkách se váže na promotor genu pro inzulin, somatostatin, glukagon, *IAPP*, *IPF-1* a *GCK* (Sander et al. 1997).

Pax4 a Pax6 hrají klíčovou roli v konečné diferenciaci endokrinního pankreatu (obr. 12).

### 8.4 TCF7L2

Poměrně nedávno byl objeven další transkripční faktor účastnící se pankreatické embryogeneze, TCF7L2 (transcription factor 7-like2), který náleží do rodiny T-buněčných faktorů (TCF/lymphoidenhancing factor).

Bylo prokázáno, že *TCF7L2* je exprimován téměř ve všech buňkách (srdce, placenta, žaludek, střeva, mozek, játra, ledviny, pankreas, adipocyty), nikoliv však v buňkách kosterního svalstva. Studie na myších modelech ukázaly, že během embryonálního pankreatického vývoje exprese *TCF7L2* úzce koreluje s expresí *Ngn3* (Cauchi et al. 2006).

V dospělých pankreatických  $\beta$ -buňkách nebyla exprese *TCF7L2* prokázána, přesto rozsáhlé populační studie poukázaly na asociaci velkého množství SNPs s DM2 u jedinců z Velké Británie (Groves et al. 2006), Francie (Cauchi et al. 2006), Finska (Scott et al. 2006), Islandu, Dánska a USA (Grant et al. 2006), Holandska (van Vliet-Ostaptchouk et al. 2007), ale i u indiánské populace (Chandak et al. 2007), nebo u Indů a Afričanů z karibské oblasti (Humphries et al. 2006). Gen *TCF7L2* byl označen za „kandidátní gen DM2 roku 2006“.



## 9. CÍLE PRÁCE

Mutace v tzv. MODY genech jsou příčinou jednotlivých podtypů MODY. Lze však předpokládat, a některé výše uvedené studie to i dokazují, že polymorfismy těchto genů mohou modifikovat jejich expresi a funkci a mohou tak přispívat k patogenezi běžných forem diabetu. Jedním z cílů práce bylo zjistit frekvenci některých běžných polymorfismů v MODY genech v české diabetické a nediabetické populaci.

MODY2 má velmi mírné fenotypové projevy a bývá často diagnostikován náhodně až v dospělém věku, nebo dokonce může dojít k chybnému stanovení diagnózy jiného typu diabetu. Proto jsme se rozhodli zjistit, zda v běžné české diabetické populaci (nikoliv u MODY rodin) je zvýšený výskyt mutací/polymorfismů v *GCK* genu v důsledku nepřesné diagnostiky oproti nediabetické populaci.

U MODY rodin jsme sledovali frekvenční zastoupení typu MODY2.

Základním předpokladem řešení této dizertační práce byla průběžná kompletizace studovaných souborů jedinců s neurčeným typem MODY, s diabetem mellitem 2. typu, s gestačním diabetem, souboru zdravých potomků diabetiků a kontrolních zdravých osob bez familiární historie (FH) diabetu mellitu. Následovala charakterizace všech souborů včetně vytvoření DNA banky a databáze, jež obsahuje podrobná anamnestická, antropometrická a klinicko-biochemická data pacientů, a statistická analýza získaných dat.

**Konkrétní cíle:**

1. Zavedení screeningových metod TGGE (teplotní gradientová gelová elektroforéza) a SSCP (single strand conformation polymorphism)
2. Porovnání obou screeningových metod
3. Screening mutací a polymorfismů ve všech exonech *GCK* genu specifických pro expresi v pankreatu v české diabetické a nediabetické populaci
4. Zjištění zastoupení *MODY2* u *MODY* rodin
5. Zjištění frekvence polymorfismu -30G>A v B-promotoru *GCK* genu (rs1799884) v české diabetické a nediabetické populaci, statistické zhodnocení dat
6. Zjištění frekvence polymorfismu A98V (rs1800574) v *HNF-1 $\alpha$*  genu v české diabetické a nediabetické populaci, statistické zhodnocení dat

## 10. SOUBORY

Soubor pacientů s MODY je tvořen 12 rodinami: 12 základních pacientů s hyperglykemií, u kterých byl vyloučen diabetes mellitus 1. typu – negativní protilátky GADA (glutamic acid decarboxylase antibodies), ICA (islet cell antibodies) a IA2 (antibodies to protein tyrosine phosphatase) –, s familiárním výskytem hyperglykemie nebo diabetu v prvním stupni příbuzenského vztahu a diagnózou onemocnění před 25. rokem života v souladu s kritérii diagnostiky MODY (Fajans et al. 2001), a 10 rodinných příslušníků.

Ve spolupráci s MUDr. Kateřinou Andělovou z Ústavu péče o matku a dítě (ÚPMD) v Praze byl vytvořen soubor 194 žen s diagnózou gestačního diabetu (GD) podle WHO (World Health Organization = Světová zdravotnická organizace). U pacientek byl vyloučen DM1. Biochemické vyšetření a antropometrické měření těchto žen bylo provedeno v Endokrinologickém ústavu v Praze v rozmezí 9 měsíců až 1,5 roku po skončení těhotenství, při kterém byl GD diagnostikován.

Všech 339 pacientů s diagnózou DM2 podle WHO bylo pacienty pražských diabetologických ordinací. Soubory 141 zdravých jedinců s familiárním výskytem DM2 alespoň u jednoho z rodičů (potomci diabetiků) a 261 zdravých jedinců bez rodinné anamnézy DM2 (kontrolní jedinci) byly vytvořeny z řad dobrovolníků. Biochemická vyšetření a antropometrická měření byla prováděna v Endokrinologickém ústavu v Praze.

V tabulce 2 je uvedena základní charakterizace souborů. Počty jedinců se u jednotlivých genetických analýz liší, protože byly stanovovány po sobě a postupně probíhala i kompletizace souborů (tab. 2a až 2c).

**Informovaný souhlas:** Každý pacient byl podrobně informován o studii, o průběhu vyšetření a o odběru krve ke genetickému vyšetření. Pacient byl poučen, že jeho osobní i anamnestická data neposkytneme další osobě, že data budou statisticky vyhodnocována a publikována v odborném tisku bez

uvedení osobních údajů a budou použita pouze k výzkumným účelům. Dále byl pacient informován o možnosti kdykoliv ze studie vystoupit bez udání důvodu. Pacient svůj souhlas s účastí ve studii stvrdil podpisem informovaného souhlasu. Protokol studie byl schválen Etickou komisí Endokrinologického ústavu.

**Tab. 2a): Přehled a základní charakteristiky souborů, u kterých byl proveden screening sekvenčních variant GCK genu**

<b>diabetici 2. typu (DM2)</b>	<b>ženy (F) (n = 191)</b>	<b>muži (M) (n = 122)</b>	<b>celkem (n = 313)</b>
věk (roky)	58,5±7,82	59,5±7,94	58,9±7,88
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	31,2±6,20	29,5±4,09	30,5±5,53
<b>gestační diabetičky (G)</b>	<b>ženy (F) (n = 141)</b>	<b>muži (M) (n = 0)</b>	<b>celkem (n = 141)</b>
věk (roky)	33,1±6,44		33,1±6,44
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26,4±5,03		26,4±5,03
<b>nediabetici s rodinnou anamnézou DM2 (PD)</b>	<b>ženy (F) (n = 84)</b>	<b>muži (M) (n = 46)</b>	<b>celkem (n = 130)</b>
věk (roky)	38,5±12,05	40,2±9,20	39,1±11,16
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25,0±4,11	26,5±4,10	25,5±4,17
<b>nediabetici bez rodinné anamnézy DM2 (K)</b>	<b>ženy (F) (n = 75)</b>	<b>muži (M) (n = 41)</b>	<b>celkem (n = 116)</b>
věk (roky)	32,3±11,41	29,0±7,29	31,1±10,26
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23,2±3,63	23,1±2,87	23,2±3,38

průměr±SD

Tab. 2b): Přehled a základní charakteristiky souborů, u kterých byl stanoven polymorfismus -30G>A v B-promotoru GCK genu

<b>diabetici 2. typu (DM2)</b>	<b>ženy (F) (n = 213)</b>	<b>muži (M) (n = 126)</b>	<b>celkem (n = 339)</b>
věk (roky)	59,5±8,58	60,9±8,00	60,0±8,38
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	31,8±5,47	29,7±4,44	31,0±5,20
<b>gestační diabetičky (G)</b>	<b>ženy (F) (n = 165)</b>	<b>muži (M) (n = 0)</b>	<b>celkem (n = 165)</b>
věk (roky)	32,9±5,75		32,9±5,75
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25,4±4,99		25,4±4,99
<b>nediabetici s rodinnou anamnézou DM2 (PD)</b>	<b>ženy (F) (n = 89)</b>	<b>muži (M) (n = 52)</b>	<b>celkem (n = 141)</b>
věk (roky)	37,9±12,59	40,5±9,62	38,8±11,61
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24,8±4,02	26,6±4,29	25,5±4,19
<b>nediabetici bez rodinné anamnézy DM2 (K)</b>	<b>ženy (F) (n = 180)</b>	<b>muži (M) (n = 81)</b>	<b>celkem (n = 261)</b>
věk (roky)	30,2±11,32	29,0±8,03	29,9±10,41
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23,0±4,09	23,8±2,82	23,3±3,76

průměr±SD

Tab. 2c): Přehled a základní charakteristiky souborů, u kterých byl stanoven polymorfismus A98V v HNF-1 $\alpha$  genu

<b>diabetici 2. typu (DM2)</b>	<b>ženy (F) (n = 139)</b>	<b>muži (M) (n = 96)</b>	<b>celkem (n = 235)</b>
věk (roky)	58,4±6,56	59,8±7,31	59,0±7,88
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	31,4±5,41	29,4±3,95	30,6±4,97
<b>gestační diabetičky (G)</b>	<b>ženy (F) (n = 194)</b>	<b>muži (M) (n = 0)</b>	<b>celkem (n = 194)</b>
věk (roky)	32,5±4,63		32,5±4,63
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24,3±4,91		24,3±4,91
<b>nediabetici bez rodinné anamnézy DM2 (K)</b>	<b>ženy (F) (n = 67)</b>	<b>muži (M) (n = 37)</b>	<b>celkem (n = 104)</b>
věk (roky)	31,6±10,88	28,8±7,68	30,6±9,91
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23,0±3,56	22,9±3,08	23,0±3,38

průměr±SD

## **11. METODY**

### **11.1 KLINICKO-BIOCHEMICKÉ METODY**

Byl kladen důraz na detailní charakterizaci studovaných souborů, neboť jsou a i nadále budou využívány pro širší studium genetického pozadí diabetu. U diabetiků 2. typu bylo provedeno základní antropometrické měření a komplexní biochemické vyšetření (tab. 3). Gestační diabetičky, potomci diabetiků a zdravé kontroly se kromě podrobného antropometrického a biochemického vyšetření podrobili i dvěma funkčním testům – tříhodinovému orálnímu glukózovému tolerančnímu testu (OGTT) a 15minutovému inzulinovému tolerančnímu testu (ITT).

Základní klinické vyšetření a funkční testy probíhaly v Endokrinologickém ústavu v Laboratoři funkčních testů vedené Doc. MUDr. Karlem Vondrou, DrSc. Pacient byl před každým testem vyšetřen lékařem. Lékař prověřil osobní anamnézu i aktuální zdravotní stav a poté rozhodl o provedení testu. Před zahájením vyšetření byl pacientovi změřen krevní tlak a zjištěna lačná glykemie. Před provedením inzulinového tolerančního testu bylo navíc provedeno EKG. Z funkčních testů jsou vyloučeny osoby, které mají diagnózu diabetu mellitu, srdeční choroby, cévní choroby, mají lačnou glykemii vyšší než 7 mmol/l nebo užívají léky ovlivňující sledované biochemické parametry.

#### **11.1.1 BIOCHEMICKÉ PARAMETRY**

Po nočním lačnění byly účastníkům studie odebrány vzorky periferní žilní krve a byly stanovovány následující biochemické parametry (tab. 3).

Tab. 3: Biochemické parametry stanovované po nočným lačnení

Parametr	Jednotky	Metoda stanovení	Norma EÚ
<b>sérové parametry</b>			
Glykemie	mmol/l	Glukózooxidázová metoda, Backman Glucose Analyzer 2	3,6-5,6
C-peptid	nmol/l	IRMA, Immunotech	0,3-0,9
Inzulín	mIU/l	IRMA, Immunotech	5-22
Proinzulín	pmol/l	ELISA, DRG Diagnostics, Germany	<10 nalačno
Glykovaný hemoglobín	%Hb	HPLC, BioRad Analyzer	2,9-5,8
Glykované proteíny	mmol/l	Spektrofotometrie NBT, Merck Vitalab Eclipse	< 1,6
Celkový cholesterol	mmol/l	Metoda CHOD-PAP, Merckotest, Merck Vitalab Eclipse	3,7-5,2
HDL-cholesterol	mmol/l	Metoda CHOD-PAP, Merck Systém Cholesterin, Merck Vitalab Eclipse	>1,2
LDL-cholesterol	mmol/l	Výpočet*	< 3,8
Triacylglyceroly	mmol/l	Metoda GPO-PAP, Merck Systém, Merck Vitalab Eclipse	0,68-1,85
Alaninaminotransferáza (ALT)	μkat/l	IFCC metoda s pyridoxal fosfátom, Cobas Integra, Roche Diagnostics	0,17-0,83
Aspartátaminotransferáza (AST)	μkat/l	IFCC metoda s pyridoxal fosfátom, Cobas Integra, Roche Diagnostics	0,16-0,62
Gamaglutamyltransferáza (GMT)	μkat/l	Kinetická metoda s gama glutamyl -3-karboxy-4-nitroanilidom, Cobas Integra, Roche Diagnostics	M: 0,17-1,1 F: 0,08-0,65
Kreatinín	mmol/l	Kinetická Jaffého kompenzovaná metoda, Cobas Integra, Roche Diagnostics	M: 62-106 F: 44-80
Urea	mmol/l	Kinetická metoda s ureázou a gutamátdehydrogenázou, Cobas Integra, Roche Diagnostics	M: 2,5-8,3 F: 2,0-6,9
Kyselina močová	μmol/l	Enzymatická kolorimetrická metoda s urikázou, Cobas Integra, Roche Diagnostics	M: 200-420 Ž: 140-340
Amyláza (AMS)	μkat/l	Fotometrická metoda s ethyliden G7 PNP, Cobas Integra, Roche Diagnostics	0,47-1,7
TSH	mIU/l	Elektrochemiluminiscence, Elecsys 2010, Hitachi-Boehringer Mannheim, Germany	0,27-4,2
Volný T3	pmol/l	Elektrochemiluminiscence, Elecsys 2010, Hitachi-Boehringer Mannheim, Germany	4,0-7,8

Parametr	Jednotky	Metoda stanovení	Norma EÚ
Volný T4	pmol/l	Elektrochemiluminiscence, Elecsys 2010, Hitachi-Boehringer Mannheim, Germany	13,0-23,0
Růstový hormon (STH)	mIU/l	IRMA, Immunotech	0-20
IGFI	ng/ml	IRMA, Immunotech	
Leptin	ng/ml	RIA, LINCO research	M: 2,0-5,6 F: 3,7-11,1
Adiponektin	ng/ml	ELISA, LINCO research	
Ghrelin	pg/ml	RIA, LINCO research	
Kortizol	nmol/l	RIA, vlastní metoda	135-607
Testosteron	nmol/l	RIA, vlastní metoda	M: 4,58-35,4 F: 0,4-3,0
SHBG	nmol/l	IRMA, Immunotech	M: 23-66 F: 43,2-95
DHEA-S	μmol/l	RIA, Immunotech	M: 0,25-16,1 F: 0,09-14,5 (s věkem klesá)
DHEA	nmol/l	RIA, Immunotech	záv. na věku
Androstendion	nmol/l	RIA, vlastní metoda	M: 1,75-8,6 F: 1,5-5,4
Lutropin	U/l	RIA, Immunotech	M: 0,5-10,0 F: záv. na cyklu
Folitropin	U/l	RIA, Immunotech	M: 2,0-10,0 F: záv. na cyklu
AntiGAD	U/ml	RIA, Cis-BIO	negat.
AntiIA2	U/ml	RIA, Medipan, Germany,	negat.
<b>plazmatické parametry:</b>			
Volné mastné kyseliny-celkové	mmol/l	Enzymatická kolorimetrická metoda ACS-ACOD, NEFA-C, WAKO, Vitalab Eclipse	0,1-0,6
Adrenalin	nmol/l	HPLC	0,1-0,8
Noradrenalin	nmol/l	HPLC	1,2-3,4
Glukagon	pmol/l	RIA, IBL	<60

\*LDL-cholesterol = celkový cholesterol-(triacylglyceroly/2,2)-HDL-cholesterol



### 11.1.2 ORÁLNÍ GLUKÓZOVÝ TOLERANČNÍ TEST

OGTT slouží k odkrytí manifestního diabetu mellitu a porušené glukóзовé tolerance (latentní diabetes mellitus). Nalačno je odebráno ~50 ml krve pro bazální vyšetření, poté dobrovolník vypije 75 g rozpuštěné glukózy a v půlhodinových intervalech pak je odebíráno po 3 ml krve. Krev je odebírána z kanyly zavedené v loketní jamce, která je ošetřena heparinovou zátkou. Odběry prováděné v 30minutových intervalech slouží k biochemickým vyšetřením (viz tab. 4). Před zahájením i po skončení testu je měřen krevní tlak a sledována aktuální glykemie. Vyšetření trvá 3 hodiny, uskutečňuje se vleže pod dozorem lékaře a k dispozici je dostatečný počet zdravotních sester. Po skončení tohoto testu je prováděno podrobné antropometrické vyšetření.

*Tab. 4: Parametry stanovované během OGTT*

0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
glykemie	glykemie	Glykemie	glykemie	glykemie	glykemie	glykemie
C-peptid	C-peptid	C-peptid	C-peptid	C-peptid	C-peptid	C-peptid
inzulin	inzulin	Inzulin	inzulin	inzulin	inzulin	inzulin
proinzulin		proinzulin				proinzulin
glukagon		Glukagon				glukagon
STH		STH		STH		

### 11.1.3 INZULINOVÝ TOLERANČNÍ TEST

ITT zjišťuje periferní účinnost inzulínu, tj. slouží k posouzení inzulínové senzitivity. Nalačno je vpíchnuto malé množství inzulínu do krve (0,1 U/kg hmotnosti) a v minutových intervalech je odebíráno malé množství krve ke zjištění glykemie. Krev je odebírána z kanyly zavedené v loketní jamce, která je ošetřena heparinovou zátkou. Před zahájením testu je provedeno EKG a změřen krevní tlak. Během testu je sledována klesající glykemie. Test trvá 15 minut a po jeho skončení je snižená hladina glukózy v krvi

normalizována příjmem potravy. Vyšetření probíhá vleže, individuálně, za přítomnosti lékaře a zdravotních sester. K provedení tohoto testu je nutné doporučení lékaře na základě vstupních vyšetření a zjištění osobní anamnézy. Celková délka testu i s normalizováním glykemie je obvykle 1,5–2 hodiny.

#### 11.1.4 INDEXY

Pro co nejlepší charakterizaci inzulínové senzitivity a funkce  $\beta$ -buněk pankreatu byla stanovena a zhodnocena řada parametrů, zejména odvozených od lačných či stimulovaných hodnot glykemie a inzulínemie, popisujících inzulínovou senzitivitu a funkci  $\beta$ -buněk (tab. 5).

**Tab. 5: Indexy k hodnocení inzulínové senzitivity a funkce  $\beta$ -buněk**

Index	Vzorec
<b>Funkce <math>\beta</math>-buněk</b>	
HOMA-F (mIU/mmol)	$20 \times I_0 / (G_0 - 3,5)$
Inzulínogenní index (mIU/mmol)	$(I_{30} - I_0) / (G_{30} - G_0)$
<b>Inzulínová rezistence</b>	
HOMA-R (mIU mmol l <sup>-2</sup> )	$I_0 \times G_0 / 22,5$
FIRI (mIU mmol l <sup>-2</sup> )	$I_0 \times G_0 / 25$
Suma I (mIU/l)	$I_0 + I_{60} + I_{120}$
<b>Inzulínová senzitivita</b>	
FGIR (mg/10 <sup>-4</sup> IU)	$G_0 / I_0$
Matsuda index (mmol <sup>-1</sup> mIU <sup>-1</sup> l <sup>2</sup> )	$10^4 / \sqrt{(\text{mean } I \times \text{mean } G \times G_0 \times I_0)}$
Cederholm index (kg mIU <sup>-1</sup> l)	$[75000 + (G_0 - G_{120}) \times 1,15 \times 180 \times 0,19 \times m] / [120 \times G_{\text{mean}} \times \log(I_{\text{mean}})]$
AUC-G/AUC-I	AUC-G/AUC-I
<b>Dispoziční index</b>	
DI	funkce $\beta$ -buněk x inzulínová senzitivita

### **11.1.5 ANTROPOMETRICKÉ MĚŘENÍ**

Bylo zjišťováno tělesné složení, tj. množství podkožního tuku, svalové hmoty a kostní hmoty na základě měření tělesné hmotnosti, 11 výškových měř, 12 šířkových měř, 14 obvodových měř a 14 kožních řas. Jedinec byl měřen ve spodním prádle. Měření se provádělo diskrétně, v uzavřené místnosti v přítomnosti měřitele (antropologa) a zapisovatele. Výsledky měření byly zpracovávány s laskavým svolením doc. RNDr. Pavla Bláhy, CSc., na katedře Antropologie a genetiky člověka PŘF UK pomocí programu ANTROPO (Bláha 1991).

## **11.2 MOLEKULÁRNĚ-GENETICKÉ METODY**

### **11.2.1 IZOLACE DNA**

Genomická DNA byla izolována z leukocytů nesrážlivé periferní krve (10 ml plné krve s 5 mmol/l K<sub>2</sub>-EDTA) fenol-chloroformovou metodou, precipitována etanolem a rozpuštěna v TE pufru. Později byl používán kit pro izolaci DNA z krve (NucleoSpin Blood kit, Macherey-Nagel, Germany). Po změření koncentrace a ověření čistoty (poměr absorbancí DNA 260 nm/proteiny 280 nm) byly roztoky DNA naředěny na pracovní koncentraci 10ng/μl a použity pro PCR amplifikace.

DNA je uchovávána pod kódem v DNA bance při -20 °C.

### **11.2.2 PCR AMPLIFIKACE**

Polymerázová řetězcová reakce (PCR = Polymerase Chain Reaction) je základní molekulárně-biologická metoda, která slouží k namnožení (amplifikaci) studovaného sekvenčního úseku DNA. K vybraným úsekům komplementárních vláken zdenaturované DNA vzorku nasedají krátké

syntetické oligonukleotidy – tzv. primery. Jejich 3' konce směřují proti sobě a ohraničují amplifikovanou oblast. In vitro syntéza daného úseku DNA nemůže začít de novo, ale probíhá od primerů připojováním volných nukleotidů (v reakční směsi jsou přítomny ve formě 2'-deoxynukleotid-5'-trifosfátů = dNTP's) pomocí enzymu DNA – dependentní DNA polymerázy. Syntéza probíhá ve směru 5'–3'. PCR je tvořena opakujícími se reakčními cykly, jejichž počet se u eukaryotického genomu pohybuje mezi 20–40 opakováními. Každý cyklus se skládá ze tří kroků, jež jsou charakterizovány různými teplotními požadavky:

- Tepelná denaturace dsDNA (double strand = dvouřetězcová DNA) při 94–96 °C po dobu 1–10 min.
- Vazba primerů (primer annealing) při specifické teplotě po dobu 30 s–2 min. (Teplota annealingu závisí na složení primerů, bývá v rozmezí 50–72 °C.)
- Extenze primerů (elongace) při teplotě 72 °C po dobu 1–3 min. V posledním cyklu se extenze prodlužuje na 5–15 min.

PCR reakce se provádí v cyklerech, které umožňují automatické opakování jednotlivých cyklů při požadované teplotě po daný čas. Při této práci byl použit cykler Tgradient 96 (Biometra).

Detekce výsledku PCR se provádí elektroforeticky v agarózovém gelu (Top-Bio) v 0,5x TBE (Tris-borát-EDTA) s přidaným ethidiumbromidem pod UV světlem o vlnové délce 310 nm (srovnává se s kontrolními pozitivními a negativními vzorky).

Konkrétní podmínky PCR jsou uvedeny níže u příslušných analýz.

### 11.2.3 RFLP ANALÝZA

Polymorfismus délky restričních fragmentů – RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism) – je metoda identifikace a charakterizace

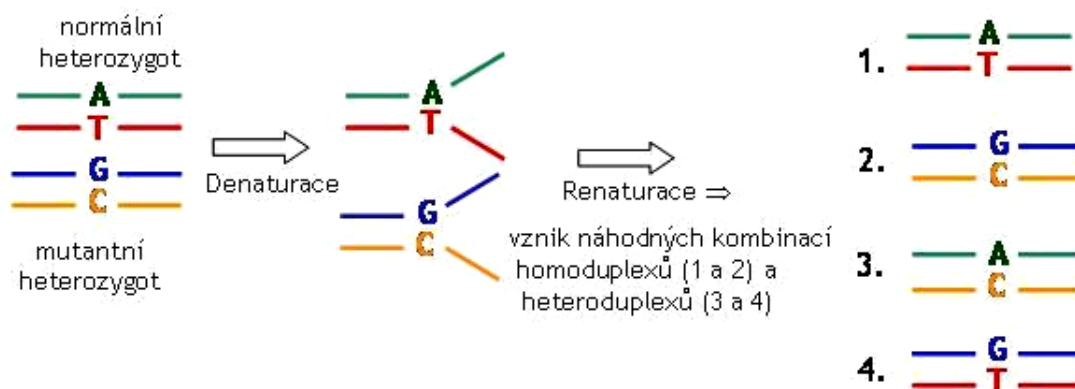
DNA pomocí jejího štěpení speciálními enzymy, tzv. restrikčními endonukleázami (RE) – izolovanými z bakteriálních kmenů, s následnou elektroforetickou analýzou produktů štěpení.

Tato technika je založena na schopnosti RE rozeznávat zcela konkrétní 4-8 nukleotidové sekvence (mohou být i delší) v DNA a jejich schopnosti v přesně určeném místě tyto sekvence rozštěpit. Znemožní-li mutace DNA štěpení v daném lokusu, nebo naopak vytvoří-li nové restrikční místo, vznikne variabilita restrikčních fragmentů v délce i v počtu. Každá RE má specifické reakční podmínky.

#### 11.2.4 TGGE ANALÝZA

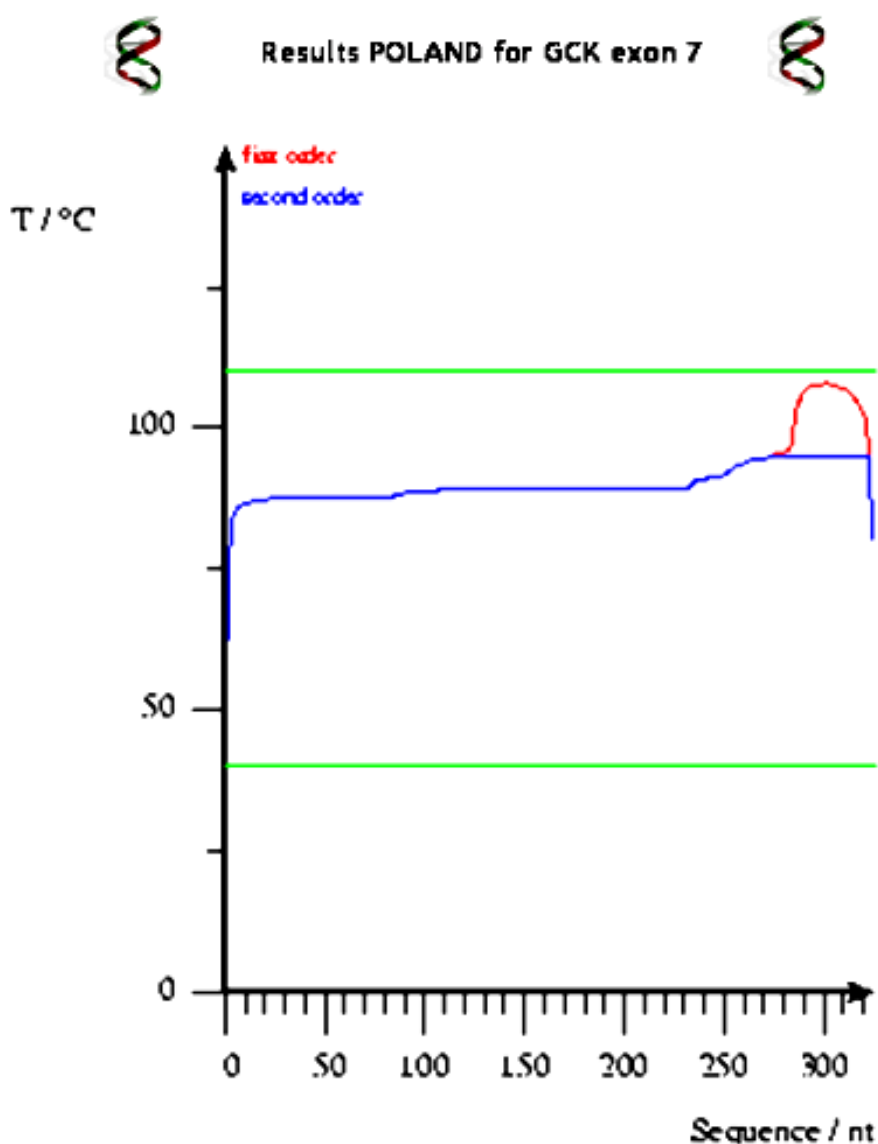
Teplotní gradientová gelová elektroforéza – TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) – je fyzikální scanovací metoda rozlišující mobilitu normálních a abnormálních heteroduplexů dsDNA, které vzniknou tepelnou denaturací a následnou renaturací PCR produktů (obr. 13). Je založena na rozdílných denaturačních vlastnostech DNA, dsDNA denaturuje (taje) v oddělených doménách. Tání domén závisí na nukleotidové sekvenci obou řetězců dsDNA. Tání řetězců dsDNA zpomaluje migraci DNA fragmentu v tepelném denaturačním gradientu (doména s nejnižší teplotou ovlivňuje migraci vzorku gelem nejvíce). Každá sekvence DNA má při elektroforetické separaci na denaturačním (7M močovina) polyakrylamidovém gelu různou mobilitu.

**Obr. 13: Vznik heteroduplexů**



Po optimalizaci všech reakčních podmínek lze pomocí TGGE odhalit i jednonukleotidovou záměnu. Optimalizace spočívá v navržení specifických primerů s GC clampem a ověření profilu tání výsledného DNA fragmentu pomocí programu POLAND (<http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/local/POLAND/poland.html>) (obr. 14). GC clamp slouží jako svorka, aby nedošlo k úplnému rozvolnění dsDNA při tepelné denaturaci během elektroforetické separace.

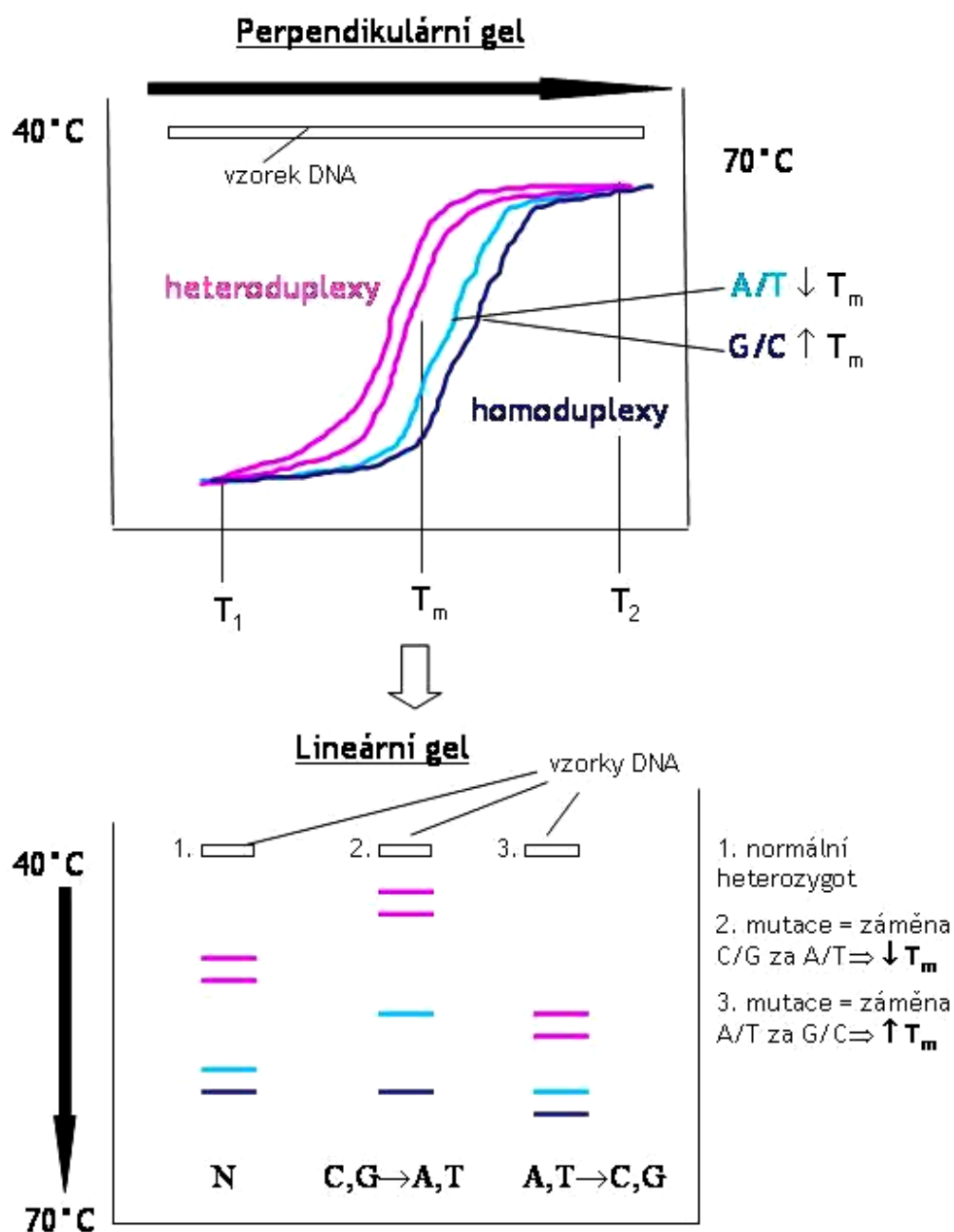
**Obr. 14: Optimální profil tání DNA fragmentu s připojeným GC clampem – výstup z programu POLAND**



Dále následuje optimalizace podmínek PCR reakcí a nalezení denaturačních teplot elektroforetické separace příslušných DNA fragmentů pomocí tzv. perpendikulárního gelu. Screening vzorků se provádí na lineárním gelu v příslušném tepelně-denaturačním rozmezí (obr. 15). Vizualizace fragmentů se provádí barvením  $\text{AgNO}_3$ .

TGGE se vyznačuje dobrou reprodukovatelností výsledků, protože pro jednotlivé mutace jsou vždy stejné, charakteristické vzorce „proužků“.

Obr. 15: TGGE: perpendikulární a lineární gel



Metodu jsme prováděli na přístroji TGGE MAXI (Biometra). Pozitivní kontrola byla použita v každém běhu. Vzorky, které vykazovaly abnormální mobilitu, byly dále analyzovány sekvenační metodou.

Pro některé lokusy (např. GC bohaté oblasti) nelze nalézt vhodné primery, které by ohraničovaly DNA fragment s vyhovujícím profilem tání. V takovýchto ojedinělých případech není tato metoda využitelná.

### **11.2.5 SSCP ANALÝZA**

Jednovláknový konformační polymorfismus – SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) – je jednoduchou, velice senzitivní a efektivní technikou k detekci jednonukleotidových změn v dané sekvenci DNA. Metoda je založena na principu různé rychlosti migrace ssDNA (single strand = jednořetězcová DNA) v nedenaturačním polyakrylamidovém gelu, která se liší terciární strukturou (konformací). Unikátní konformace jednovláknových fragmentů DNA, které vzniknou po tepelné denaturaci PCR produktů, je dána intramolekulárními interakcemi uvnitř DNA sekvence. Tato konformace je závislá na teplotě a iontové síle. Teplota při elektroforéze je klíčovým parametrem, který ovlivňuje kvalitu rozlišení DNA fragmentů. Proto se SSCP analýza provádí při dvou rozdílných teplotách – např. 7 °C a 22 °C. Optimální délka analyzovaných fragmentů je 150–250 bp.

Pro metodu SSCP byl použit přístroj ALFexpres II (Amersham Pharmacia Biotech), chlazení a udržování konstantní teploty zajišťovala přídatná externí chladicí jednotka (Amersham Biosciences). Primery byly značeny fluorescenční značkou Cy5.

### **11.2.6 SEKVENAČNÍ ANALÝZA**

Cílem sekvenování DNA je stanovení její primární struktury.

Prvním krokem enzymatické tzv. Sangerovy metody sekvenování je klasická PCR reakce, produkt se přečistí a následuje vlastní sekvenační reakce. Zde se využívá tzv. asymetrická PCR, kdy v reakci je pouze jeden primer. Cíleně se tak amplifikuje pouze požadovaný řetězec DNA. Kromě



standardních 2'-deoxynukleotid-5'-trifosfátů (dNTP's) se přidávají v přesném molárním poměru také modifikované nukleotidy ve formě 2',3'-dideoxynukleotid-5'-trifosfátů (ddNTP's). Tyto molekuly jsou do DNA též inkorporovány DNA polymerázou. Syntéza se zahájí z místa připojení primeru a ukončí se v místě, ve kterém se do rostoucího řetězce inkorporuje místo normálního dNTP jeho analog ddNTP. Ten působí jako inhibitor syntézy DNA, neboť neobsahuje 3'OH volnou skupinu a DNA-polymeráza k němu tudíž nemůže připojit další nukleotid.

Pokud laserové detekční zařízení je schopno rozeznávat jen jednu fluorescenční značku, používá se pro sekvenační PCR fluorescenčně značený primer. Reakce probíhá ve čtyřech mikrozkušnicích, vždy v přítomnosti jednoho ze čtyř ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP). Pokud sekvenátor je schopen analyzovat víc fluorescenčních značek, jsou ddNTP's fluorescenčně odlišeny a PCR lze provést v jedné zkumavce. Po sekvenační PCR vznikne série značených řetězců, jejichž délka závisí na relativní vzdálenosti příslušné báze od konce DNA. Tyto fragmenty jsou separovány na denaturačním (7M močovina) polyakrylamidovém gelu a jsou následně detekovány a z jejich pořadí je odečtena sekvence. K vyhodnocování slouží počítačový software.

### **11.2.7 SCREENING SEKVENČNÍCH VARIANT GCK GENU**

#### **TGGE:**

Prvním krokem pro zavedení TGGE analýzy bylo nalezení primerů s GC clampem, které by vymezovaly úsek DNA s vhodnou doménou tání. To se podařilo u exonů 1a-7 (tab. 6), pro exony 8-10 se vhodné primery nepodařilo navrhnout. Některé primery byly už dříve popsány (Stoffel et al. 1992), jiné byly navrženy pomocí programu OLIGO® (MedProbe).

Jednotlivé exony a přilehlé intronové oblasti byly amplifikovány metodou PCR v objemu 12  $\mu$ l: 20 ng genomické DNA, 0,1  $\mu$ M každého z obou primerů, 1-3 mM MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer) (tab. 6), 160  $\mu$ M dNTPs (Fermentas),

1x PCR Buffer (10x PCR Buffer, Perkin Elmer) dodávaný spolu s Taq DNA polymerázou (AmpliTaq Gold 5U/ $\mu$ l, Perkin Elmer); použito bylo 0,18 U enzymu.

Podmínky PCR reakce byly následující: denaturace při 95 °C 10 min, následovalo 35 cyklů denaturace při 95 °C 30 s, annealing při dané teplotě (viz tab. 6) 30 s, extenze při 72 °C 1 min a konečná extenze při 72 °C 10 min.

Čistota PCR produktů byla ověřována elektroforeticky na 1,5% agarózovém gelu. Gel byl obarven ethidiumbromidem a analyzován pod UV světlem.

Následovala denaturace PCR produktů přidáním 7M urey (v objemu 1:1) a zahřátím na 95 °C po dobu 5 min a následná renaturace a tvorba heteroduplexů pomalým ochlazováním ( $\Delta 1$  °C/30 s) na pokojovou teplotu.

TGGE podmínky: 8% polyakrylamidový denaturační gel (7M urea), 0,55x TBE pufr, teplotním gradient specifický pro daný exon (tab. 6), 300 V, 35 mA a 20 W po dobu 4 hodin.

Gely byly barveny stříbrem na automatickém zařízení (Hoefler automated gel stainer – Amersham Pharmacia Biotech).

Nejdříve byly pro každý exon nalezeny specifické podmínky tání – teplotní gradient – (tab. 6) pomocí perpendikulárního gelu.

**Tab. 6: TGGE primery, podmínky PCR amplifikace a teplotní gradient TGEE analýzy**

Exon	Primer (5' → 3')	MgCl <sub>2</sub> (mM)	T <sub>a</sub> (°C)	Teplotní gradient (°C)	Velikost PCR (bp)
1a	Forward: 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC GTC CAC TTC AGA AGC CTA CTG-3'* Reverse: 5'-TCA GAT TCT GAG GCT CAA AC-3'*	2	56	47-59	295
2	Forward: 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC GTG CAG ATG CCT GGT GAC AGC-3'* Reverse: 5'-CAC AGC TGC TTC TGG ATG AG-3'*	1,3	64	48-63	330
3	Forward: 5'-ACC CAG CCC AAG GCC AGC CTG TG-3' Reverse: 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC GGT GGC ACC TCC CGT CAG GAC TAG C-3'	3	69	50-60	337
4	Forward: 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CCG CCA GGT GTT GCA GTG TCC-3' Reverse: 5'-TGA AGG CAG AGT TCC TCT GG-3'*	1,5	64	46-56	341
5	Forward: 5'-TCC AGA TAT GTT AGC CAC GAG-3' Reverse: 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC GCC AAG GAG AAA GGC AGG CAG TG-3'	1	55	52-62	252
6	Forward: 5'-CCA GCA CTG CAG CTT CTG TG-3'* Reverse: 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CGA GCC TCG GCA GTC TGG AAG-3'*	3	67	50-60	216
7	Forward: 5'-AGT GCA GCT CTC GCT GAC AG-3'* Reverse: 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CCA TCT GCC GCT GCA CCA GAG-3'*	2	65	54-64	325

\* primery převzaté od Stoffel et al. 1992; modře vyznačen 40 bp GC clamp;  
T<sub>a</sub> = teplota annealingu primerů

Vzorky pak byly při daném teplotním gradientu analyzovány na lineárním gelu, v každém běhu byla použita pozitivní kontrola (tab. 7). Pozitivní kontroly nám laskavě poskytl Prof. J. Gräßler (Department of Internal Medicine III, University Clinic Carl Gustav Carus of the Technical University Dresden, Germany) a Prof. J.A. Maassen (Department of Molecular Cell Biology LUMC, Leiden University Medical Centre, The Netherlands).

Tab. 7: Pozitivní kontroly použití při TGGE a SSCP screeningu

Exon	Pozitivní kontrola
1a	A11T (31 G>A)
2	E40fsins20 R43fsinsC
3	Y108H (322T>C)
4	F150S (449T>C) V154fsdelTG IVS4+2del15
5	R186X (556C>T)
6	Y215Y (645C>T; homozygot) Y215Y (645C>T; heterozygot)
7	A259T (775G>A) G261R (781G>A)
8	C382Y (1145G>A) G299R (895G>C)
9	A384T (1150G>A) R392C (1174C>T) R403fsdelC IVS9+8T>C
10	V455E (1364T>A)

Vzorky, které vykazovaly abnormální mobilitu, byly obousměrně sekvenovány.

### **SSCP:**

Pro SSCP analýzu byly použity Cy5 fluorescenčně značené primery (tab. 8), které byly použity i pro sekvenaci. Některé primery byly už dříve popsány (Stoffel et al. 1992), jiné byly navrženy programem OLIGO® (MedProbe).

Jednotlivé exony a přilehlé intronové oblasti byly amplifikovány metodou PCR v objemu 12 µl: 20 ng genomické DNA, 0,1 µM každého z obou primerů, 1-2 mM MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer) (tab. 8), 160 µM dNTPs (Fermentas), 1x PCR Buffer (10x PCR Buffer, Perkin Elmer) dodávaný spolu s Taq DNA polymerázou (AmpliTaq Gold 5U/µl, Perkin Elmer); použito bylo 0,18 U enzymu.

Podmínky PCR reakce byly následující: denaturace při 95 °C 10 min, následovalo 35 cyklů denaturace při 95 °C 30 s, annealing při dané teplotě (tab. 8) 30 s, extenze při 72 °C 1 min a konečná extenze při 72 °C 10 min.

Čistota PCR produktů byla ověřována elektroforeticky na 1,5% agarózovém gelu. Gel byl obarven ethidiumbromidem a analyzován pod UV světlem.

**Tab. 8: SSCP primery, podmínky PCR amplifikace**

Exon	Primer (5' → 3')	MgCl <sub>2</sub> (mM)	T <sub>a</sub> (°C)	Velikost PCR (bp)
1a	Forward: Cy5 5'-TCA AAA GCT GTC CCC AGG TCA-3' Reverse: Cy5 5'-ATG GAA TGT TGG GGA CAG GCA-3'	1,5	61	491
2	Forward: Cy5 5'-GTG AGG CCC TCG GTG TGC AGA-3' Reverse: Cy5 5'-TCG GGC TGG CTG TGA GTC TGG-3'	1,5	60	362
3	Forward: Cy5 5'-TAA TAT CCG GCT TCA GTC ACC-3'* Reverse: Cy5 5'-CTG AGA TCC TGC ATG CCT TG-3'*	2	62	295
4	Forward: Cy5 5'-TAG CTT GGC TTG AGG CCG TG-3'* Reverse: Cy5 5'-TGA AGG CAG AGT TCC TCT GG-3'*	2	62	272
5	Forward: Cy5 5'-GCA GCC ACG AGG CCT ATC TC-3'* Reverse: Cy5 5'-GAG AAA GGC AGG CAG TGC TG-3'*	1,5	61	195
6	Forward: Cy5 5'-CAC CCA CCC CAG CAC TGC CTG-3' Reverse: Cy5 5'-AGG GAG CCT CGG CAG TCT GGA-3'	1,5	62	216
7	Forward: Cy5 5'-CGG GGC AGT GCA GCT CTC GCT-3' Reverse: Cy5 5'-CTC CCA TCT GCC GCT GCA CCA-3'	1,5	65	285
8	Forward: Cy5 5'-GCC CTC CCT CGT GCC TGC TGA-3' Reverse: Cy5 5'-TCG CCC TGA GAC CAA GTC TGC-3'	1	65	278
9	Forward: Cy5 5'-CCG CCG CTG GAG GGG GAT GGA-3' Reverse: Cy5 5'-GCG CGC TTT TTG GGC CCC ACT-3'	2	60	352
10	Forward: Cy5 5'-GTC GAC TGC GTG CAG GGC GC-3'* Reverse: Cy5 5'-TGT GGC ATC CTC CCT GCG CT-3'*	1,5	68	263

\* primery převzaté od Stoffel et al. 1992; T<sub>a</sub> = teplota annealingu primerů

Následovala denaturace PCR produktů přidáním 95% formamidu (v objemu 1:2,5) a zahřátím na 95 °C po dobu 4 min. Pak byly PCR produkty rychle zchlazeny (přendáním do ledové tříště), aby zdenaturovaná ssDNA znovu nerenaturovala na dsDNA.

SSCP podmínky: 6% nedenaturační polyakrylamidový gel, 1x TBE, každý běh byl puštěn při dvou rozdílných teplotách: 10 °C a 25 °C, 1200 V, 40 mA a 35 W po dobu 5 hodin (ALFexpress II, Amersham Pharmacia Biotech).

Vyhodnocení výsledků bylo provedeno softwarově (ALFwin Software, Amersham Pharmacia Biotech). V každém běhu byla použita pozitivní kontrola (tab. 7).

Vzorky, které vykazovaly přítomnost abnormálních píků, byly obousměrně sekvenovány.

### **SEKVENACE:**

Pro presekvenační PCR byly použity primery a podmínky amplifikace jako u SSCP (tab. 8). Čistota PCR produktů byla ověřována elektroforeticky na 1,5% agarózovém gelu (Tris-borát-EDTA). Gel byl obarven ethidiumbromidem a analyzován pod UV světlem.

Před vlastní sekvenační reakcí byly produkty presekvenační reakce přečištěny přes kolonky (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare).

Sekvenační PCR byla provedena kitem (GenomeLab DTCS-Quick Start Kit, Beckman): přečištěný PCR produkt byl amplifikován PCR reakcí v amplifikační směsi o celkovém objemu 20  $\mu$ l, která obsahovala 3,2 pmol sekvenačního primeru (vždy buď forward, nebo reverse), 4  $\mu$ l DTCS Quick Start Master Mix, 4,4  $\mu$ l PCR produktu a H<sub>2</sub>O do doplnění objemu.

Podmínky PCR reakce byly následující: 30 cyklů denaturace 96 °C 20 s, annealing 50 °C 20 s a extenze 60 °C 4 min.

Před vlastní sekvenační analýzou byly vzorky vysráženy etanolem podle postupu v kitu a rozpuštěny v H<sub>2</sub>O.

Sekvence byla provedena na přístroji ALFexpres II (Amersham Pharmacia Biotech). Vyhodnocení výsledků bylo provedeno softwarově (ALFwin Software, Amersham Pharmacia Biotech).

Pro potvrzení výsledků sekvenování byla vždy provedena sekvence také kompetitárního řetězce.

### **11.2.8 DETEKCE POLYMORFISMU -30G>A V B-PROMOTORU GCK GENU**

#### **RFLP:**

Pro nalezení pozitivní kontroly byla nejdříve použita metoda RFLP.

Segment se sledovaným polymorfismem byl amplifikován metodou PCR v objemu 15 µl: 20 ng genomické DNA, 0,1 µM každého z obou primerů, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer), 160 µM dNTPs (Fermentas), 1x PCR Buffer (10x PCR Buffer, Perkin Elmer) dodávaný spolu s Taq DNA polymerázou (AmpliTaq Gold 5U/µl, Perkin Elmer), použito bylo 0,225 U enzymu.

Podmínky PCR reakce byly následující: denaturace při 95 °C 10 min, následovalo 35 cyklů denaturace při 95 °C 20 s, annealing při 57 °C 30 s, extenze při 72 °C 1 min a konečná extenze při 72 °C 10 min.

Čistota PCR produktů byla ověřována elektroforeticky na 1,5% agarózovém gelu. Gel byl obarven ethidiumbromidem a analyzován pod UV světlem.

Použité primery: Forward 5'-TGC ATG GCA GCT CTA ATG AC-3' a Reverse: 5'-ATT CTC CTG CCA GGG CTT AC-3' (März et al. 2004).

Výsledný 107 bp dlouhý fragment byl štěpen restriční endonukleázou MwoI při 65 °C 12 hod: 10 µl PCR produktu, 7,7 µl H<sub>2</sub>O, 1x Buffer B7003S (10x Buffer B7003S, BioLabs) dodávaný spolu s MwoI (5U/µl, BioLabs), použito bylo 2,5 U enzymu.

V případě, že vzorek obsahuje alelu G, dochází ke štěpení fragmentu na dva o velikosti 82 bp a 25 bp. Minoritní alela A ruší restriční místo, fragment o 107 bp zůstává nerozštěpen.

Produkty štěpení byly detekovány pomocí ethidiumbromidu pod UV světlem po horizontální elektroforéze v 3% agarózovém gelu (MetaPhor® Agarose, Cambrex Bio Science).

Po nalezení všech genotypů – GG, GA a AA– byla pro screening použita metoda SSCP, která je levnější, rychlejší a umožňuje analýzu většího množství vzorků najednou.

**SSCP:**

Segment se sledovaným polymorfismem byl amplifikován metodou PCR v objemu 12  $\mu$ l: 20 ng genomické DNA, 0,1  $\mu$ M každého z obou primerů, 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer), 160  $\mu$ M dNTPs (Fermentas), 1x PCR Buffer (10x PCR Buffer, Perkin Elmer) dodávaný spolu s Taq DNA polymerázou (AmpliTaq Gold 5U/ $\mu$ l, Perkin Elmer); použito bylo 0,18 U enzymu.

Podmínky PCR reakce byly následující: denaturace při 95 °C 10 min, následovalo 35 cyklů denaturace při 95 °C 20 s, annealing při 58 °C 30 s, extenze při 72 °C 1 min a konečná extenze při 72 °C po min.

Použité primery značené Cy5: Forward 5'-Cy5-CAA GGC GAT TGA GTG GTC ACC ATG-3', Reverse: 5'-Cy5-GAC TGT GTC TCT CAC ATC CTA GCC-3' (Rissanen et al. 1998).

Čistota PCR produktů o velikosti 259 bp byla ověřována elektroforeticky na 1,5% agarózovém gelu. Gel byl obarven ethidiumbromidem a analyzován pod UV světlem.

Následovala denaturace PCR produktů přidáním 95% formamidu (v objemu 1:2,5) a zahřátím na 95 °C po dobu 4 min. Pak byly PCR produkty rychle zchlazeny (přendáním do ledové tříště), aby zdenaturovaná ssDNA znovu nerenaturovala na dsDNA.

SSCP podmínky: 6% nedenaturační polyakrylamidový gel, 1x TBE, 22 °C, 1200 V, 40 mA a 35 W po dobu 5 hodin (ALFexpress II, Amersham Pharmacia Biotech).

Vyhodnocení výsledků bylo provedeno softwarově (ALFwin Software, Amersham Pharmacia Biotech). V každém běhu byly použity pozitivní kontroly v podobě vzorků se známými genotypy GG, GA a AA.



### **11.2.9 DETEKCE POLYMORFISMU A98V (292C>T) V HNF-1 $\alpha$ GENU**

#### **RFLP:**

Segment se sledovaným polymorfismem byl amplifikován metodou PCR v objemu 15  $\mu$ l: 20 ng genomické DNA, 0,1  $\mu$ M každého z obou primerů, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer), 160  $\mu$ M dNTPs (Fermentas), 1x PCR Buffer (10x PCR Buffer, Perkin Elmer) dodávaný spolu s Taq DNA polymerázou (AmpliTaq Gold 5U/ $\mu$ l, Perkin Elmer), použito bylo 0,225 U enzymu.

Podmínky PCR reakce byly následující: denaturace při 95 °C 10 min, následovalo 35 cyklů denaturace při 95 °C 20 s, annealing při 65 °C 30 s, extenze při 72 °C 1 min a konečná extenze při 72 °C 10 min.

Čistota PCR produktů byla ověřována elektroforeticky na 1,5% agarózovém gelu. Gel byl obarven ethidiumbromidem a analyzován pod UV světlem.

Použité primery byly navrženy programem OLIGO<sup>®</sup> (MedProbe): Forward 5'-GGG AGG CGG CTA GCG TGG TGG AC-3' a Reverse: 5'-GAA GAC TCA ACT CAG GGG TAC T-3'.

Výsledný 474 bp dlouhý fragment byl štěpen restriční endonukleázou Avall při 37 °C 12 hod: 10  $\mu$ l PCR produktu, 7,7  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 1x Buffer Y<sup>+</sup>/Tango<sup>™</sup> (10x Buffer Y<sup>+</sup>/Tango<sup>™</sup> with BSA, Fermentas) dodávaný spolu s Avall (10U/ $\mu$ l, Fermentas), použito bylo 2,5 U enzymu.

Záměna valinu za alanin (292C>T) vytváří nové restriční místo, dochází ke štěpení fragmentu na dva o velikosti 129 bp a 345 bp. Pokud vzorek obsahuje na 292. kodónu cytosin (kóduje alanin), ke štěpení nedochází.

Produkty štěpení byly detekovány pomocí ethidiumbromidu pod UV světlem po horizontální elektroforéze v 1,5% agarózovém gelu (Top-Bio).

### **11.3 STATISTICKÉ METODY**

Statistická analýza byla provedena programem NCSS 2004 (Statistical Solutions, Saugus, MA, USA).

#### **11.3.1 CHARAKTERIZACE SOUBORŮ**

Biochemické a antropometrické parametry u jednotlivých souborů byly nejdříve popsány pomocí deskriptivní statistiky, vždy byl uveden průměr a směrodatná odchylka daného znaku. Parametry u souborů gestačních diabetiček a zdravých jedinců s rodinnou anamnézou DM2 byly porovnány s parametry zdravých jedinců bez rodinné anamnézy DM2. Antropometrické parametry a HDL-cholesterol mají jiné referenční rozmezí pro jednotlivá pohlaví, proto byly hodnoceny zvlášť u mužů a zvlášť u žen. Byl použit neparametrický Mann-Whitneyův test. Vzhledem ke statisticky významnému rozdílu věku a BMI mezi jednotlivými soubory a k závislosti sledovaných parametrů na těchto základních charakteristikách byla k dalšímu hodnocení použita analýza kovariance (ANCOVA) s adjustací na věk a BMI. BMI bylo adjustováno na věk.

#### **11.3.2 FREKVENČNÍ ANALÝZA**

Nejdříve jsme zjistili, zda frekvenční rozložení jednotlivých variant polymorfismů odpovídá Hardy-Weinbergově rovnováze (HWE). Zjištěné genotypové frekvence v jednotlivých souborech byly porovnány s očekávanými frekvencemi pomocí chí-kvadrát testu ( $\chi^2$ -test) (<http://www.genes.org.uk/software/hardy-weinberg.shtml>).

Pak byla četnost výskytu jednotlivých genotypů polymorfismů mezi soubory vzájemně porovnána. Srovnání bylo založeno na příslušné kontingenční tabulce a chí-kvadrát testu (<http://math.hws.edu/javamath/>

ryan/ChiSquare.html). U souborů, kdy byl počet minoritní varianty polymorfismu příliš malý (<5), byl použit Fisherův exaktní test (<http://home.clara.net/sisa/fiveby2.htm>).

### **11.3.3 HODNOCENÍ VLIVU POLYMORFISMU**

Bylo zjišťováno, zda se od sebe statisticky významně liší nositelé jednotlivých variant polymorfismu v antropometrických nebo biochemických parametrech v rámci daných souborů. Každý hodnocený soubor byl rozdělen do skupin v závislosti na variantě sledovaného polymorfismu. Tyto skupiny byly poté mezi sebou srovnávány pomocí kovarianční analýzy s adjustací na věk a BMI. Tam, kde to hodnocený parametr vyžadoval, byli muži a ženy hodnoceni odděleně.

## 12. VÝSLEDKY

### 12.1 CHARAKTERIZACE SOUBORŮ

Biochemické a antropometrické parametry u DM2 byly popsány deskriptivní statistikou (tab. 9) pomocí programu NCSS 2004.

Tab. 9: Charakterizace souboru DM2

	DM2 (ženy / muži) (n=213; n=126; Σ=339)
věk (roky)	59,5±8,58 / 60,9±8,00
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	31,8±5,47 / 29,7±4,44
obvod břicha (cm)	107,1±14,34 / 109,3±12,67
WHR (poměr pas/boky)	0,88±0,070 / 0,97±0,061
triglyceridy (mmol/l)	2,1±2,04
celkový cholesterol (mmol/l)	6,0±1,29
HDL cholesterol (mmol/l)	1,5±0,37 / 1,2±0,36
LDL cholesterol (mmol/l)	3,8±1,16
celkové volné mastné kyseliny (mmol/l)	510,9±178,00
% SFA	38,5±4,15
% MUFA	43,5±4,90
% PUFA	18,3±4,49
bazální glykemie (mmol/l)	8,6±3,17
bazální C peptid (nmol/l)	0,95±0,552
bazální inzulin (mIU/l)	15,8±12,24
glykované proteiny (mmol/l)	1,5±0,34
kyselina močová (mmol/l)	336,6±78,04
HOMA-R (mIU mmol <sup>-2</sup> )	6,13±3,37
HOMA-F (mIU/mmol)	88,1±89,78

průměr±SD

SFA (*saturated fatty acids*) = nasycené mastné kyseliny

MUFA (*mono unsaturated fatty acids*) = mononenasycené mastné kyseliny

PUFA (*poly unsaturated fatty acids*) = polynenasycené mastné kyseliny

Biochemické a antropometrické parametry gestačních diabetiček (tab. 10) a potomků diabetiků (tab. 11) byly porovnávány s parametry u kontrolního souboru Mann-Whitneyovým testem. Vzhledem ke statisticky významnému rozdílu věku a BMI u jednotlivých souborů byla k dalšímu

hodnocení použita analýza ANCOVA s adjustací na věk a BMI. Data byla zpracována programem NCSS 2004.

**Tab. 10: Charakterizace a porovnání souborů G a K**

	<b>G</b> (ženy) (n=194)	<b>K</b> (ženy) (n=180)	<b>ANCOVA</b> (adjustace na věk, BMI) <b>p</b>
věk (roky)	32,9±5,75	30,2±11,32	0,000 <sup>a)</sup>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25,1±4,22	23,2±4,22	0,000 <sup>b)</sup>
% podkožního tuku	26,4±4,91	25,3±4,92	0,135
obvod břicha (cm)	82,5±4,29	80,6±4,29	0,001
WHR	0,76±0,045	0,73±0,045	0,000
triglyceridy (mmol/l)	1,0±0,60	1,0±0,61	0,757
celkový cholesterol (mmol/l)	4,5±0,82	4,6±0,82	0,414
HDL cholesterol (mmol/l)	1,5±0,35	1,6±0,35	0,502
LDL cholesterol (mmol/l)	2,5±0,74	2,6±0,74	0,615
celkové volné mastné kyseliny (mmol/l)	488,9±182,85	482,0±182,88	0,864
% SFA	38,3±5,72	38,0±5,87	0,854
% MUFA	42,2±6,25	39,4±6,27	0,042
% PUFA	19,5±4,82	22,6±4,82	0,004
bazální glykemie (mmol/l)	4,9±0,90	4,6±0,90	0,025
glykemie v 30 min OGTT (mmol/l)	7,5±1,29	6,9±1,29	0,001
glykemie v 60 min OGTT (mmol/l)	7,1±1,67	6,2±1,67	0,001
glykemie v 120 min OGTT (mmol/l)	5,5±1,36	4,8±1,37	0,000
Σglykemie při OGTT (mmol/l)	39,7±6,37	36,0±6,40	0,000
bazální C-peptid (nmol/l)	0,68±0,241	0,64±0,240	0,253
ΣC-peptidu při OGTT (nmol/l)	14,5±4,51	14,0±4,51	0,489
bazální inzulin (mIU/l)	8,5±6,05	7,2±6,04	0,146
Σinzulinu při OGTT (mIU/l)	242,9±178,03	196,7±178,03	0,110
glykované proteiny (mmol/l)	1,1±0,15	1,1±0,14	0,327
kyselina močová (mmol/l)	239,1±54,76	239,1±54,74	0,999
HOMA-R (mIU mmol l <sup>-2</sup> )	2,0±1,47	1,5±1,46	0,044
HOMA-F (mIU/mmol)	131,2±11,28	146,4±111,075	0,339
Cederholm index (kg mIU <sup>-1</sup> l)	70,9±20,85	79,7±20,81	0,008
Matsuda index (mmol <sup>-1</sup> mIU <sup>-1</sup> l <sup>2</sup> )	177,2±88,94	188,8±89,02	0,423
Inzulinogenní index (mIU/mmol)	25,3±29,02	19,8±29,09	0,215

průměr±SD

tučně jsou vyznačeny statisticky významné rozdíly,  
a) Mann-Whitney test; b) BMI adjustováno na věk

Tab. 11: Charakterizace a porovnání souborů PD a K

	PD (ženy / muži) (n=89; n=52; Σ=141)	K (ženy/muži) (n=180; n=81; Σ=261)	ANCOVA (adjustace na věk, BMI) p
věk (roky)	37,9±12,59 / 40,5±9,62	30,2 ±11,32 / 29,0±8,03	0,000 / 0,000 <sup>a)</sup>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24,2±3,75 / 25,8±3,30	23,3±3,76 / 24,3±3,30	0,113 / 0,033 <sup>b)</sup>
% podkožního tuku	25,6±5,33 / 16,4±4,89	25,1±5,32 / 16,7±4,89	0,522 / 0,767
obvod břicha (cm)	81,6±4,76 / 88,97±4,34	80,6±4,75 / 88,7±4,05	0,125 / 0,816
WHR	0,75±0,047 / 0,87±0,039	0,74±0,047 / 0,85±0,039	0,053 / 0,076
triglyceridy (mmol/l)	1,2±0,61	1,1±0,60	0,179
celkový cholesterol (mmol/l)	4,6±0,83	4,6±0,83	0,836
HDL cholesterol (mmol/l)	1,5±0,34 / 1,2±0,29	1,6±0,34 / 1,3±0,29	0,245 / 0,329
LDL cholesterol (mmol/l)	2,7±0,73	2,6±0,74	0,576
celkové volné mastné kyseliny (mmol/l)	458,6±171,51	481,9±181,77	0,365
% SFA	38,8±5,67	38,0±5,98	0,386
% MUFA	41,0±5,91	39,6±6,27	0,113
% PUFA	20,2±4,37	22,4±4,63	0,001
bazální glykemie (mmol/l)	4,8±0,45	4,6±0,44	0,029
glykemie v 30 min OGTT (mmol/l)	7,7±1,28	7,2±1,31	0,003
glykemie v 60 min OGTT (mmol/l)	7,0±1,81	6,6±1,76	0,060
glykemie v 120 min OGTT (mmol/l)	5,1±1,37	4,8±1,37	0,072
Σglykemie při OGTT (mmol/l)	38,5±6,26	36,9±6,25	0,027
bazální C-peptid (nmol/l)	0,65±0,229	0,62±0,226	0,225
ΣC-peptidu při OGTT (nmol/l)	14,5±4,51	13,8±4,51	0,182
bazální inzulin (mIU/l)	7,9±3,88	6,7±3,87	0,006
Σinzulinu při OGTT (mIU/l)	218,6±142,24	185,2±142,22	0,061
glykované proteiny (mmol/l)	1,1±0,12	1,1±0,13	0,150
kyselina močová (mmol/l)	272,5±76,34	270,8±76,32	0,852

průměr±SD

tučně jsou vyznačeny statisticky významné rozdíly,  
a) Mann-Whitneyův test; b) BMI adjustováno na věk

	PD (ženy / muži) (n=89; n=52; Σ=141)	K (ženy/muži) (n=180; n=81; Σ=261)	ANCOVA (adjustace na věk, BMI) p
HOMA-R (mIU mmol l <sup>-2</sup> )	1,7±0,87	1,4±0,86	0,002
HOMA-F (mIU/mmol)	195,1±118,27	126,9±117,31	0,122
Cederholm index (kg mIU <sup>-1</sup> l)	74,0±21,26	78,2±21,27	0,109
Matsuda index (mmol <sup>-1</sup> mIU <sup>-1</sup> l <sup>2</sup> )	187,3±99,01	192,6±99,02	0,665
Inzulinogenní index (mIU/mmol)	20,5±38,05	18,4±38,07	0,653

průměr±SD

tučně jsou vyznačeny statisticky významné rozdíly

I když u žen, u nichž byl v těhotenství diagnostikován gestační diabetes, došlo po porodu k úpravě glukóзовé tolerance, zjistili jsme u nich statisticky významně zvýšenou hladinu lačné glykemie ( $p = 0,025$ ) i stimulovaných hodnot glykemie během OGTT ( $p = 0,000$ ), přesto se hodnoty glykemie pohybovaly v normálním fyziologickém rozmezí. Zjištěná vyšší lačná i stimulovaná sekrece inzulínu nedosáhla statistické významnosti a pravděpodobně slouží k udržení glykemie v normálním rozmezí. Zjistili jsme, že gestační diabetičky měly sníženou inzulínovou senzitivitu (Cederholm index,  $p = 0,008$ ), resp. zvýšenou inzulínovou rezistenci (HOMA R,  $p = 0,044$ ). Nicméně funkce  $\beta$ -buněk byla dosud dobře zachována (HOMA F, inzulinogenní index) (tab. 10).

Oproti kontrolní populaci měly gestační diabetičky větší obvod břicha a WHR. V lipidovém spektru vykazovaly nižší procento polynenasycených a naopak překvapivě vyšší procento mononenasycených mastných kyselin (tab. 10).

Také u potomků DM2 byla zjištěna statisticky významně zvýšená hladina lačné glykemie ( $p=0,029$ ) i stimulovaných hodnot glykemie během OGTT ( $p = 0,027$ ), ale také zvýšená hladina lačné sekrece inzulínu ( $p = 0,006$ ), která pravděpodobně udržuje hodnoty glykemie v normálním fyziologickém rozmezí. Sekrece inzulínu během OGTT byla výrazně vyšší, ale toto zvýšení bylo na hranici statistické významnosti ( $p = 0,061$ ). Potomci diabetiků měli

zvýšenou inzulinovou rezistenci (HOMA R,  $p = 0,002$ ), ale dosud dobře zachovanou funkci  $\beta$ -buněk (HOMA F, inzulinogenní index) (tab. 11).

V lipidovém spektru vykazovali potomci DM2 nižší procento polynenasycených mastných kyselin. V antropometrických parametrech nebyly shledány žádné statisticky významné rozdíly oproti kontrolní populaci (tab. 11).

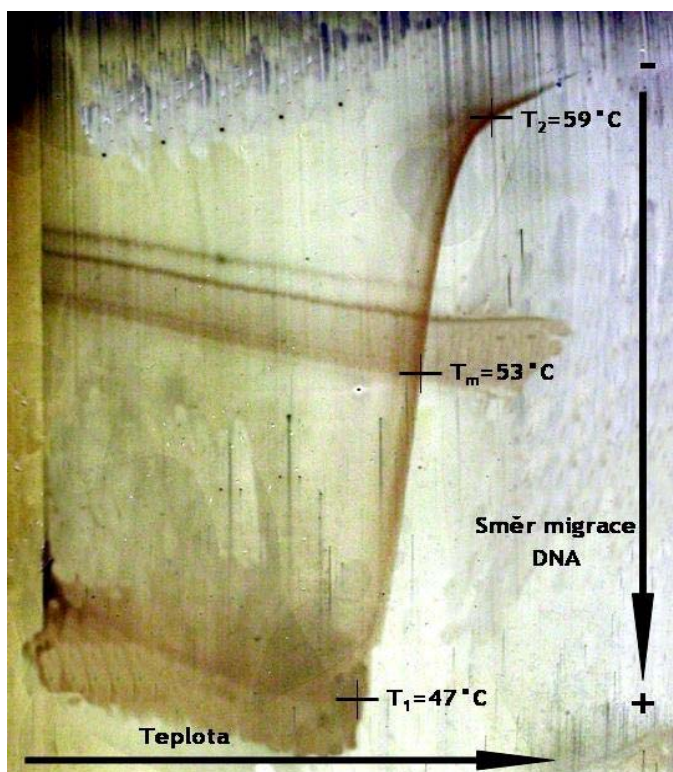
## 12.2 SCREENING SEKVENČNÍCH VARIANT V GENU PRO GCK

### 12.2.1 ZAVEDENÍ METODY TGGE

Pro exony 1a-7 genu pro GCK byly navrženy primery s GC clampem, které vymezovaly úsek DNA s vhodnou doménou tání (tab. 6). Pro exony 8–10 se nepodařilo vyhovující primery navrhnout.

Po navržení vhodných primerů byl nejdříve pomocí perpendikulárního gelu (obr. 16) určen profil tání pro daný DNA fragment (tab. 6).

**Obr. 16:** Ukázka perpendikulárního gelu TGGE – exon 1a genu pro GCK

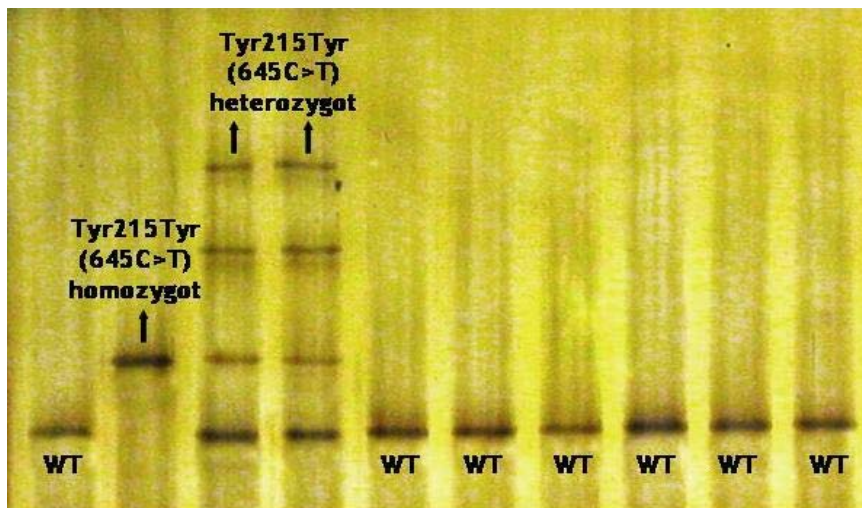




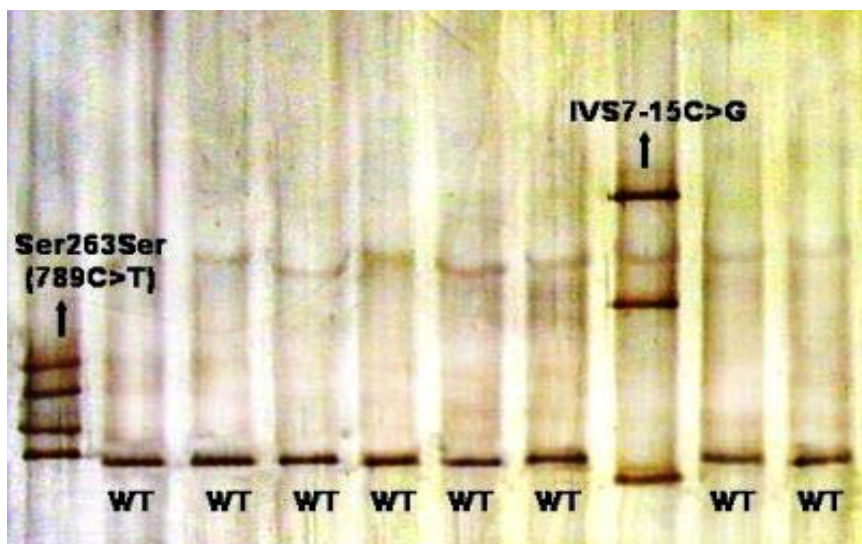
Následovala analýza vzorků na lineárním gelu (obr. 17) za použití specifického teplotního gradientu (tab. 6).

*Obr. 17: Ukázka lineárního gelu TGGE:*

*a) exon 6 genu pro GCK*



*b) exon 7 genu pro GCK*



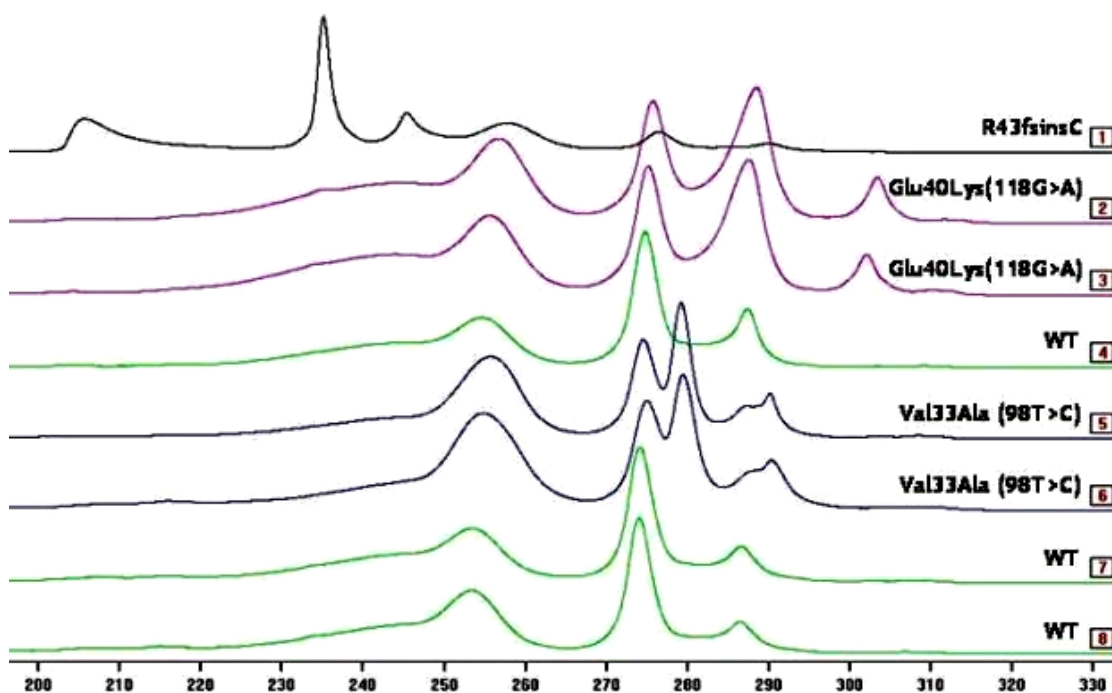
Vzorky, které vykazovaly abnormální mobilitu a vznik heteroduplexů při TGGE, byly následně obousměrně sekvenovány.

### 12.2.2 ZAVEDENÍ METODY SSCP

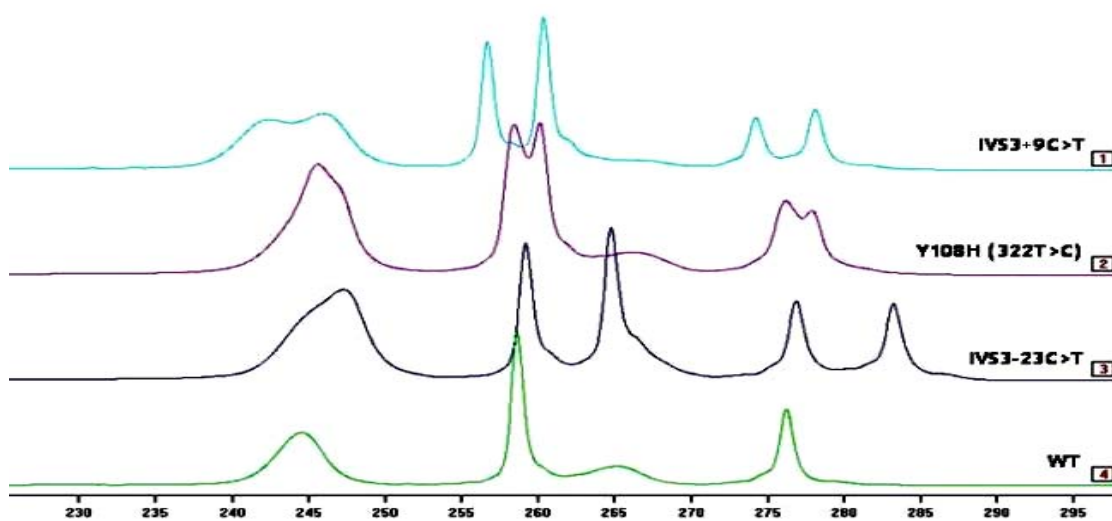
SSCP analýza byla použita pro všechny exony *GCK* genu. Na obr. 18 jsou uvedeny ukázky počítačového vyhodnocení SSCP analýzy exonů 2 a 3.

**Obr. 18: Ukázka vyhodnocení SSCP:**

**a) exon 2 genu pro *GCK* při  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$**



**b) exon 3 genu pro *GCK* při  $T = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$**



Vzorky, u kterých byly detekovány abnormální píky při SSCP, byly následně obousměrně sekvenovány.

### **12.2.3 POROVNÁNÍ OBOU SCREENINGOVÝCH METOD**

Vzorky, které vykazovaly abnormální mobilitu při TGGE, byly shledány jako pozitivní i při SSCP. Shoda v detekci pozitivních nálezů mezi oběma screeningovými metodami dosáhla 100 %.

### **12.2.4 SEKVENACE GCK GENU**

Pro potvrzení nalezených sekvenčních variant byla provedena sekvenace v obou směrech. Nelezené sekvenční varianty v genu pro GCK jsou uvedeny v následující tabulce (tab. 12).

Ve 12 rodinách s neurčeným typem MODY byly nalezeny dvě mutace a jedna záměna v intronové oblasti.

Mezi ostatními identifikovanými sekvenčními variantami *GCK* genu byly dva dříve popsané polymorfismy v exonu 6 (Tyr215Tyr) a v exonu 7 (Ser263Ser) a heterozygotní záměny v intronových oblastech genu (viz tab. 12).

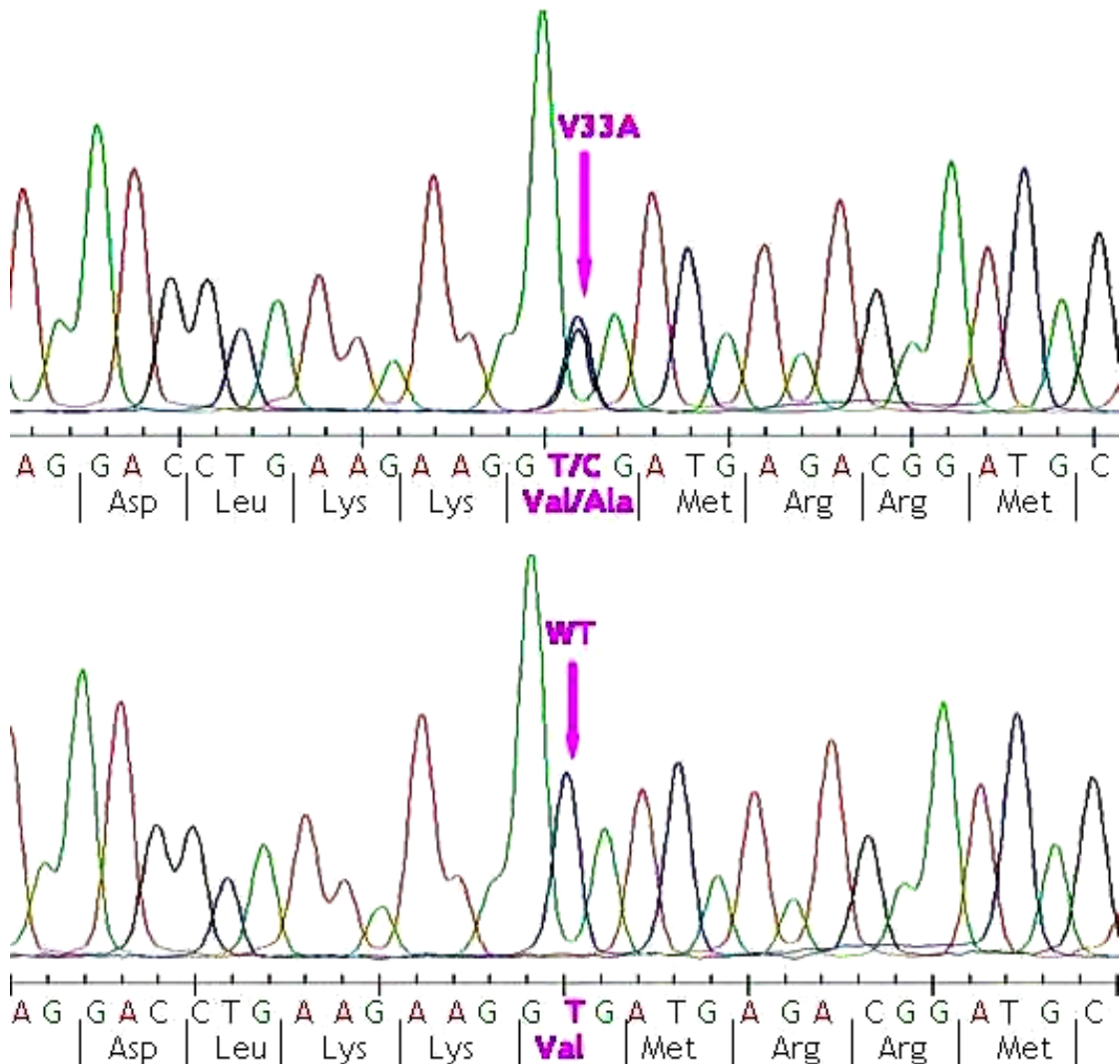
Vzhledem k relativně nízkému zastoupení jednotlivých sekvenčních variant jsme nemohli statisticky porovnat nositele těchto variant s nositeli normálního (wild-type; WT) genu. Proto nelze hodnotit případný dopad jednotlivých záměn na fenotyp.

Tab. 12: Sekvenční varianty GCK genu v české diabetické a nediabetické populaci

mutace / polymorfismus (počet jedinců)					
GCK	MODY (n=12 pacientů + 10 příbuzných)	DM2 (n=313)	G (n=141)	PD (n=130)	K (n=116)
exon 1a		IVS1+4T>A / (n=1)	IVS1+4T>A / (n=1)	IVS1+4T>A / (n=1)	
exon 2	Val33Ala (98T>C) / (1+1) Glu40Lys (118G>A) / (1+1)	IVS2-12 C>T / (n=3)	IVS2+1G>A / (n=1)	IVS2-12 C>T / (n=1)	IVS2-12 C>T / (n=2)
exon 3			IVS3+9C>T / (n=1)		IVS3-23C>T / (n=2)
exon 4	IVS4+87C>A (n=2) IVS4+87C>A hom. (n=1)				IVS4+26C>A (n=1)
exon 5					
exon 6		Tyr215Tyr (645C>T) / (n=2)	Tyr215Tyr (645C>T) / (n=2)	Tyr215Tyr (645C>T) / (n=1)	Tyr215Tyr (645C>T) / (n=1)
exon 7		Ser263Ser (789C>T) / (n=1) IVS7-15C>G / (n=1)			
exon 8		IVS8+18G>A / (n=2)	IVS8+18G>A / (n=2)		
exon 9	IVS9+8T>C (33,3%)	IVS9+8T>C / (31%); IVS9+49G>A / (7,3%); IVS9+8T>C + IVS9+49G>A / (1,7%)	IVS9+8T>C / (24,5%); IVS9+49G>A / (9,2%); IVS9+8T>C + IVS9+49G>A / (5,1%)	IVS9+8T>C / (33,3%); IVS9+49G>A / (11,9%); IVS9+8T>C + IVS9+49G>A / (2,4%)	IVS9+8T>C / (35,5%); IVS9+49G>A / (13,1%); IVS9+8T>C + IVS9+49G>A / (0,9%)
exon 10					

První nalezenou mutací byla dosud nepopsaná heterozygotní missense mutace V33A (záměna alaninu za valin) (98T>C) v exonu 2 genu pro GCK u základního pacienta s MODY (obr. 19).

**Obr. 19: Nová mutace V33A v GCK genu**



Jednalo se o 12letého chlapce, u něhož byla zvýšená glykemie náhodně diagnostikována už ve věku 10 měsíců. Tento pacient měl mírnou lačnou hyperglykemií a mírně zvýšený glykovaný hemoglobin. Ostatní biochemické parametry byly v normálním fyziologickém rozmezí (tab. 13a). Během OGTT byla opět naměřena lačná hyperglykemie a hladina glykemie ve 120. minutě byla na spodní hranici porušené glukózové tolerance (PGT) (tab. 13b).

Negativní protilátky (GADA, ICA a IA2) a zachovaná dostatečná inzulinová sekrece během první fáze ivGTT (intravenózní glukózový toleranční test) (tab. 13c) svědčí o oprávněnosti vyloučení DM1, MODY1 i MODY3.

Genetickou analýzu cílenou na exon 2 *GCK* genu jsme provedli také u pacientovy matky a mladšího bratra. Jeho matka měla diagnostikovaný gestační diabetes a po porodu nedošlo k úpravě glukózové tolerance. Dosud byla léčena jako diabetik 2. typu. I ona byla nositelkou heterozygotní mutace V33A. U mladšího bratra základního pacienta nebyla daná mutace prokázána. Chlapcův dědeček z matčiny strany je léčen na DM2, genetickou diagnostiku však odmítl.

**Tab. 13: a) Základní klinický a biochemický profil pacienta s mutací V33A v genu pro GCK**

Věk (roky)	věk při diagnóze (měsíce)	výška (cm)	váha (kg)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	bazální glykemie (mmol/l)	bazální inzulin (mIU/l)	bazální C-peptid (nmol/l)
12	10	154,1	58	24,4	6,2	4,3	0,25

anti-ICA	anti-GADA	anti IA2	HbA <sub>1c</sub> (%)	celkový cholesterol (mmol/l)	HDL cholesterol (mmol/l)	LDL cholesterol (mmol/l)
negativní	negativní	negativní	6,7	3,9	1,26	2,44

**b) Průběh OGTT u pacienta s mutací V33A**

min	OGTT				
	0	30	60	90	120
glykemie (mmol/l)	7,2	15,7	7,9	7	7,5

**c) Průběh ivGTT u pacienta s mutací V33A**

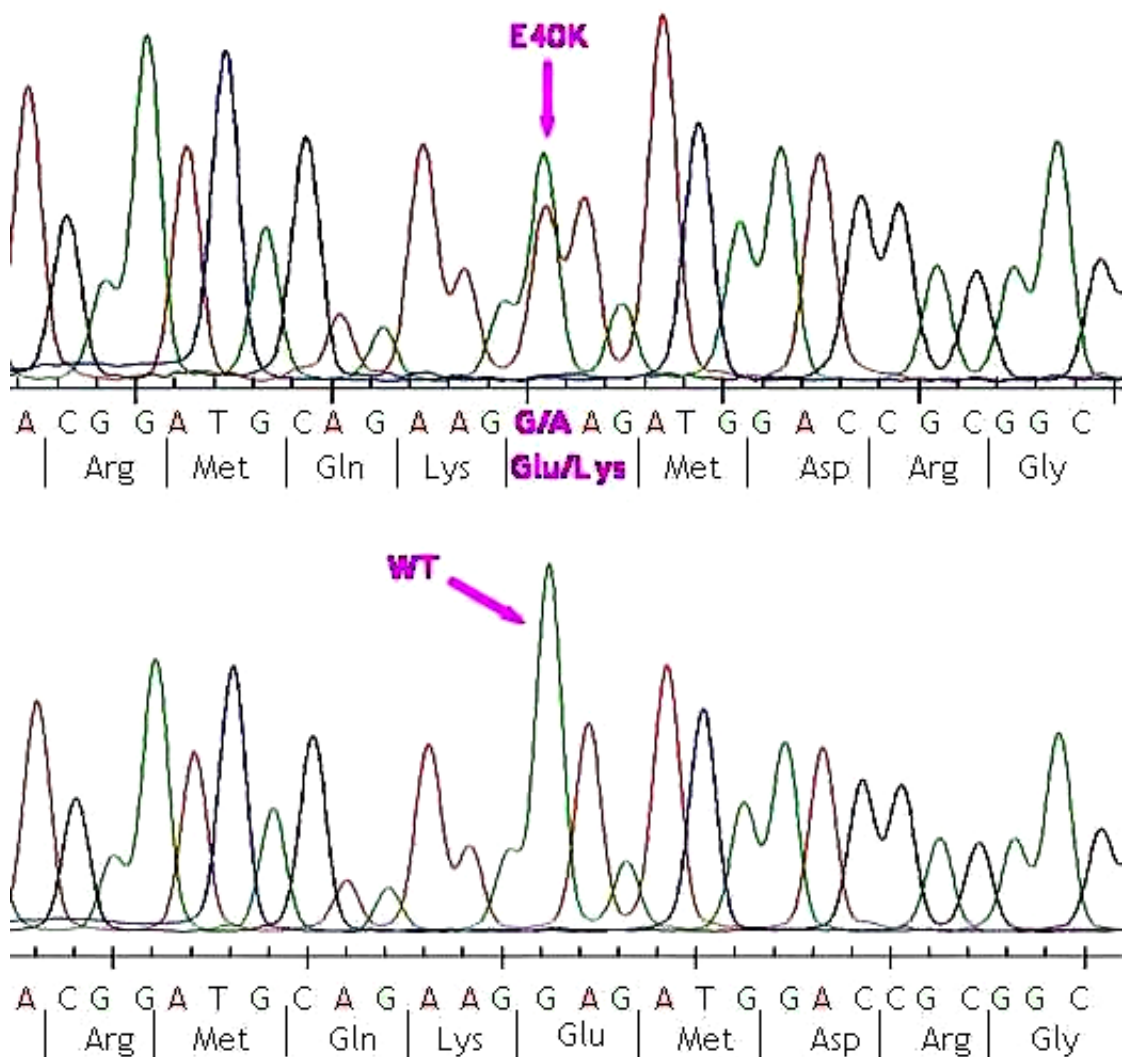
min	ivGTT*					
	0	1	3	10	30	60
glykemie (mmol/l)	6,2	19,2	15,5	13,9	11,1	8,4
inzulin (mIU/l)	4,3	36	33,2	34,2	24,9	15,2
C-peptid (nmol/l)	0,25	0,58	1,05	1,2	1,1	0,96

\*intravenózní podání roztoku glukózy – 0,5 g glc/kg tělesné hmotnosti



Jako druhá byla identifikována mutace v exonu 2 E40K (záměna kyseliny glutamové za lysin) (118G>A) (obr. 20) u 30letého pacienta, u něhož byla porušená glukózová tolerance diagnostikována v 7 letech. Jeho matka měla také PGT a u prarodičů z matčiny strany došlo ve stáří k manifestaci diabetu. Mutace E40K byla poprvé posána v české populaci MODY pacientů (Pruhova et al. 2003).

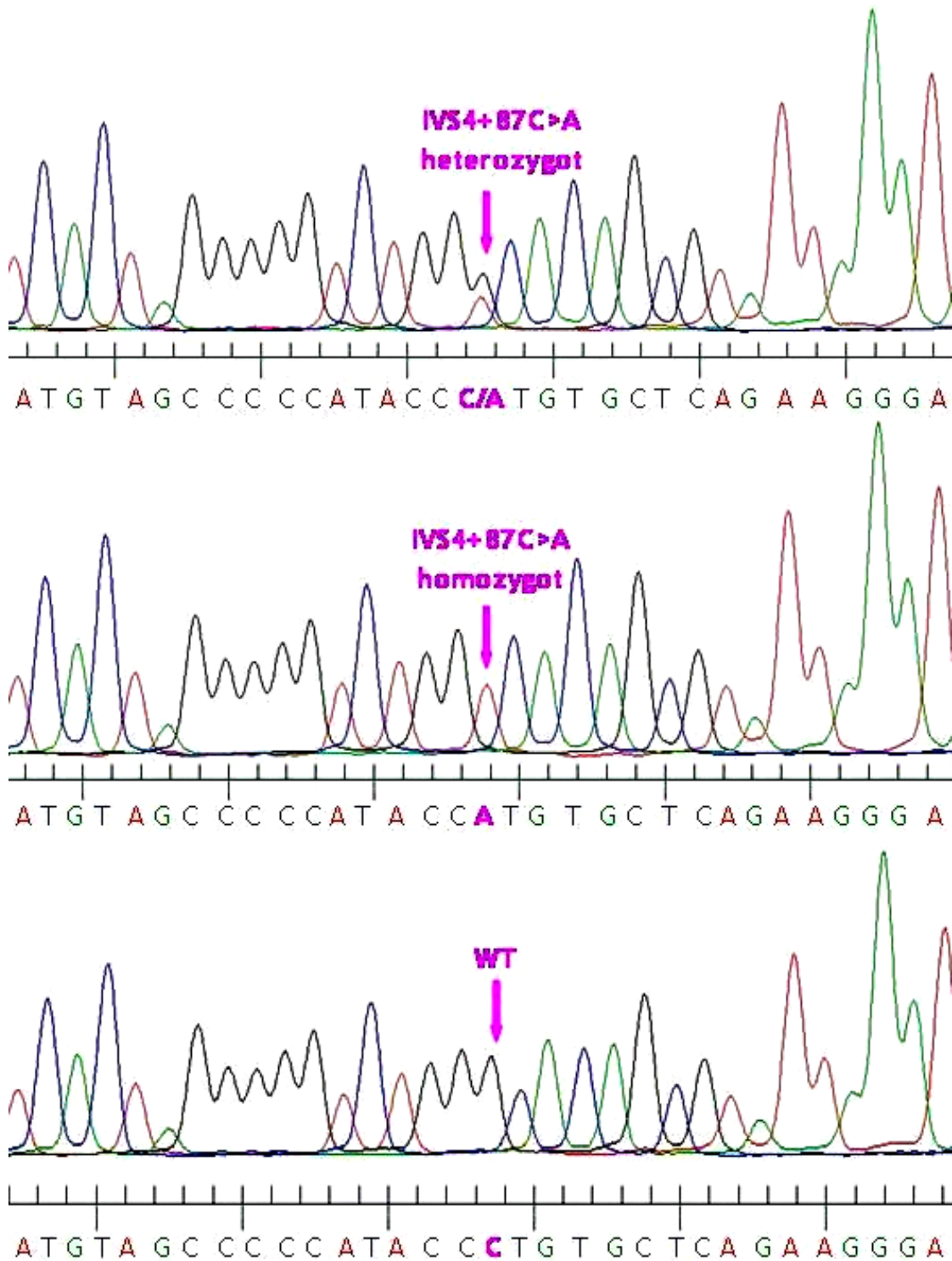
**Obr. 20: Mutace E40K v GCK genu**



Intronová varianta IVS4+87C>A (obr. 21) byla detekována u 42letého muže s PGT, jehož otec i babička z otcovy strany byli pro diabetes léčeni inzulínem. Stejnou intronovou variantu jsme odhalili u nejmladšího syna

základního pacienta a u jeho nejstarší dcery byla objevena záměna IVS4+87C>A v homozygotní formě (obr. 21). Prostřední syn je nositelem normální (WT) formy *GCK* genu.

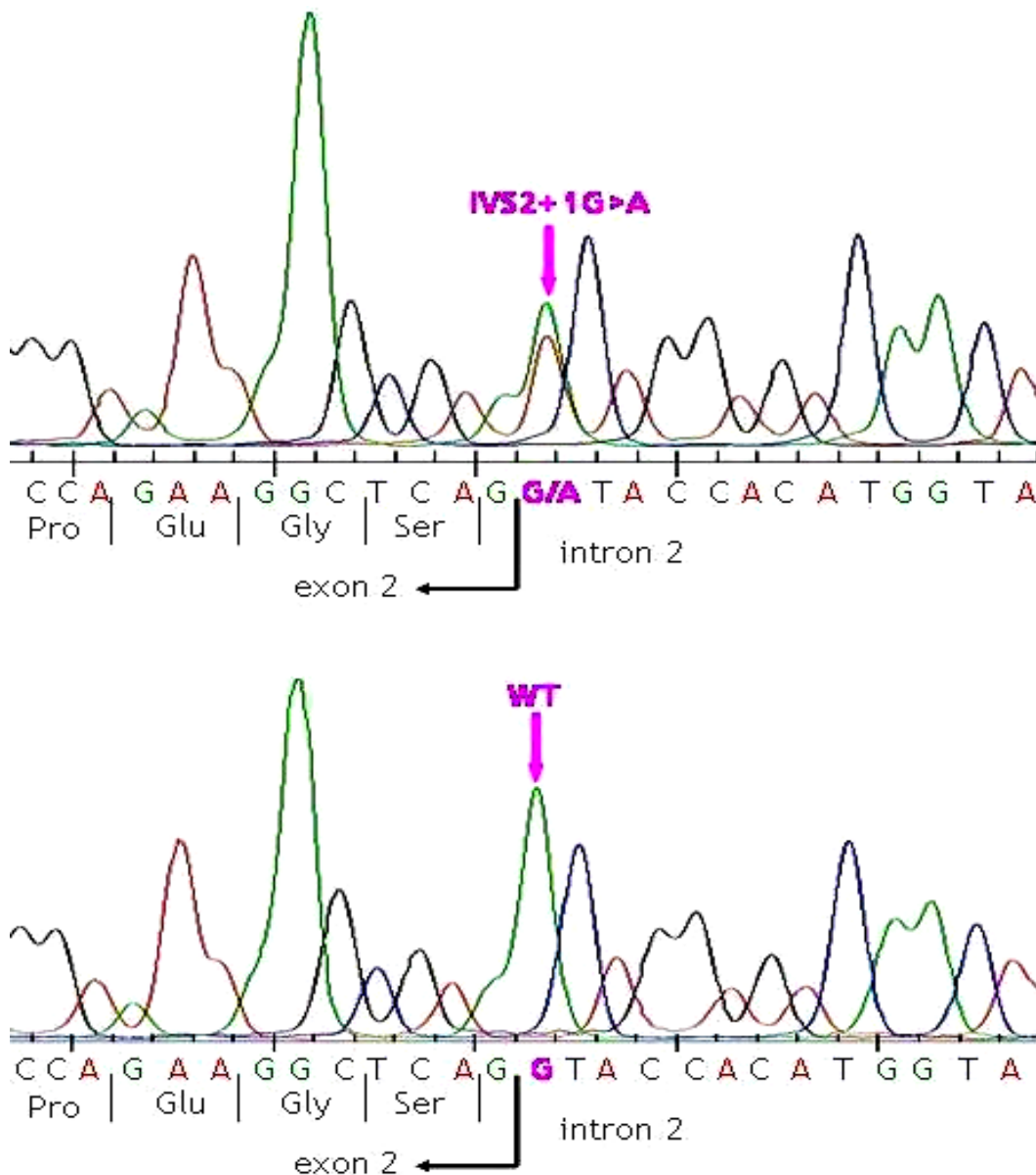
**Obr. 21: Nová intronová varianta IVS4+87C>A v *GCK* genu**





U jedné pacientky s gestačním diabetem byla nalezena dosud nepopsaná intronová mutace IVS2+1G>A (obr. 22). K transici guaninu za adenin dochází v těsné blízkosti intron-exonového rozhraní. Mutace IVS2+1G>A se nachází ve vysoce konzervativní oblasti a postihuje sestřihové donorové místo. Potvrzení pravděpodobného vlivu této záměny na proces sestřihu vyžaduje provedení funkční analýzy.

**Obr. 22: Nová mutace IVS2+1G>A v GCK genu**



### 12.2.5 ZASTOUPENÍ MODY2 U MODY RODIN

Ve 12 MODY rodinách jsme našli 2 mutace. MODY2 tvoří 16,7 % z našeho souboru MODY pacientů. Pro potvrzení vlivu detekované záměny v intronové oblasti na funkci enzymu by musela být provedena funkční analýza. Proto jsme tuto intronovou záměnu nezapočítali do mutací způsobujících MODY2.

Chtěla bych poděkovat Prof. MUDr. Iwaru Klimešovi, DrSc., a RNDr. Daniele Gašperíkové, Ph.D., z Ústavu experimentálnej endokrinológie Slovenské akademie vied v Bratislavě za ochotu a pomoc při diagnostice MODY3 u pacientů, u kterých jsme nenalezli mutaci v *GCK* genu. V jejich laboratoři byl proveden screening mutací v genu pro *HNF-1 $\alpha$*  a identifikovány tyto varianty: nově popsaná mutace F177S (záměna fenylalaninu za serin) v exonu 2 u otce a jeho dvou synů a dříve popsaná mutace R203H (záměna argininu za histidin) v exonu 3 *HNF-1 $\alpha$*  genu u muže, který od 18 let trpěl diabetem a v jehož rodině byli postiženi cukrovkou i její další členové – sestra, oba rodiče a prarodiče z matčiny strany.

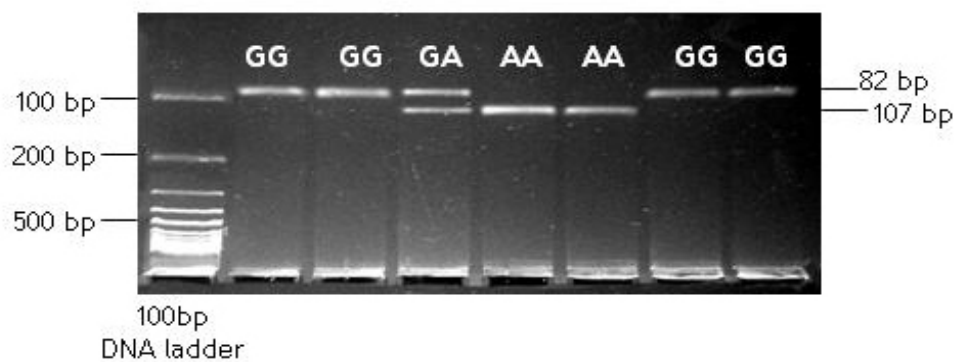
MODY3 tvoří také 16,7 % z našeho souboru MODY pacientů.

U 66,6 % MODY rodin nebyla zjištěna mutace svědčící o některé ze dvou nejčastějších forem MODY.

### 12.3 POLYMORFISMUS -30G>A V B-PROMOTORU GCK GENU

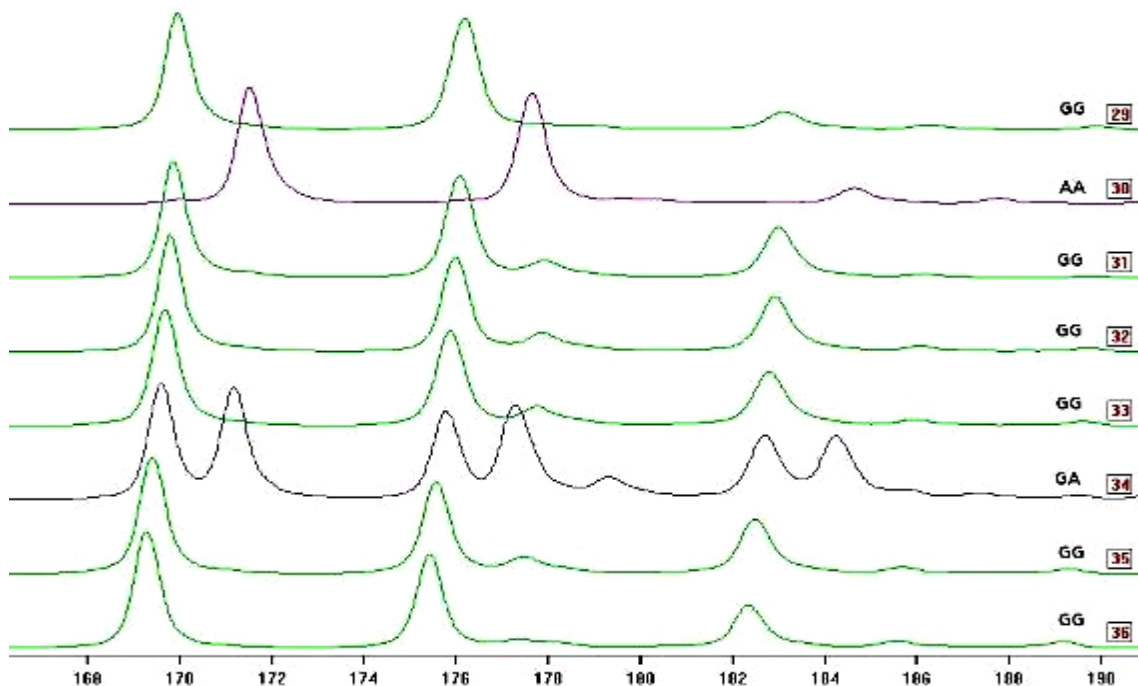
Jednotlivé varianty polymorfismu -30G>A v B-promotoru GCK genu byly detekovány pomocí RFLP štěpením restriční endonukleázou MwoI na 3% agarózovém gelu (obr. 23).

**Obr. 23:** RFLP analýza polymorfismu -30G>A v B-promotoru GCK genu



Po získání všech variant genotypů – GG, GA, AA – jakožto kontrol byla pro screening tohoto polymorfismu použita metoda SSCP (obr. 24).

**Obr. 24:** SSCP analýza polymorfismu -30G>A v B-promotoru GCK genu



Zjištěné frekvence polymorfismu jsou uvedeny v následující tabulce (tab. 14).

**Tab 14: Frekvence genotypů u jednotlivých souborů**

	Genotyp		
	GG	GA	AA
<b>DM2</b>	240 (70,8 %)	88 (26,0 %)	11 (3,2 %)
<b>G</b>	108 (65,5 %)	55 (33,3 %)	2 (1,2 %)
<b>PD</b>	91 (64,5 %)	44 (31,2 %)	6 (4,3 %)
<b>K</b>	194 (74,3 %)	62 (23,8 %)	5 (1,9 %)

Hardy-Weinbergova rovnováha (HWE):

**DM2:**  $\chi^2 = 0,69$ ; NS

**G:**  $\chi^2 = 3,01$ ; NS

**PD:**  $\chi^2 = 0,05$ ; NS

**K:**  $\chi^2 = 0,00$ ; NS

Frekvence genotypů ve všech souborech odpovídá HWE.

Zhodnocení, zda se frekvence polymorfismu u jednotlivých souborů liší od frekvence ve zdravé populaci (K), bylo provedeno  $\chi^2$ -testem. Pro porovnání frekvencí mezi souborem gestačních diabetiček a kontrolním souborem byl vzhledem k velmi nízkému počtu minoritních homozygotů AA (<5) u gestačních diabetiček použit Fisherův exaktní test.

**DM2 vs. K:**  $\chi^2 = 1,52$ ;  $p = 0,463$

**G vs. K:** Fisherův exaktní test = 4,81;  $p = 0,091$

**PD vs. K:**  $\chi^2 = 5,00$ ;  $p = 0,075$

Ze získaných výsledků vyplývá, že frekvence genotypů se mezi soubory statisticky významně neliší.

Hodnoty antropometrických a biochemických parametrů u jednotlivých souborů a jejich porovnání mezi soubory gestačních diabetiček a nediabetiků s rodinnou anamnézou diabetu s kontrolním souborem nediabetiků bez rodinné anamnézy jsou uvedeny v tabulce 9–11.

Vliv genotypu na sledované parametry u kontrolního souboru je dokumentován v tabulce 15.

Při statistické analýze vlivu alely A – po sloučení genotypů AA a GA – nebyly u nositelů alely A ve sledovaných parametrech nalezeny žádné statistické rozdíly oproti nositelům genotypu GG. Vliv alely A u homozygotů (AA) je tedy prokazatelně větší než u heterozygotů (GA). Uplatňuje se tzv. efekt dávky.

Při statistické analýze souborů diabetiků 2. typu, potomků diabetiků a gestačních diabetiček nebyl prokázán žádný statisticky významný vliv alely A v homozygotním ani heterozygotním stavu na sledované antropometrické a biochemické parametry.

**Tab. 15: Vliv variant polymorfismu -30G>A na antropometrické a biochemické parametry u nediabetiků bez rodinné anamnézy DM2**

Nediabetici bez rodinné anamnézy diabetu (K)	GG (ženy / muži) n=194	GA (ženy/muži) n=62	AA (ženy/muži) n=5	ANCOVA (adjustace na věk, BMI) p
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23,0±3,72 / 23,6±2,77	23,2±3,72 / 24,4±2,77 <sup>a)</sup>		0,784 / 0,232 <sup>b)</sup>
% podkožního tuku	24,3±5,16 / 15,7±4,53	25,2±5,16 / 14,3±4,53 <sup>a)</sup>		0,318 / 0,237
obvod břicha (cm)	79,2±4,01 / 85,8±4,32	79,0±4,01 / 85,2±4,32 <sup>a)</sup>		0,880 / 0,585
WHR	0,73±0,044 / 0,83±0,034	0,72±0,044 / 0,82±0,034 <sup>a)</sup>		0,270 / 0,351
triglyceridy (mmol/l)	1,0±0,54	1,0±0,54	1,1±0,54	0,914
celkový cholesterol (mmol/l)	4,5±0,83	4,6±0,83	4,6±0,83	0,633
HDL cholesterol (mmol/l)	1,6±0,34 / 1,3±0,29	1,5±0,34 / 1,4±0,30 <sup>a)</sup>		0,159 / 0,313
LDL cholesterol (mmol/l)	2,5±0,74	2,6±0,74	2,9±0,74	0,287
celkové volné mastné kyseliny (mmol/l)	481,2±191,74	486,0±192,71	472,7±192,74	0,986
% SFA	37,9±6,32	39,1±6,32	38,3±6,33	0,595
% MUFA	39,5±6,39	39,5±6,33	35,2±6,39	0,434
% PUFA	22,6±4,55	21,4±4,55	26,5±4,55	0,068
bazální glykemie (mmol/l)	4,6±0,40	4,6±0,39	5,2±0,40	0,025
glykemie v 30 min OGTT (mmol/l)	7,1±1,22	7,1±1,22	8,5±1,23	0,045
glykemie v 60 min OGTT (mmol/l)	6,4±1,68	6,3±1,67	8,3±1,67	0,034
glykemie v 120 min OGTT (mmol/l)	4,7±1,22	4,6±1,22	5,7±1,22	0,152
Σglykemie při OGTT (mmol/l)	36,0±5,36	36,0±5,36	45,0±5,36	0,001
bazální C-peptid (nmol/l)	0,59±0,209	0,56±0,209	0,79±0,209	0,079
ΣC-peptidu při OGTT (nmol/l)	13,6±4,16	12,5±4,16	16,5±4,16	0,048
bazální inzulin (mIU/l)	6,5±3,32	6,1±3,33	9,5±3,33	0,096
Σinzulinu při OGTT (mIU/l)	183,6±101,82	161,7±101,98	255,4±101,99	0,148
glykované proteiny (mmol/l)	1,1±0,13	1,1±0,13	1,1±0,13	0,873
kyselina močová (mmol/l)	265,0±75,96	273,6±75,96	238,6±75,96	0,530

průměr±SD

tučně jsou vyznačeny statisticky významné rozdíly,

a) vzhledem k malému počtu minoritních homozygotů AA byl u parametrů, které jsou závislé na pohlaví, hodnocen vliv minoritní alely (heterozygoti GA a homozygoti AA vs. homozygoti GG); b) BMI adjustováno na věk

Nediabetici bez rodinné anamnézy diabetu (K)	GG (ženy / muži) n=194	GA (ženy/muži) n=62	AA (ženy/muži) n=5	ANCOVA (adjustace na věk, BMI) p
HOMA-R (mIU mmol l <sup>-2</sup> )	1,3±0,73	1,3±0,73	2,3±0,73	0,010
HOMA-F (mIU/mmol)	138,2±105,31c	118,4±105,28	110,9±105,27	0,398
Cederholm index (kg mIU <sup>-1</sup> l)	79,9±21,60	84,4±21,61	53,1±21,61	0,020
Matsuda index (mmol <sup>-1</sup> mIU <sup>-1</sup> l <sup>2</sup> )	199,6±93,44	211,2±93,44	110,2±93,42	0,121
Inzulinogenní index (mIU/mmol)	19,5±24,92	17,9±24,92	8,0±24,92	0,570

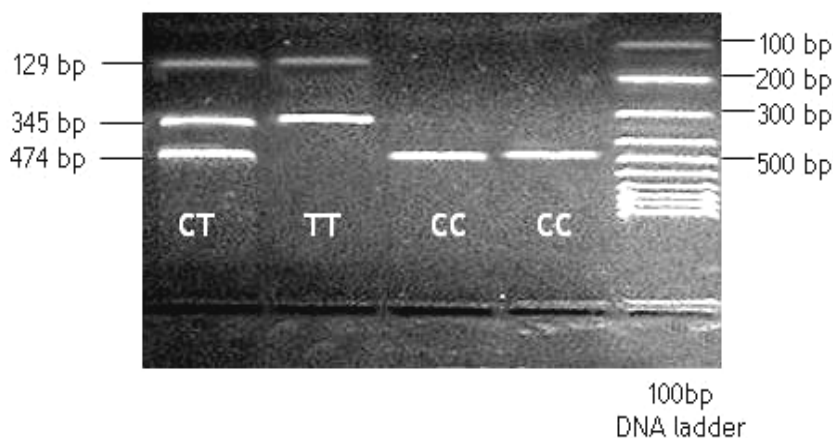
průměr±SD

tučně jsou vyznačeny statisticky významné rozdíly

#### 12.4 POLYMORFISMUS A98V (292C>T) V GENU PRO HNF-1 $\alpha$

Jednotlivé varianty polymorfismu A98V v genu pro *HNF-1 $\alpha$*  byly detekovány pomocí RFLP štěpením restriční endonukleázou *Avall* na 1,5% agarózovém gelu (obr. 25).

Obr. 25: RFLP analýza polymorfismu A98V (292C>T) v genu pro *HNF-1 $\alpha$*



Zjištěné frekvence polymorfismu A98V (rs1800574) jsou uvedeny v následující tabulce (tab. 16).

Tab 16: Frekvence genotypů u jednotlivých souborů

	Genotyp		
	CC	CT	TT
<b>DM2</b>	224 (95,3 %)	11 (4,7 %)	0
<b>G</b>	182 (93,8 %)	11 (5,7 %)	1 (0,5 %)
<b>K</b>	99 (95,2 %)	5 (4,8 %)	0

Hardy-Weinbergova rovnováha (HWE):

**DM2:**  $\chi^2 = 0,13$ ; NS

**G:**  $\chi^2 = 3,01$ ; NS

**K:**  $\chi^2 = 0,06$ ; NS

Frekvence genotypů ve všech souborech odpovídá HWE.

Zhodnocení, zda frekvence polymorfismu u jednotlivých souborů se liší od frekvence ve zdravé populaci (K), bylo provedeno  $\chi^2$ -testem.

**DM2 vs. K:**  $\chi^2 = 0,026$ ;  $p = 0,959$

**G vs. K:**  $\chi^2 = 0,644$ ;  $p = 0,866$

Ze získaných výsledků vyplývá, že frekvence genotypů se mezi soubory statisticky významně neliší.

Hodnoty antropometrických a biochemických parametrů u jednotlivých souborů a jejich porovnání mezi souborem gestačních diabetiček a kontrolním souborem nediabetiků bez rodinné anamnézy jsou v tabulce 9 a 10.

Vliv genotypu na sledované parametry u kontrolního souboru je uveden v tabulce 17. Vzhledem k malému počtu jedinců se záměnou alaninu za valin nebylo možné porovnávat vliv aminokyseliny valinu na parametry, které jsou závislé na pohlaví.



**Tab. 17: Vliv variant polymorfismu A98V (292C>T) na antropometrické a biochemické parametry u nediabetiků bez rodinné anamnézy DM2**

Nediabetici bez rodinné anamnézy diabetu (K)	CC n=99	CT n=5	ANCOVA (adjustace na věk, BMI) p
triglyceridy (mmol/l)	0,9±0,40	0,9±0,40	0,957
celkový cholesterol (mmol/l)	4,5±0,85	4,3±0,85	0,673
LDL cholesterol (mmol/l)	2,7±0,73	2,5±0,72	0,709
celkové volné mastné kyseliny (mmol/l)	438,7±193,48	618,7±193,48	0,083
% SFA	37,3±5,65	34,5±5,64	0,338
% MUFA	40,7±5,12	45,5±5,14	0,079
% PUFA	22,0±4,31	20,0±4,31	0,400
bazální glykemie (mmol/l)	4,7±0,46	4,5±0,46	0,352
glykemie v 120 min při OGTT (mmol/l)	4,6±1,18	5,6±1,18	0,151
Σglykemie při OGTT (mmol/l)	36,5±5,29	37,7±5,29	0,680
bazální C-peptid (nmol/l)	0,58±0,244	0,61±0,244	0,823
C-peptid v 120 min při OGTT (nmol/l)	<b>2,29±1,074</b>	<b>3,45±1,075</b>	<b>0,043</b>
ΣC-peptidu při OGTT (nmol/l)	13,9±4,67	16,6±4,76	0,290
bazální inzulin (mIU/l)	7,0±4,25	10,5±4,24	0,112
inzulin v 120 min při OGTT (mIU/l)	<b>24,2±23,97</b>	<b>53,4±23,96</b>	<b>0,023</b>
Σinzulinu při OGTT (mIU/l)	179,0±95,20	258,2±95,20	0,118
glykované proteiny (mmol/l)	1,1±0,13	1,1±0,13	0,498
kyselina močová (mmol/l)	252,8±74,23	279,9±74,24	0,530
HOMA-R (mIU mmol <sup>-2</sup> )	1,5±0,94	2,1±0,94	0,194
HOMA-F (mIU/mmol)	<b>128,4±80,83</b>	<b>224,0±80,83</b>	<b>0,027</b>
Cederholm index (kg mIU <sup>-1</sup> l)	80,8±21,34	75,7±20,77	0,751
Matsuda index (mmol <sup>-1</sup> mIU <sup>-1</sup> l <sup>2</sup> )	201,5±94,41	163,6±94,41	0,605
Inzulinogenní index (mIU/mmol)	15,1±9,17	23,9±9,17	0,071

průměr±SD

tučně jsou vyznačeny statisticky významné rozdíly

Při statistické analýze souborů diabetiků 2. typu a gestačních diabetiček nebyl prokázán žádný statisticky významný vliv záměny aminokyselin alaninu za valin na sledované antropometrické a biochemické parametry. V souboru gestačních diabetiček byla nalezena jedna pacientka s homozygotní záměnou alaninu za valin. Ve statistické analýze byla tato pacientka hodnocena spolu s heterozygotními nositelkami polymorfismu.

## 13. DISKUZE

MODY je relativně vzácné onemocnění. V poslední době, zřejmě díky zlepšení diagnostiky molekulárně-genetickými technikami, některé studie referují, že MODY není tak neobvyklou formou diabetu, jak se původně předpokládalo. Udává se, že MODY v Evropě tvoří 2–5 % z diabetiků 2. typu (Ledermann 1995), resp. 1–2 % ze všech diabetických pacientů (Owen and Hattersley 2001). Mezi nejčastější formy MODY v Evropě patří MODY2 a MODY3. Prevalence obou podtypů MODY se výrazně liší v jednotlivých populacích. Podle dostupných informací MODY2 zaujímá 46–56 % ze všech MODY pacientů ve Francii (Froguel et al. 1993, Velho et al. 1997), 41–61 % v Itálii (Massa et al. 2001, Mantovani et al. 2003), 25–41 % ve Španělsku (Costa et al. 2000, Barrio et al. 2002), 31 % v České republice (Pruhova et al. 2003), 11–20 % ve Velké Británii (Zhang et al. 1995, Thomson et al. 2003), 10 % v Dánsku (Johansen et al. 2005), 8 % v Německu (Lindner et al. 1999) a 3,5 % ve Skandinávii (Lehto et al. 1999). Z toho vyplývá, že mutace v genu pro *GCK* jsou častější v populacích jižní Evropy než Evropy severní, kde hlavní příčinou MODY jsou mutace v genu pro *HNF-1 $\alpha$* .

MODY2 se na rozdíl od ostatních podtypů MODY vyznačuje pouze mírnými klinickými projevy a diagnostika této nemoci bývá velmi často náhodná (Hattersley et al. 1992, Hattersley 2005). Určení diagnózy záleží na věku pacienta. Neobézni děti nezřídka bývají považovány za diabetiky 1. typu, těhotné ženy jsou většinou označeny jako gestační diabetičky a starší jedinci jako diabetici 2. typu (Hattersley 2005). Z tohoto důvodu jsme se rozhodli zjistit zastoupení sekvenčních variant v genu pro *GCK* nejen u MODY pacientů, ale i u běžných forem metabolické poruchy glukózy, jako je DM2 a gestační diabetes, a také u zdravé populace s rodinnou anamnézou diabetu (přímí potomci DM2 nepříbuzní s diabetiky z našeho souboru DM2 pacientů). Kontrolním souborem byli zdraví jedinci bez rodinné anamnézy DM2.

### 13.1 SCREENINGOVÉ METODY TGGE A SSCP

Screeningu *GCK* genu bylo využito pro porovnání dvou metod, které byly zavedeny v naší laboratoři – SSCP a TGGE. Tyto metody jsou založeny na zcela odlišných fyzikálně-chemických principech.

SSCP je nejjednodušší a nejčastěji používanou metodou k detekci mutací. Tato metoda je založena na odlišné elektroforetické pohyblivosti jednořetězcových fragmentů, která je dána jejich jedinečnou terciární strukturou. Záměna jediné báze vede k tomu, že vlákno jednořetězcové DNA (ssDNA) zaujme jinou terciární strukturu než vlákno ssDNA s „wild“ typem nukleotidu. Při optimálních podmínkách tato vysoce citlivá technika zachycuje 100 % mutací v DNA fragmentech menších než 200 bp a 80–90 % mutací v DNA fragmentech menších než 400 bp. Optimální velikost analyzovaných vzorků je 150–250 bp. Senzitivita SSCP klesá s rostoucí délkou DNA řetězce (Hayashi and Yandell 1993). Dalším parametrem, který ovlivňuje senzitivitu metody, je teplota. Proto se SSCP provádí při dvou, někdy i při třech rozdílných teplotách. Teplotní rozmezí pro elektroforézu se udává 5–30 °C, přičemž rozdíl v teplotách mezi jednotlivými běhy by měl činit alespoň 10 °C.

TGGE je též rychlou a vysoce senzitivní metodou screeningu bodových mutací. Metoda je založena na rozdílné tepelné denaturaci analyzovaných fragmentů, jež je dána jejich primární strukturou. Délka analyzovaného vzorku DNA může být 100–1000 bp, jako optimální velikost se udává ~600 bp. Úsek, ve kterém předpokládáme možnost nukleotidové záměny, by měl ležet uprostřed fragmentu. Senzitivita detekce bodových mutací pomocí TGGE se blíží ke 100 %, pokud je schopnost rozlišení gelu v souladu se vzdáleností posunu heteroduplexů od homoduplexů (Steger 1994).

Výhodou obou metod je možnost screeningu velkého počtu vzorků, což by v případě použití sekvenace bylo časově a finančně velmi náročné. Pouze vzorky s abnormální mobilitou jsou následně sekvenovány.

Kromě nároků na přístrojové vybavení mají obě metody určité další nevýhody. U SSCP je to limitace v délce sledovaných fragmentů DNA.

Nevýhoda TGGE spočívá v tom, že je nutné nalézt optimální podmínky tání analyzovaného úseku DNA. V některých případech (především kvůli přítomnosti GC bohatých domén v dané sekvenci DNA) nelze navrhnout primery, které by vymezily oblast DNA s konstantní teplotou tání. V naší práci jsme nemohli metodu TGGE použít ke screeningu sekvenčních variant u exonů 8–10 *GCK* genu. Všechny ostatní exony byly screenovány souběžně oběma metodami.

S ohledem na značné množství popsaných mutací v genu pro *GCK* a na omezený počet pozitivních kontrol, jež jsme měli k dispozici, nemůžeme se 100% jistotou potvrdit, že jsme v našem souboru vzorků detekovali všechny sekvenční varianty *GCK* genu. Nicméně, přestože použité screeningové metody jsou založeny na rozdílných fyzikálních vlastnostech DNA, můžeme potvrdit jejich vysokou senzitivitu a 100% shodu v detekci abnormálních vzorků, u nichž byly dané sekvenční změny potvrzeny obousměrným sekvenováním.

### **13.2 SEKVENČNÍ VARIANTY GCK GENU**

V souboru dvanácti rodin s neurčeným typem *MODY* jsme v genu pro *GCK* našli dvě mutace a jednu intronovou variantu (tab. 2). Zastoupení *MODY2* činí 16,7 % z našeho souboru *MODY* rodin, což je zhruba poloviční záchyt než v dříve publikované studii screeningu českých *MODY* rodin (Pruhova et al. 2003). Relativně nižší frekvence *MODY2* v našem souboru *MODY* rodin může být způsobena jejich malým počtem.

Nově identifikovaná mutace A33V s největší pravděpodobností patří mezi mutace s mírným fenotypovým dopadem, které postihují povrchové struktury ovlivňující interakce s ostatními proteiny. Nejblíže nalezená mutace k této nové mutaci je R36W (záměna argininu za tryptofan), poprvé popsaná ve francouzské (Hager et al. 1994) a pak také v italské populaci (Massa et al. 2001, Mantovani et al. 2003) *MODY* pacientů. AK na 36. pozici se nepodílí na vytvoření vazebného místa pro glukózu ani pro ATP, a také

není součástí alosterického aktivačního místa (Matschinsky et al. 2006). Bylo prokázáno, že R36W nemá vliv na kinetiku ani na stabilitu enzymu. AK na 36. pozici zřejmě leží na povrchu enzymu daleko od aktivního místa enzymu a pravděpodobně může ovlivňovat interakce protein-protein, které přispívají ke koordinaci transportu glukózy a fosforylace (Miller et al. 1999). Obdobně by tomu mohlo být u 33. AK. Nicméně pro potvrzení vlivu nově nalezené mutace V33A by musela být provedena funkční analýza.

Druhá nalezená MODY2 mutace E40K byla poprvé popsána také v české populaci MODY pacientů (Pruhova et al. 2003). Funkční analýza mutace E40K nebyla provedena, a lze jen těžko předpokládat možný fenotypový dopad, protože se nachází mezi dvěma mutacemi s popsáním fenotypem, jež se od sebe velmi výrazně odlišují. Zatímco mutace R36W vykazuje pouze mírné fenotypové projevy (viz výše; Miller et al. 1999), u nositelů mutace G44S byla zjištěna velmi nízká aktivita mutovaného enzymu a výrazně zvýšená prahová koncentrace glukózy potřebná pro stimulaci sekrece inzulínu (GSIR) (Gloyn et al. 2004).

Nově nalezená intronová mutace IVS2+1G>A se nachází ve vysoce konzervativní oblasti a postihuje sestřihové donorové místo. Na rozhraní 2. exonu a intronu se nachází 70. kodón pro kyselinu glutamovou. Byla popsána mutace E70K ve francouzské populaci (Froguel et al. 1993). Nositelé mutace E70K měli sníženou aktivitu GCK o 35 % a pouze nepatrně zvýšený práh pro GSIR. Fenotypové projevy této mutace jsou tedy mírné (Gloyn et al. 2004). Potvrzení pravděpodobného vlivu této záměny na proces sestřihu a zjištění jejího fenotypového dopadu vyžaduje provedení funkční analýzy.

Naše práce neodhalila vyšší zastoupení mutací a polymorfismů u pacientů s DM2, u gestačních diabetiček ani u přímých potomků diabetiků v porovnání se zdravou populací (tab. 12). Poměrně malý počet studií variant v *GCK* genu byl zaměřen na tyto cílové skupiny. Ve francouzské populaci byly identifikovány *GCK* varianty u ~5 % DM2 (Zouali et al. 1993). Nicméně studie na gestačních diabetičkách jsou častější a prevalence *GCK*

mutací u těchto pacientek je 6 % ve Velké Británii (Saker et al. 1996) a 5,6 % ve Francii (Zouali et al. 1993).

Identifikovali jsme dva polymorfismy v kódující oblasti: Tyr215Tyr (645C>T) v exonu 6, u něhož jsme v souladu s populačními studii z celé Evropy (Zouali et al. 1993, Laakso et al. 1995, Lehto et al. 1999, Thomson et al. 2003, Johansen et al. 2005) potvrdili záchyt ~1 % v diabetické i nediabetické populaci, a Ser263Ser (789C>T) v exonu 7, který jsme našli u jednoho pacienta s DM2 (tab. 12). Tato ojedinělá varianta byla překvapivě popsána spolu s polymorfismem Tyr215Tyr u dětí se syndromem náhlého úmrtí (Forsyth et al. 2005).

Stejně jako v předešlých studiích (Zouali et al. 1993, Johansen et al. 2005) variantu v intronu 1 IVS2-12C>T jsme detekovali u ~1 % diabetické i nediabetické populace (tab. 12). Dříve popsáný polymorfismus v intronu 8 IVS8+18G>A (Lehto et al. 1999, Johansen et al. 2005) jsme našli u ~1 % diabetické populace (DM2 i G), ve zdravé populaci (potomci DM2 a kontrolní jedinci) byl záchyt nulový (tab. 12).

Nejběžnější variantou v *GCK* genu je IVS9+8T>C v intronu 9. Prevalence minoritní alely u všech našich sledovaných souborů činí ~30 % (tab. 12). Frekvence v ostatních evropských populacích byla následující: ve Finsku 36 % u DM2 a 27,5 % u jedinců s PGT (Laakso et al. 1995), 15 % u MODY pacientů ve Velké Británii (Thomson et al. 2003) a 14 % u diabetiků s časným počátkem DM2 v Itálii (Gragoli et al. 2001). V některých studiích nebyla frekvence polymorfismu udána (Froguel et al. 1993, Lehto et al. 1999, Johansen et al. 2005).

V intronu 9 jsme našli další polymorfismus – IVS9+49G>A – s relativně vysokým frekvenčním zastoupením v rozpětí od 7,3 % u DM2 po 13,1 % u zdravých osob (tab. 12). V italské populaci byla frekvence minoritní alely výrazně nižší (~3 %) (Gragoli et al. 2001).

V odborné literatuře jsou uváděny mutace v genu pro *GCK*, ale polymorfismy jsou zmiňovány zřídka. Šest intronových variant, které jsme identifikovali, nebylo dosud posáno: IVS1+4T>A, IVS3+9C>T, IVS3-23C>T,

IVS4+26C>A, IVS4+87C>A a IVS7-15C>G. Jejich frekvence byla relativně nízká (<1 %) (tab. 12). Varianty v intronu 2 IVS3-23C>T a v intronu 4 IVS4+26C>A byly zjištěny jen u zdravých jedinců, ostatní polymorfismy pouze v diabetické populaci, s výjimkou záměny IVS1+4T>A, která byla nalezena v diabetické populaci (u jednoho pacienta s DM2 a jedné gestační diabetičky) a také u jednoho zdravého jedince s rodinným výskytem DM2 (tab. 12). K transverzi tyminu za adenin (IVS1+4T>A) dochází v blízkosti intron-exonového sestřihového místa. Potvrzení možného vlivu této záměny na proces sestřihu vyžaduje provedení funkční analýzy.

Na druhé straně některé další intronové varianty, které jsme v našem sledovaném populačním vzorku jedinců nenalezli, byly v jiných evropských populacích popsány. Nejčastěji zmiňovanými polymorfismy jsou: IVS2+11G>A (Zouali et al. 1993, Lehto et al. 1999, Pruhova et al. 2003, Johansen et al. 2005) a IVS7-7T>A (Lehto et al. 1999, Johansen et al. 2005).

V naší skupině diabetiků jsme nenalezli žádného nositele mutace *GCK* genu, v souboru gestačních diabetiček pak pouze jednu nositelku intronové mutace. Toto zjištění pro nás bylo poměrně překvapivé, neboť jsme očekávali podobný záchyt jako v jiných evropských populačních studiích (viz výše). Důvodem může být přesná diagnostika jednotlivých typů diabetu.

### **13.3 POLYMORFISMUS -30G>A V B-PROMOTORU GCK GENU**

Oblast B-promotoru vykazuje vysokou sekvenční konzervativnost, proto se předpokládalo, že polymorfismus -30G>A (rs1799884) by mohl mít vliv na snížení *GCK* aktivity a zvýšení prahové koncentrace glukózy, nezbytné pro spuštění inzulinové sekrece (Rissanen et al. 1998).

Frekvence minoritní alely A je v řadě publikovaných studií vyšší u osob s PGT, s DM2 (Rose et al. 2005) a s gestačním diabetem (Zouali et al. 1993, Zaidi et al. 1997, Weedon<sup>a</sup>) et al. 2005, Shaat et al. 2006). Výsledky některých prací nicméně nepotvrzují vliv minoritní alely A na zvýšené riziko rozvoje

DM2, gestačního diabetu nebo zhoršenou glukózovou toleranci (Chiu et al. 1994, Rissanen et al. 1998).

Ačkoliv se zastoupení genotypů polymorfismu -30G>A v naší práci nelišilo od uvedených studií, nepotvrdili jsme vyšší záchyt minoritní alely u rizikových skupin v porovnání se zdravou populací (tab. 14). Důvodem statisticky nesignifikantního rozdílu v genotypové distribuci u našich souborů může být relativně nižší počet sledovaných jedinců oproti těmto studiím.

Alela A bývá spojována se zvýšenou hladinou lačné i postprandiální glykemie, sníženou glukózou stimulovanou inzulínovou sekrecí a zvýšenou inzulínovou rezistencí (Zaidi et al. 1997; Shaat et al. 2006; Rose et al. 2005). V diabetické populaci (DM2 a G) a v populaci zdravých osob s rodinnou anamnézou DM2 (PD) jsme nezjistili žádný statisticky významný vliv alely A v homozygotním ani v heterozygotním stavu na sledované biochemické a antropometrické parametry. Ve zdravé populaci jsme u nositelů homozygotního genotypu AA naměřili výrazně vyšší hladiny lačné glykemie ( $p = 0,025$ ) i jejich stimulovaných hodnot během OGTT ( $p = 0,001$ ). V rozporu s výše uvedenými výsledky měli homozygoti AA zvýšenou bazální (na hranici statistické významnosti) i stimulovanou ( $p = 0,048$ ) sekreci C-peptidu a zvýšenou sekreci inzulínu (NS). U těchto homozygotních jedinců jsme potvrdili vyšší inzulínovou rezistenci (HOMA R,  $p = 0,010$ , Cederholm index,  $p = 0,020$ ). Jedinci s heterozygotním genotypem GA se signifikantně nelišili v žádném ze sledovaných parametrů od jedinců s homozygotním genotypem GG (tab. 15).

V naší práci jsme potvrdili efekt dávky minoritní alely A (recesivní model vlivu) v populaci zdravých jedinců. Větší fenotypový dopad u homozygotních nositelů genotypu AA oproti heterozygotům GA byl pozorován i v jiných studiích (Zaidi et al. 1997, März et al. 2004).

Ve studii zabývající se vlivem polymorfismu na hladinu lačné glykemie a porodní váhu dětí byl pozorován efekt dávky alely A u matek na zvýšenou porodní hmotnost jejich dětí. Nebyl u nich však pozorován efekt dávky alely A na hladinu lačné glykemie, tzn. model vlivu alely A byl v tomto případě



dominantní, kdy nebyly pozorovány závažnější fenotypové projevy u nositelů genotypu AA oproti GA (Weedon <sup>a)</sup> et al. 2005).

#### **13.4 POLYMORFISMUS A98V (292C>T) V GENU PRO *HNF-1 $\alpha$***

Nejvíce zkoumaným polymorfismem v genu pro *HNF-1 $\alpha$*  je A98V (rs1800574). Neprokázali jsme vyšší výskyt minoritní alely T (způsobuje záměnu alaninu za valin) v diabetické populaci (u DM2 a G) než v populaci kontrolní (tab. 16). Zjištěné frekvence varianty 98V (4,7–5,7 %) byly srovnatelné s frekvencemi v jiných evropských populacích (3–6 %) (Urhammer et al 1997, Lauenborg et al. 2004, Weedon <sup>b)</sup> et al. 2005, Holmkvist et al. 2006).

Alela T (98V) byla popsána v souvislosti se zhoršenou inzulinovou sekrecí. U zdravé evropské populace byl ve 30. minutě OGTT popsán pokles sekrece C-peptidu o 34 % a pokles inzulinové sekrece o 57 % u jedinců s genotypem AV oproti homozygotům AA (Urhammer et al 1997). Také u žen s gestačním diabetem a genotypem AV bylo ve 30. minutě OGTT pozorováno snížení sekrece C-peptidu o 27 % a inzulinu o 22 %, u kontrolních jedinců pak o 10 % resp. o 16 % (Lauenborg et al. 2004). V naší studii jsme u kontrolního souboru zdravých jedinců nepozorovali pokles sekrece C-peptidu ani inzulinu v první fázi OGTT, ve druhé fázi (ve 120. minutě) jsme dokonce naměřili signifikantně vyšší hladiny C-peptidu a inzulinu u nositelů genotypu AV (tab. 17). Zjištěná vyšší inzulinová rezistence (NS = nesignifikantní) u heterozygotních jedinců je v protikladu s výsledky z rozsáhlé populační studie (Holmkvist et al. 2006). Heterozygoti také vykazovali lepší funkci  $\beta$ -buněk: signifikantně vyšší index HOMA F ( $p = 0,027$ ) a vyšší inzulinogenní index (na hranici statistické významnosti) (tab. 17), který byl ve zmíněné studii u heterozygotních jedinců signifikantně nižší (Holmkvist et al. 2006).

V diabetické populaci (DM2 a G) jsme nezjistili žádné statisticky významné rozdíly ve sledovaných biochemických a antropometrických parametrech u heterozygotních jedinců AV v porovnání s homozygoty AA.

## 14. SOUHRN A ZÁVĚR

Stanovené cíle dizertační práce byly splněny:

Byl sestaven soubor 12 rodin s neurčeným typem MODY a rozsáhlé soubory diabetiků 2. typu, potomků diabetiků 2. typu nepříbuzných s našimi DM2 pacienty, gestačních diabetiček a kontrolních jedinců, které byly podrobně biochemicky a antropometricky charakterizovány. Pro potřeby vyhodnocování a statistické analýzy byla vytvořena databáze získaných dat.

Byla vytvořena DNA banka, která slouží ke studování polymorfismů a mutací v kandidátních genech.

Pro všechny studované genetické lokusy byla zavedena metoda PCR.

Metoda RFLP byla zavedena pro detekci polymorfismů -30G>A v B-promotoru *GCK* genu a A98V v *HNF-1 $\alpha$*  genu.

Metoda SSCP byla vzhledem k menší finanční náročnosti než RFLP analýza následně použita pro detekci polymorfismu -30G>A v B-promotoru *GCK* genu

TGGE analýza byla zavedena pro exony 1a–7 *GCK* genu. Pro exony 8–10 se nám nepodařilo najít vhodné primery s GC-clampem, které jsou nezbytné pro použití TGGE metody.

Pro identifikaci genových variant všech exonů specifických pro  $\beta$ -buňky (1a–10) *GCK* genu byla zavedena metoda SSCP analýzy.

Vzorky, které byly během TGGE a/nebo SSCP analýzy *GCK* genu shledány jako pozitivní, byly následně obousměrně sekvenovány.

Potvrdili jsme vysokou senzitivitu obou screeningových metod – shoda v detekci pozitivních nálezů mezi analýzami TGGE a SSCP dosáhla 100 %.

V souboru MODY rodin jsme ve dvou různých rodinách našli v exonu 2 *GCK* genu jednu dosud nepopsanou mutaci V33A a dříve popsanou mutaci v populaci českých MODY pacientů E40K. V další MODY rodině byla

identifikována dosud nedetekovaná intronová varianta IVS4+87C>A, u jednoho člena rodiny dokonce v homozygotním stavu. Zastoupení MODY2 ve vzorku naší MODY populace činilo 16,7 %, což je zhruba polovina záchytu dříve zveřejněných výsledků populačního screeningu MODY v české populaci.

Přestože jsme našli u jedné gestační diabetičky novou intronovou mutaci IVS2+1G>A, u jednoho pacienta s DM2 dříve popsány polymorfismus Ser263Ser v exonu 7, v populaci diabetiků i nediabetiků dříve uváděný polymorfismus Tyr215Tyr v exonu 6 a také řadu intronových variant v *GCK* genu, neprokázali jsme zvýšený záchyt mutací a polymorfismů v tomto genu v české diabetické populaci oproti populaci nediabetické.

Nezjistili jsme statisticky významný rozdíl v genotypových frekvencích polymorfismu -30G>A v B-promotoru *GCK* genu mezi soubory diabetických a nediabetických jedinců. Nicméně, v kontrolní populaci jsem potvrdili vliv minoritní alely A v homozygotním stavu na zvýšení hladin lačné i stimulovaných hodnot glykemie a na zvýšení inzulinové rezistence. Vliv tohoto polymorfismu vykazoval efekt dávky, homozygotní jedinci GA měli hodnoty sledovaných antropometrických i biochemických parametrů srovnatelné s majoritními homozygoty GG. U ostatních studovaných souborů nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl ve sledovaných parametrech v závislosti na genotypu.

Frekvenční zastoupení minoritní alely T polymorfismu A98V v genu pro *HNF-1 $\alpha$*  nebylo vyšší v české diabetické populaci v porovnání s populací nediabetiků. Neprokázali jsme vliv tohoto polymorfismu na zhoršenou inzulinovou sekreci, jak bylo uváděno v odborné literatuře. Naopak jsme v kontrolním souboru zjistili zvýšenou sekreci inzulinu během druhé fáze OGTT a lepší funkci  $\beta$ -buněk u heterozygotních jedinců oproti běžným homozygotům. U ostatních studovaných souborů nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl ve sledovaných parametrech v závislosti na genotypu.

Z naší studie vyplývá, že mutace a polymorfismy genu pro *GCK* stejně jako polymorfismus -30G>A v B-promotoru *GCK* genu a polymorfismus A98V v genu pro *HNF-1 $\alpha$*  se v patogenezi diabetu 2. typu a gestačního diabetu u české populace neuplatňují, nebo pouze okrajově v interakci s dalšími genetickými a vnějšími faktory. Studium těchto interakcí gen–gen a gen–prostředí si zaslouží velkou pozornost a je předmětem našeho dalšího výzkumu.

## 15. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

**-30G>A** = záměna adeninu za guanin na pozici -30 bp v B-promotoru *GCK* genu

**A98V** = záměna alaninu za valin v genu pro *HNF-1 $\alpha$*  v 98. kodónu způsobená záměnou cytosinu za tymin na 292. pozici = **292C>T**

**AD** = autozomálně dominantní dědičnost

**ADP** = adenosidifosfát

**AK** = aminokyselina

**ATP** = adenosintrifosfát

**bHLH** = basic helix-loop-helix proteiny, zaujímají sekundární strukturu šroubovice–smyčka–šroubovice

**BMI** = body mass index, podíl tělesné hmotnosti (kg) a druhé mocniny výšky (m<sup>2</sup>)

**bp** = base pair(s), pár(y) bází

**cM** = centiMorgan, jednotka relativní vzdálenosti genových lokusů, která odpovídá 1% pravděpodobnosti rekombinace

**CNS** = centrální nervový systém

**ddNTP** = dideoxynukleotidtrifosfát

**DM** = diabetes mellitus

**DM2** = diabetes mellitus 2. typu, pacient(i) s diabetem 2. typu

**DNA** = deoxyribonukleová kyselina

**dNTP** = deoxynukleotidtrifosfát

**dsDNA** = double strand DNA, dvouřetězcová DNA

**E40K** = záměna kyseliny glutamové za lysin ve 40. kodónu *GCK* genu způsobená záměnou guaninu za adenin na 118. pozici = **118G>A**

**EDTA** = ethylene diamine tetraacetic acid, kyselina ethylendiamintetraacetová

**EKG** = elektrokardiografické vyšetření

**G** = gestační diabetičky

**G-6-P** = glukózo-6-fosfát

- GADA** = glutamic acid decarboxylase antibodies, protilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové
- GCK** = glukokináza
- GD** = gestační diabetes
- GKA** = glukokinázový aktivátor
- GKRP** = glukokinázový regulační protein
- GLUT2** = glukózový transportér 2
- GSIR** = glucose stimulated insulin release, glukózou stimulovaná sekrece inzulínu
- HDL** = high density lipoprotein, lipoprotein s vysokou hustotou
- HNF** = hepatocytární transkripční faktor
- HOMA-F** = homeostatický model funkce beta-buněk pankreatu
- HOMA-R** = homeostatický model inzulínové rezistence
- HWE** = Hardy-Weinbergova rovnováha
- IA2** = antibodies to protein tyrosine phosphatase, protilátky proti tyrozin fosfatáze
- IAPP** = islet amyloid polypeptide, amyloidní polypeptid
- ICA** = islet cell antibodies, protilátky proti buňkám Langerhansových ostrůvků
- IPF1** = inzulínový promotorový faktor 1
- IR** = inzulínový receptor
- Isl-1** = ISLET-1, transkripční faktor s motivem LIM/homeodomény
- ITT** = inzulínový toleranční test
- ivGTT** = intravenózní glukózový toleranční test
- IVS** = intervening sequence, intronová oblast
- IVS2+1G>A** = záměna guaninu za adenin v intronové oblasti 1 bp od konce exonu 2
- IVS4+87C>A** = záměna cytosinu za adenin v intronové oblasti 87 bp od konce exonu 4
- K** = kontrolní jedinci, nediabetici bez rodinné anamnézy DM2
- Kir6.2** = Potassium channel inwardly rectifying, protein kódovaný genem KCNJ11

- LDL** = low density lipoprotein, lipoprotein s nízkou hustotou
- MODY** = maturity-onset diabetes of the young
- MUFA** = mono unsaturated fatty acids, mononenasycené mastné kyseliny
- NeuroD1** = neurogenní diferenciační protein 1
- Ngn3** = neurogenin 3
- NS** = nesignifikantní, statisticky nevýznamné
- OGTT** = orální glukózový toleranční test
- PAD** = perorální antidiabetika
- Pax** = paired-box homeoprotein
- PCR** = polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
- PD** = potomci diabetiků 2. typu, nediabetici s rodinnou anamnézou DM2
- PGT** = porušená glukózová tolerance
- PHHI** = persistentní hyperinzulinemická hypoglykemie
- PNDM** = permanentní neonatální diabetes mellitus
- PUFA** = poly unsaturated fatty acids, polynenasycené mastné kyseliny
- RE** = restriční endonukleáza
- RFLP** = restriction fragment length polymorphism, polymorfismus délky restričních fragmentů, metoda DNA analýzy
- SFA** = saturated fatty acids, nasycené mastné kyseliny
- SNP** = single nucleotide polymorphism, jednonukleotidový polymorfismus
- SSCP** = single strand conformational polymorphism, metoda DNA analýzy
- ssDNA** = single strand DNA, jednořetězová DNA
- TCF7L2** = transcription factor 7-like2
- TE pufr** = Tris-HCl 10 mmol l<sup>-1</sup>, EDTA 1 mmol l<sup>-1</sup>
- TGGE** = teplotní gradientová gelová elektroforéza, metoda DNA analýzy
- V33A** = záměna alaninu za valin v 33. kodónu *GCK* genu způsobená záměnou tyminu za cytosin na 98. pozici = **98T>C**
- VMK** = volné mastné kyseliny
- WHR** = waist to hip ratio, poměr obvodu pasu a boků
- WT** = wild type, bez mutace

## 16. LITERATURA

Barrio R, Bellanne-Chantelot C, Moreno JC, Morel V, Calle H, Alonso M, Mustieles C. Nine novel mutations in maturity-onset diabetes of the young (MODY) candidate genes in 22 Spanish families. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87:2532-2539.

Bartoov-Shifman R, Hertz R, Wang H, Wollheim CB, Bar-Tana J, Walker MD. Activation of the insulin gene promoter through a direct effect of hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *J Biol Chem.* 2002; 277:25914-25919.

Beards F, Frayling T, Bulman M, Horikawa Y, Allen L, Appleton M, Bell GI, Ellard S, Hattersley AT. Mutations in hepatocyte nuclear factor 1 beta are not a common cause of maturity-onset diabetes of the young in the U.K. *Diabetes* 1998; 47: 1152-1154.

Bell GI, Xiang KS, Newman MV, Wu SH, Wright LG, Fajans SS, Spielman RS, Cox NJ. Gene for non-insulin-dependent diabetes mellitus (maturity-onset diabetes of the young subtype) is linked to DNA polymorphism on human chromosome 20q. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(4):1484-1488.

Ben-Shushan E, Marshak S, Shoshkes M, Cerasi E, Melloul D. A pancreatic  $\beta$ -cell-specific enhancer in the human PDX-1 gene is regulated by hepatocyte nuclear factor 3 $\beta$  (HNF-3 $\beta$ ), HNF-1 $\alpha$ , and SPs transcription factors. *J Biol Chem.* 2001; 276:17533-17540.

Berman HK, Trinh KY, O'Doherty RM, Antinozzi PA, Gasa R, Newgard ChB. Metabolic mechanism and diabetes candidate gene: Insights gained from genetic engineering with recombinant adenoviruses; in Matschinsky FM, Magnuson MA (eds). *Molecular Pathogenesis of MODYs.* Frontiers in Diabetes. Basel, Karger, 2000, Vol.15:61-84.

Bjørkhaug L, Sagen JV, Thorsby P, Sovik O, Molven A, Njolstad PR. Hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene mutations and diabetes in Norway. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88:920-931.

Bláha P. ANTROPO-ein Programm für automatische Bearbeitung antropologischer Daten. *Wiss. Zeitschrift der Humboldt-Universität zu Berlin* 1991;5:153-156.

Bosque-Plata L, Lin J, Horikawa Y, Schwarz PE, Cox NJ, Iwasaki N, Ogata M, Iwamoto Y, German MS, Bell GI. Mutations in the coding region of the neurogenin 3 gene (NEUROG3) are not a common cause of maturity-onset diabetes of the young in Japanese subjects. *Diabetes.* 2001; 50:694-696.



Brocklehurst KJ, Payne VA, Davies RA, Carroll D, Vertigan HL, Wightman HJ, Aiston S, Waddell ID, Leighton B, Coghlan MP, Agius L. Stimulation of hepatocyte glucose metabolism by novel small molecule glucokinase activators. *Diabetes*. 2004; 53:535-541.

Byrne MM, Sturis J, Clement K, Vionnet N, Pueyo ME, Stoffel M, Takeda J, Passa P, Cohen D, Bell GI, et al. Insulin secretory abnormalities in subjects with hyperglycemia due to glucokinase mutations. *J Clin Invest*. 1994;93(3):1120-1130.

Cambridge PJ. Diabetes mellitus and heredity. *Br Med J*. 1928; 2:738-742.

Cauchi S, Meyre D, Dina C, Choquet H, Samson C, Gallina S, Balkau B, Charpentier G, Pattou F, Stetsyuk V, Scharfmann R, Staels B, Fruhbeck G, Froguel P. Transcription factor TCF7L2 genetic study in the French population: expression in human beta-cells and adipose tissue and strong association with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2006; 55:2903-2908.

Clement JP 4th, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L, Bryan J. Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. *Neuron* 1997; 18:827-838.

Codner E, Deng L, Perez-Bravo F, Roman R, Lanzano P, Cassorla F, Chung WK. Glucokinase mutations in young children with hyperglycemia. *Diabetes Metab Res Rev*. 2006 Jan 30; Sep-Oct;22(5):348-355.

Costa A, Bescos M, Velho G, Chevre J, Vidal J, Sesmilo G, Bellanne-Chantelot C, Froguel P, Casamitjana R, Rivera-Fillat F, Gomis R, Conget I. Genetic and clinical characterisation of maturity-onset diabetes of the young in Spanish families. *Eur J Endocrinol*. 2000;142:380-386.

Cuesta-Munoz AL, Huopio H, Otonkoski T, Gomez-Zumaquero JM, Nanto-Salonen K, Rahier J, Lopez-Enriquez S, Garcia-Gimeno MA, Sanz P, Soriguer FC, Laakso M. Severe persistent hyperinsulinemic hypoglycemia due to a de novo glucokinase mutation. *Diabetes*. 2004; 53:2164-2168.

Darendeliler F, Fournet JC, Bas F, Junien C, Gross MS, Bundak R, Saka N, Gunoz H. ABCC8 (SUR1) and KCNJ11 (KIR6.2) mutations in persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy and evaluation of different therapeutic measures. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2002; 15:993-1000.

Eckhoute J, Moerman E, Bouckenooghe T, Lukoviak B, Pattou F, Formstecher P, Kerr-Conte J, Vandewalle B, Laine B. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha isoforms originated from the P1 promoter are expressed in human pancreatic beta-cells and exhibit stronger transcriptional potentials than P2 promoter-driven isoforms. *Endocrinology*. 2003; 144:1686-1694.

Ek J, Rose CS, Jensen DP, Glumer C, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Pedersen O, Hansen T. The functional Thr130Ile and Val255Met polymorphisms of the hepatocyte nuclear factor-4alpha (HNF4A): gene associations with type 2 diabetes or altered beta-cell function among Danes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90:3054-3059.

Ellard S, Beards F, Allen LIS, Shepherd M, Ballantyne E, Harvey R, Hattersley AT. A high prevalence of glucokinase mutation in gestational diabetic subjects selected by clinical criteria. *Diabetologia* 2000; 43:250-253.

Ellard S. Hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF-1 alpha) mutations in maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mutat.* 2000 Nov;16:377-85.

Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med.* 2001; 345:971-980.

Fajans SS, Conn JW. Prediabetes, subclinical diabetes and latent clinical diabetes: Interpretation, diagnosis and treatment. *On the Nature & Treatment of Diabetes.* Excerpta Medica, New York 1965; chap 46:641-656.

Fajans SS, Conn JW. Tolbutamide-induced improvement in carbohydrate tolerance of young people with mild diabetes mellitus. *Diabetes.* 1960; 9:83-88.

Fajans SS: Scope and heterogeneous nature of MODY. *Diabetes Care.* 1990; 13:49-64.

Forsyth L, Hume R, Howatson A, Busuttill A, Burchell A. Identification of novel polymorphisms in the glucokinase and glucose-6-phosphatase genes in infants who died suddenly and unexpectedly. *J Mol Med.* 2005; 83:610-618.

Frayling TM, Evans JC, Bulman MP, Pearson E, Allen L, Owen K, Bingham C, Hannemann M, Shepherd M, Ellard S, Hattersley AT: beta-cell genes and diabetes: molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors. *Diabetes.* 2001;50 (Suppl 1):94-100.

Froguel P, Vaxillaire M, Sun F, Velho G, Zouali H, Butel MO, Lesage S, Vionnet N, Clement K, Fougerousse F, Tanizawa Y, Weissenbach J, Beckmann JS, Lethrop GM, Passa P, Permutt MA, Cohen D. Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature.* 1992; 356:162-164.

Froguel P, Velho G. *Molecular Genetics of Maturity-onset Diabetes of the Young.* Elsevier Science 1999; 10:142-146.

Froguel P, Zouali H, Vionnet N, Velho G, Vaxillaire M, Sun F, Lesage S, Stoffel M, Takeda J, Passa P, Permutt MA, Beckmann JS, Bell GI, Cohen D. Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993; 328:697-702.

Furuta H, Iwasaki N, Oda N, Hinokio Y, Horikawa Y, Yamagata K, Yano N, Sugahiro J, Ogata M, Oghawara H, Omori Y, Iwamoto Y, Bell GI. Organization and partial sequence of the hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$ /MODY1 gene and identification of a missense mutation, R127W, in a Japanese family with MODY. *Diabetes* 1997; 46: 1652-1657.

Gidh-Jain M, Takeda J, Xu LZ, Lange AJ, Vionnet N, Stoffel M, Froguel P, Velho G, Sun F, Cohen D, Patal P, Lo XMD, Hattersley AT, Luthman H, Wedell A, St Charles R, Harrison RW, Weber IT, Bell GI, Pilkis SJ. Glucokinase mutations associated with non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus have decreased enzymatic activity: implications for structure/function relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90:1932-1936.

Glaser B, Kesavan P, Heyman M, Davis E, Cuesta A, Buchs A, Stanley CA, Thornton PS, Permutt MA, Matschinsky FM, Herold HC: Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation. *N Engl J Med.* 1998; 338:226 -230.

Glaser B, Thornton P, Otonkoski T, Junien C. Genetics of neonatal hyperinsulinism. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2000; 82:79-86.

Gloyn AL, Noordam K, Willemsen MA, Ellard S, Lam WWK, Campbell IW, Midgley P, Shiota C, Buettger C, Magnuson MA, Matschinsky FM, Hattersley AT: Insights into the biochemical and genetic basis of glucokinase activation from naturally occurring hypoglycemia mutations. *Diabetes.* 2003; 52:2433 - 2440.

Gloyn AL. Glucokinase (GCK) mutations in hyper- and hypoglycemia: maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemia of infancy. *Hum Mutat.* 2003; 22:353-362.

Gloyn AL, Odili S, Buettger C, Stride A, Shiota C, Magnuson MA, Matschinsky FM. Regulation of Blood Sugar: A mathematical model to predict the threshold for glucose stimulated insulin release (GSIR) for GCK gene mutations that cause hyper and hypoglycaemia; in Magnuson MA, Matschinsky FM (eds). *Glucokinase and Glycemic Disease: From Basics to Novel Therapeutics.* Basel, Karger, 2004, Vol.16:92-109.

Godart F, Bellanné-Chantelot Ch, Clauin S, Gagnoli C, Abderrahmani A, Blahché H, Boutin P, Chèvre J-C, Froguel P, Bailleul B. Identification of Seven Novel Nucleotide Variants in the Hepatocyte Nuclear Factor-1 $\alpha$  (TCF1) Promoter Region in MODY Patients. *Human Mutation* 2000; 15:173-180.

Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F. Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:1607-1611.

Gagnoli C, Cockburn BN, Chiaramonte F, Gorini A, Marietti G, Marozzi G, Signorini AM. Early-onset Type II diabetes mellitus in Italian families due to mutations in the genes encoding hepatic nuclear factor 1 alpha and glucokinase. *Diabetologia*. 2001; 44:1326-1329.

Gagnoli C, Milord E, Cox N. Worldwide metanalysis of NEUROG3 variants in type 2 diabetes. *Obesity and Metabolism*. 2006; 2:68-71.

Gagnoli C; Menzinger Von Preussenthal G; Habener JF. Triple genetic variation in the HNF-4alpha gene is associated with early-onset type 2 diabetes mellitus in a philippino family. *Metabolism*. 2004; 53:959-963

Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadottir A, Styrkarsdottir U, Magnusson KP, Walters GB, Palsdottir E, Jonsdottir T, Gudmundsdottir T, Gylfason A, Saemundsdottir J, Wilensky RL, Reilly MP, Rader DJ, Bagger Y, Christiansen C, Gudnason V, Sigurdsson G, Thorsteinsdottir U, Gulcher JR, Kong A, Stefansson K: Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2006; 38:320-323.

Gribble FM, Reimann F. Sulfonylurea action revisited: the post-clonig era. *Diabetologia* 2003; 46:875-891.

Groves CJ, Zeggini E, Minton J, Frayling TM, Weedon MN, Rayner NW, Hitman GA, Walker M, Wiltshire S, Hattersley AT, McCarthy MI. Association analysis of 6,736 U.K. subjects provides replication and confirms TCF7L2 as a type 2 diabetes susceptibility gene with a substantial effect on individual risk. *Diabetes*. 2006; 55:2640-2644.

Habener JF, Kemp DM, Thomas MK. Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology*. 2005; 146(3):1025-34.

Hager J, Blanche H, Sun F, Vaxillaire NV, Poller W, Cohen D, Czernichow P, Velho G, Robert JJ, Cohen N, Froguel P. Six mutations in the glucokinase gene identified in MODY by using a nonradioactive sensitive screening technique. *Diabetes*. 1994; 43(5):730-733.

Hani EH, Stoffers DA, Chevre JC, Durand E, Stanojevic V, Dina C, Habener JF, Froguel P. Defective mutations in the insulin promoter factor-1 (IPF-1) gene in late-onset type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1999; 104:41-48.

Hansen SK, Parrizas M, Jensen ML, Pruhova S, Ek J, Boj SF, Johansen A, Maestro MA, Rivera F, Eiberg H, Andel M, Lebl J, Pedersen O, Ferrer J, Hansen T. Genetic evidence that HNF-1alpha-dependent transcriptional control of HNF-4alpha is essential for human pancreatic beta cell function. *J Clin Invest*. 2002; 110:827-833.

Hara M, Lindner TH, Paz VP, Wang X, Iwasaki N, Ogata M, Iwamoto Y, Bell GI. Mutations in the Coding Region of the Insulin Promoter Factor 1 Gene Are Not a Common Cause of Maturity-Onset Diabetes of the Young in Japanese. *Diabetes* 1998; 47: 845-846.

Hatina J, Sykes B. Na inzulinu nezávislá cukrovka. In: Hatina J and Sykes B. *Lékařská genetika, problémy a přístupy*. Praha: ACADEMIA 1999; 251-259.

Hattersley AT, Ashcroft FM. Activating mutations in Kir6.2 and neonatal diabetes: new clinical syndromes, new scientific insights, and new therapy. *Diabetes*. 2005; 54:2503-2513.

Hattersley AT, Turner RC, Permutt MA, Patel P, Tanizawa Y, Chiu KC, O'Rahilly S, Watkins PJ, Wainscoat JS. Linkage of type 2 diabetes to the glucokinase gene. *Lancet*. 1992; 339:1307-1310.

Hattersley AT. Maturity-onset Diabetes of the Young: Clinical Heterogeneity Explained by Genetic Heterogeneity. *Diabet Med* 1998;15:15-24.

Hattersley AT. Molecular genetics goes to the diabetes clinic. *Clin Med*. 2005; 5:476-481.

Hayashi K, Yandell D.W. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat*. 1993; 2: 338-346.

Herman WH, Fajans SS, Ortiz FJ, Smith MJ, Sturis J, Bell GI, Polonsky KS, Halter JB. Abnormal insulin secretion, not insulin resistance, is the genetic or primary defect of MODY in the RW pedigree. *Diabetes*. 1994; 43:40-46. Erratum in: *Diabetes* 1994; 43:1171.

Holmkvist J, Cervin C, Lyssenko V, Winckler W, Anevski D, Cilio C, Almgren P, Berglund G, Nilsson P, Tuomi T, Lindgren CM, Altshuler D, Groop L. Common variants in HNF-1 alpha and risk of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2006; 49:2882-2891.

Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN. Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$  gene (TCF2) associated with MODY. *Nature Genetics* 1997; 17:384-385.

Hui H, Perfetti R. Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood. *Eur J Endocrinol*. 2002; 146:129-141.

Humphries SE, Gable D, Cooper JA, Ireland H, Stephens JW, Hurel SJ, Li KW, Palmén J, Miller MA, Cappuccio FP, Elkeles R, Godsland I, Miller GJ, Talmud PJ. Common variants in the TCF7L2 gene and predisposition to type 2 diabetes in UK European Whites, Indian Asians and Afro-Caribbean men and women. *J Mol Med*. 2006; 84(12 Suppl):1-10. Epub 2006 Oct 17.

Chandak GR, Janipalli CS, Bhaskar S, Kulkarni SR, Mohankrishna P, Hattersley AT, Frayling TM, Yajnik CS. Common variants in the TCF7L2 gene are strongly associated with type 2 diabetes mellitus in the Indian population. *Diabetologia*. 2007; 50:63-67. Epub 2006 Nov 9.

Chèvre J-C, Hani EH, Boutin P, Vaxillaire M, Blanché H, Vionnet N, Pardini VC, Timsit J, Larger E, Charpentier G, Beckers D, Maes M, Bellanné-Chantelot C, Velho G, Froguel P. Mutation screening in 18 Caucasian families suggest the existence of other MODY genes. *Diabetologia* 1998; 41:1017-1023.

Chiu KC, Chuang LM, Chu A, Wang M. Transcription factor 1 and beta-cell function in glucose-tolerant subjects. *Diabet Med*. 2003; 20:225-230.

Chiu KC, Go RC, Aoki M, Riggs AC, Tanizawa Y, Acton RT, Bell DS, Goldenberg RL, Roseman JM, Permutt MA. Glucokinase gene in gestational diabetes mellitus: population association study and molecular scanning. *Diabetologia*. 1994; 37: 104-110.

Christensen HB, Jacobsen BB, Odili S, Buettger C, Cuesta-Munoz A, Hansen T, Brusgaard K, Magnuson MA, Shiota C, Matschinsky FM, Barbetti F: The second activating mutation (A456V): implications for glucose homeostasis and diabetes therapy. *Diabetes*. 2002; 51:1240 -1246.

Isomaa B, Henricsson M, Lehto M, Forsblom C, Karanko S, Sarelin L, Haggblom M, Groop L. Chronic diabetic complications in patients with MODY3 diabetes. *Diabetologia*. 1998;41(4):467-473.

Jensen JN, Hansen L, Ekstrom CT, Pociot F, Nerup J, Hansen T, Pedersen O. Polymorphisms in the neurogenin 3 gene (NEUROG) and their relation to altered insulin secretion and diabetes in the Danish Caucasian population. *Diabetologia*. 2001; 44 :123 -126.

Johansen A, Ek J, Mortensen HB, Pedersen O, Hansen T. Half of clinically defined maturity-onset diabetes of the young patients in Denmark do not have mutations in HNF4A, GCK, and TCF1. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90:4607-4614.

Kaisaki PJ, Menzel S, Lindner T, Oda N, Rjasanowski I, Sahm J, Meincke G, Schulze J, Schmechel H, Petzold C, Ledermann HM, Sachse G, Boriraj VV, Menzel R, Kerner W, Turner RC, Yamagata K, Bell GI. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in MODY and early-onset NIDDM: evidence for a mutational hotspot in exon 4. *Diabetes*. 1997;46:528-35.

Karim MA, Wang X, Hale TC, Elbein SC. Insulin Promoter Factor 1 variation is associated with type 2 diabetes in African Americans. *BMC Med Genet*. 2005; 17; 6:37.

Kim SH, Warram JH, Krolewski AS, Doria A. Mutation screening of the neurogenin-3 gene in autosomal dominant diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:2320-2322.

Laakso M, Malkki M, Kekalainen P, Kuusisto J, Mykkanen L, Deeb SS. Glucokinase gene variants in subjects with late-onset NIDDM and impaired glucose tolerance. *Diabetes Care.* 1995; 18:398-400.

Lauenborg J, Damm P, Ek J, Glumer C, Jorgensen T, Borch-Johnsen K, Vestergaard H, Hornnes P, Pedersen O, Hansen T. Studies of the Ala/Val98 polymorphism of the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene and the relationship to beta-cell function during an OGTT in glucose-tolerant women with and without previous gestational diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2004; 21(12):1310-1315.

Lausen J, Thomas h, Lemm I, Bulman M, Borgschulze M, Lingott A, Hattesley AT, Ryffel GU. Naturally occurring mutations in the human HNF4alpha gene impair the function of the transcription factor to a varying degree. *Nucleic Acids Research* 2000; 28:430-437.

Ledermann HM. Maturity-onset diabetes of the young (MODY) at least ten times more common in Europe than previously assumed? *Diabetologia.* 1995;38(12):1482.

Lee JC, Smith SB, Watada H, Lin J, Scheel D, Wang J, Mirmira RG, German MS. Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3. *Diabetes.* 2001; 50:928-936.

Lehto M, Tuomi T, Mahtani MM, Widen E, Forsblom C, Sarelin L, Gullstrom M, Isomaa B, Lehtovirta M, Hyrkko A, Kanninen T, Orho M, Manley S, Turner RC, Brettin T, Kirby A, Thomas J, Duyk G, Lander E, Taskinen MR, Groop L. Characterization of the MODY3 phenotype. Early-onset diabetes caused by an insulin secretion defect. *J Clin Invest.* 1997;99(4):582-591.

Lehto M, Wipemo C, Ivarsson SA, Lindgren C, Lipsanen-Nyman M, Weng J, Wibell L, Widen E, Tuomi T, Groop L. High frequency of mutations in MODY and mitochondrial genes in Scandinavian patients with familial early-onset diabetes. *Diabetologia.* 1999; 42:1131-1137.

Lindner TH, Cockburn BN, Bell GI. Molecular genetics of MODY in Germany. *Diabetologia.* 1999; 42:121-123.

Love-Gregory LD, Wasson J, Ma J, Jin CH, Glaser B, Suarez BK, Permutt MA: A common polymorphism in the upstream promoter region of the hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  gene on chromosome 20q is associated with type 2 diabetes and appears to contribute to the evidence for linkage in an Ashkenazi Jewish population. *Diabetes.* 2004; 53:1134 -1140.

Macfarlane WM, Frayling TM, Ellard S, Evans JC, Allen LI, Bulman MP, Ayres S, Shepherd M, Clark P, Millward A, Demaine A, Wilkin T, Docherty K, Hattersley AT. Missense mutations in the insulin promoter factor-1 gene predispose to type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 1999; 104: 33-39.

Maestro MA, Boj SF, Luco RF, Pierreux CE, Cabedo J, Servitja JM, German MS, Rousseau GG, Lemaigre FP, Ferrer J. Hnf6 and Tcf2 (MODY5) are linked in a gene network operating in a precursor cell domain of the embryonic pancreas. *Hum Mol Genet.* 2003; 12:3307-3314.

Malecki MT <sup>a)</sup>, Jhala US, Antonellis A, Fields L, Doria A, Orban T, Saad M, Warram JH, Montminy M, Krolewski AS. Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nature genet.* 1999; 23:323-328.

Malecki MT <sup>b)</sup>, Yang Y, Antonellis A, Curtis S, Warram JH, Krolewski AS. Identification of new mutations in the hepatocyte nuclear factor 4alpha gene among families with early onset Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 1999; 16: 193-200.

Malecki MT, Klupa T, Moczulski DK, Rogus JJ. The Ala45Thr polymorphism of BETA2/NeuroD1 gene and susceptibility to type 1 diabetes mellitus in caucasians. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2003; 111:251-254.

Mantovani V, Salardi S, Cerreta V, Bastia D, Cenci M, Ragni L, Zucchini S, Parente R, Cicognani A. Identification of eight novel glucokinase mutations in Italian children with maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mutat.* 2003; 22:338.

März W, Nauck M, Hoffmann MM, Nagel D, Boehm BO, Koenig W, Rothenbacher D, Winkelmann BR: G(-30)A polymorphism in the pancreatin promoter of the glucokinase gene associated with angiographic coronary artery disease and type 2 diabetes. *Circulation.* 2004; 109:2844-2849.

Massa O, Iafusco D, D'Amato E, Gloyn AL, Hattersley AT, Pasquino B, Tonini G, Dammacco F, Zanette G, Meschi F, Porzio O, Bottazzo G, Crino A, Lorini R, Cerutti F, Vanelli M, Barbetti F; Early Onset Diabetes Study Group of the Italian Society of Pediatric Endocrinology and Diabetology. KCNJ11 activating mutations in Italian patients with permanent neonatal diabetes. *Hum Mutat.* 2005; 25:22-27.

Massa O, Meschi F, Cuesta-Munoz A, Caumo A, Cerutti F, Toni S, Cherubini V, Guazzarotti L, Sulli N, Matschinsky FM, Lorini R, Iafusco D, Barbetti F; Italian Society of Paediatric Endocrinology and Diabetes (SIEDP). High prevalence of glucokinase mutations in Italian children with MODY. Influence on glucose tolerance, first-phase insulin response, insulin sensitivity and BMI. *Diabetologia.* 2001; 44:898-905.



Matschinsky FM, Glaser B, Magnuson MA. Pancreatic beta-cell glucokinase: closing the gap between theoretical concepts and experimental realities. *Diabetes*. 1998; 47:307-315.

Matschinsky FM, Liang Y, Kesavan P, Wang L, Froguel P, Velho G, Cohen D, Permutt MA, Tanizawa Y, Jetton TL, Niswender K, Magnuson MA. Glucokinase as pancreatic beta cell glucose sensor and diabetes gene. *J Clin Invest*. 1993; 92:2092-2098.

Matschinsky FM, Magnuson MA, Zelent D, Jetton TL, Doliba N, Han Y, Taub R, Grimsby J. The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy. *Diabetes*. 2006; 55:1-12.

Matschinsky FM. Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes*. 1996; 45:223-241.

Matschinsky FM: Regulation of Pancreatic  $\beta$ -Cell Glucokinase. *Diabetes*. 2002; 51:394-404.

Mauvais-Jarvis F, Smith SB, Le May C, Leal SM, Gautier JF, Molokhia M, Riveline JP, Rajan AS, Kevorkian JP, Zhang S, Vexiau P, German MS, Vaisse C. PAX4 gene variations predispose to ketosis-prone diabetes. *Hum Mol Genet*. 2004 ; 13:3151-3159.

Miller SP, Anand GR, Karschnia EJ, Bell GI, LaPorte DC, Lange AJ. Characterization of glucokinase mutations associated with maturity-onset diabetes of the young type 2 (MODY-2): different glucokinase defects lead to a common phenotype. *Diabetes*. 1999; 48:1645-1651.

Moates JM, Nanda S, Cissel MA, Tsai MJ, Stein R. BETA2 activates transcription from the upstream glucokinase gene promoter in islet beta-cells and gut endocrine cells. *Diabetes* 2003; 52:403-408.

Moller AM, Dalgaard LT, Ambye L, Hansen L, Schmitz O, Hansen T, Pedersen O. A novel Phe75fsdelT mutation in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in a Danish pedigree with maturity-onset diabetes of the young. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 367-369.

Moller AM, Dalgaard LT, Pociot F, Nerup J, Hansen T, Pedersen O. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  gene in Caucasian families originally classified as having Type I diabetes. *Diabetologia* 1998; 41: 1528-1531.

Nakhei H, Lingott A, Lemm I, Ryffel GU. An alternative splice variant of the tissue specific transcription factor HNF4alpha predominates in undifferentiated murine cell types. *Nucleic Acid Res*. 1998; 26:497-504

Navas MA, Munoz-Elias EJ, Kim J, Shih D, Stoffel M. Functional Characterization of the MODY1 Gene Mutations HNF4 (R127W), HNF4 (V255M), and HNF4(E276Q). *Diabetes* 1999; 48:1459-1465.

Naya FJ, Huang H-P, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, Tsai M-J. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neurod-deficient mice. *Genes Dev.* 1997; 11: 2323-2334.

Nishigori H, Yamada S, Kohama S, Tomura H, Sho K, Horikawa Y, Bell GI, Takeuchi T, Takeda J. Frameshift mutation, A263fsinsGG, in the hepatocyte nuclear factor-1b gene associated with diabetes and renal dysfunction. *Diabetes* 1998; 47: 1354-1355.

Njølstad PR, Sagen JV, Bjorkhaug L, Odili S, Shehadeh N, Bakry D, Sarici SU, Alpay F, Molnes J, Molven A, Sovik O, Matschinsky FM. Permanent neonatal diabetes caused by glucokinase deficiency: inborn error of the glucose-insulin signaling pathway. *Diabetes.* 2003; 52:2854-2860.

Njølstad PR, Søvik O, Cuesta-Muñoz A, Bjørkhaug L, Massa O, Barbetti F, Undlien DE, Shiota C, Magnuson MA, Molven A, Matschinsky FM, Bell GI: Neonatal diabetes mellitus due to complete glucokinase deficiency. *N Engl J Med.* 2001; 344:1588-1592.

Ohno-Shosaku T, Zunkler BJ, Trube G. Dual effects of ATP on K<sup>+</sup> currents of mouse pancreatic beta-cells. *Pflugers Arch.* 1987; 408:133-138.

Okita K, Yang Q, Yamagata K, Hangenfeldt KA, Miyagawa J, Kajimoto Y, Nakajima H, Namba M, Wollheim CB, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Human insulin gene is a target gene of hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  (HNF-1 $\alpha$ ) and HNF-1 $\beta$ . *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 263:566-569.

Owen K., Hattersley A.T. Maturity-onset diabetes of the young: From clinical description to molecular genetic characterization. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2001; 15:309-323.

Owen KR, Shepherd M, Stride A, Ellard S, Hattersley AT. Heterogeneity in young adult onset diabetes: aetiology alters clinical characteristics. *Diabet Med.* 2002;19(9):758-761.

Pearson ER, Liddell WG, Shepherd M, Corral RJ, Hattersley AT. Sensitivity to sulphonylureas in patients with hepatocyte nuclear factor-1alpha gene mutations: evidence for pharmacogenetics in diabetes. *Diabet Med.* 2000; 17(7):543-545.

Polychronakos C. Early onset diabetes mellitus. Tip or iceberg? *Pediatric Diabetes.* 2004;5:171-173.

Porter JR, Shaw NJ, Barrett TG, Hattersley AT, Ellard S, Gloyn AL. Permanent neonatal diabetes in an Asian infant. *J Pediatr*. 2005; 146:131-133.

Proks P, Antcliff JF, Lippiat J, Gloyn AL, Hattersley AT, Ashcroft FM. Molecular basis of Kir6.2 mutations associated with neonatal diabetes or neonatal diabetes plus neurological features. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:17539-17544.

Pruhova S, Ek J, Lebl J, Sumnik Z, Saudek F, Andel M, Pedersen O, Hansen T. Genetic epidemiology of MODY in the Czech republic: new mutations in the MODY genes HNF-4alpha, GCK and HNF-1alpha. *Diabetologia*. 2003; 46:291-295.

Průhová Š, Lebl J. MODY- Maturity-onset Diabetes of the Young. *DMEV* 1999; 4:177-181.

Raeder H, Bjorkhaug L, Johansson S, Mangseth K, Sagen JV, Hunting A, Folling I, Johansen O, Bjorgaas M, Paus PN, Sovik O, Molven A, Njolstad PR. A Hepatocyte Nuclear Factor-4{alpha} Gene (HNF4A) P2 Promoter Haplotype Linked With Late-Onset Diabetes: Studies of HNF4A Variants in the Norwegian MODY Registry. *Diabetes*. 2006; 55:1899-1903.

Rissanen J, Saarinen L, Heikkinen S, Kekalainen P, Mykkanen L, Kuusisto J, Deeb SS, Laakso M: Glucokinase gene islet promoter region variant (G→A) at nucleotide -30 is not associated with reduced insulin secretion in Finns. *Diabetes Care* 1998; 21:1194 -1197.

Rose CS, Ek J, Urhammer SA, Glumer C, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Pedersen O, Hansen T. A -30G>A polymorphism of the beta-cell-specific glucokinase promoter associates with hyperglycemia in the general population of whites. *Diabetes*. 2005; 54:3026-3031.

Rose RB, Bayle JH, Endrizzi JA, Cronk JD, Crabtree GR, Alber T. Structural basis of dimerization, coactivator recognition and MODY3 mutations in HNF-1 $\alpha$ . *Nature structural biology* 2000; 7:744-748.

Sagen JV, Odili S, Bjorkhaug L, Zelent D, Buettger C, Kwagh J, Stanley C, Dahl-Jorgensen K, de Beaufort C, Bell GI, Han Y, Grimsby J, Taub R, Molven A, Sovik O, Njolstad PR, Matschinsky FM. From clinicogenetic studies of maturity-onset diabetes of the young to unraveling complex mechanisms of glucokinase regulation. *Diabetes*. 2006; 55:1713-1722.

Sagen JV, Raeder H, Hathout E, Shehadeh N, Gudmundsson K, Baevre H, Abuelo D, Phornphutkul C, Molnes J, Bell GI, Gloyn AL, Hattersley AT, Molven A, Sovik O, Njolstad PR: Permanent neonatal diabetes due to mutations in KCNJ11 encoding Kir6.2: patient characteristics and initial response to sulfonylurea therapy. *Diabetes*. 2004; 53 :2713-2718.

Saker PJ, Hattersley AT, Barrow B, Hammersley MS, McLellan JA, Lo YM, Olds RJ, Gillmer MD, Holman RR, Turner RC. High prevalence of a missense mutation of the glucokinase gene in gestational diabetic patients due to a founder-effect in a local population. *Diabetologia*. 1996; 39:1325-1328.

Sander M, Neubüser A, Kalamaras J, Ee HC, Martin GR, German MS. Genetic analysis reveals that Pax6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Dev*. 1997; 11:1662-1673.

Scott LJ, Bonnycastle LL, Willer CJ, Sprau AG, Jackson AU, Narisu N, Duren WL, Chines PS, Stringham HM, Erdos MR, Valle TT, Tuomilehto J, Bergman RN, Mohlke KL, Collins FS, Boehnke M. Association of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) variants with type 2 diabetes in a Finnish sample. *Diabetes*. 2006; 55:2649-2653.

Servitja JM, Ferrer J. Transcriptional networks controlling pancreatic development and beta cell function. *Diabetologia*. 2004; 47:597-613.

Shaat N, Karlsson E, Lernmark A, Ivarsson S, Lynch K, Parikh H, Almgren P, Berntorp K, Groop L. Common variants in MODY genes increase the risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2006;49:1545-1551.

Shepherd M, Hattersley AT. 'I don't feel like a diabetic any more': the impact of stopping insulin in patients with maturity onset diabetes of the young following genetic testing. *Clin Med*. 2004; 4(2):144-147.

Shepherd M, Pearson ER, Houghton J, Salt G, Ellard S, Hattersley AT. No deterioration in glycemic control in HNF-1alpha maturity-onset diabetes of the young following transfer from long-term insulin to sulphonylureas. *Diabetes Care*. 2003; 26(11):3191-3192.

Shih DQ, Screenan S, Munoz KN, Philipson L, Pontoglio M, Yaniv M, Polonsky KS, Stoffel M. Loss of HNF-1alpha function in mice leads to abnormal expression of genes involved in pancreatic islet development and metabolism. *Diabetes*. 2001; 50:2472-2480.

Shih DQ, Stoffel M. Molecular etiologies of MODY and other early-onset forms of diabetes. *Curr. Diab. Rep*. 2002; 2:125-134.

Shimajiri Y, Shimabukuro M, Tomoyose T, Yogi H, Komiya I, Takasu N. PAX4 mutation (R121W) as a prodiabetic variant in Okinawans. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 302:342-344.

Shimomura H, Sanke T, Hanabusa T, Tsunoda K, Furuta H, Nanjo K. Nonsense Mutation of Islet-1 Gene (Q310X) Found in a Type 2 Diabetic Patient With a Strong Family History. *Diabetes* 2000; 49:1597-1600.

Schmid-Antomarchi H, De Weille J, Fosset M, Lazdunski M. *J Biol Chem*. The receptor for antidiabetic sulfonylureas controls the activity of the ATP-modulated K<sup>+</sup> channel in insulin-secreting cells. 1987; 262:15840-15844.

Schuit FC, Huypens P, Heimberg H, Pipeleers DG. Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes*. 2001; 50:1-11.

Silander K, Mohlke KL, Scott LJ, Peck EC, Hollstein P, Skol AD, Jackson AU, Deloukas P, Hunt S, Stavrides G, Chines PS, Erdos MR, Narisu N, Conneely KN, Li C, Fingerlin TE, Dhanjal SK, Valle TT, Bergman RN, Tuomilehto J, Watanabe RM, Boehnke M, Collins FS: Genetic variation near the hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  gene predicts susceptibility to type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004; 53:1141-1149.

Sladek FM, Zhong WM, Lai E, Darnell JE Jr. Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev*. 1990; 4:2353-2265.

Sreenan SK, Cockburn BN, Baldwin AC, Ostrega DM, Levisetti M, Grupe A, Bell GI, Stewart TA, Roe MW, Polonsky KS. Adaptation to hyperglycemia enhances insulin secretion in glucokinase mutant mice. *Diabetes*. 1998; 47:1881-1888.

Steger G. Thermal denaturation of double-stranded nucleic acids: prediction of temperatures critical for gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22:2760-2768.

Stoffel M, Duncan SA. The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4 $\alpha$  regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc Natl Sci USA* 1997; 94:13209-13214.

Stoffel M, Froguel P, Takeda J, Zouali H, Vionnet N, Nishi S, Weber IT, Harrison RW, Pilkis SJ, Lesage S, Vaxillaire M, Velho G, Sun F, Iris F, Passa P, Cohen D, Bell GI. Human glucokinase gene: Isolation, characterization, and identification of two missense mutations linked to early-onset non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7698-7702.

Stoffel M. Role of the hepatocyte nuclear factor network in maturity-onset diabetes of the young (MODY); in Matschinsky FM, Magnuson MA (eds). *Molecular Pathogenesis of MODYs*. *Frontiers in Diabetes*. Basel, Karger, 2000, Vol.15:251-264.

Stoffers DA <sup>a)</sup>, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nature Genetics* 1997; 17:138-139.

Stoffers DA <sup>b)</sup>, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nature Genetics* 1997; 15:106-110.

Stone LM, Kahn SE, Fujimoto WY, Deeb SS, Porto D Jr: A variation at position -30 of the  $\beta$ -cell glucokinase gene promoter is associated with reduced  $\beta$ -cell function in middle-aged Japanese-American men. *Diabetes*. 1996; 45 :422 - 428.

Stuart BS, Rosa G, Hirotaka W, Jeuhu W, Steven CG, Michael SG. Neurogenin3 and Hapatic Nuclear Factor 1 Cooperate in Activating Pancreatic Expression of Pax4. *J Biol Chem*. 2003; 278:38254-38259.

Tanizawa Y, Riggs AC, Dagogo-Jack S, Vaxillaire M, Froguel P, Liu L, Donis-Keller H, Permutt MA. Isolation of the human LIM/homeodomain gene islet-1 and identification of a simple sequence repeat polymorphism [corrected]. *Diabetes*. 1994; 43:935-941. Erratum in: *Diabetes* 1994; 43:1171.

Tappy L, Dussoix P, Iynedjian P, Henry S, Schneiter P, Zahnd G, Jequier E, Philippe J. Abnormal regulation of hepatic glucose output in maturity-onset diabetes of the young caused by a specific mutation of the glucokinase gene. *Diabetes*. 1997; 46:204-208.

Tattersall R. Maturity-onset diabetes of the young: a clinical history. *Diabet Med* 1998; 15:11-14.

Tattersall RB, Fajans SS. A difference between the inheritance of classical juvenile-onset and maturity-onset type diabetes of young people. *Diabetes*. 1975; 24:44-53.

Tattersall RB. Mild familial diabetes with dominant inheritance. *Q J Med*. 1974; 43:339-357.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1999; 22:5-19.

Thomas H, Jaschowitz K, Bulman M, Frayling TM, Mitchell SM, Roosen S, Lingott-Frieg A, Tack CJ, Ellard S, Ryffel GU, Hattersley AT. A distant upstream promoter of the HNF-4alpha gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mol Genet*. 2001; 10:2089-2097.

Thomson KL, Gloyn AL, Colclough K, Batten M, Allen LI, Beards F, Hattersley AT, Ellard S. European Caucasians with maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Hum Mutat*. 2003;22 :417.

Timsit J, Bellanne-Chantelot C, Dubois-Laforgue D, Velho G. Diagnosis and management of maturity-onset diabetes of the young. *Treat Endocrinol*. 2005;4(1):9-18.

Toaima D, Nake A, Wendenburg J, Praedicow K, Rohayem J, Engel K, Galler A, Gahr M, Lee-Kirsch MA. Identification of novel GCK and HNF1A/TCF1 mutations and polymorphisms in German families with maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Hum Mutat.* 2005; 25:503-510.

Urhammer SA, Fridberg M, Hansen T, Rasmussen SK, Moller AM, Clausen JO, Pedersen O. A prevalent amino acid polymorphism at codon 98 in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene is associated with reduced serum C-peptide and insulin responses to an oral glucose challenge. *Diabetes.* 1997; 46(5):912-916.

van Vliet-Ostaptchouk JV, Shiri-Sverdlov R, Zhernakova A, Strengman E, van Haeften TW, Hofker MH, Wijmenga C. Association of variants of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) with susceptibility to type 2 diabetes in the Dutch Breda cohort. *Diabetologia.* 2007; 50:59-62. Epub 2006 Oct 10.

Vaxillaire M, Dina C, Lobbens S, Dechaume A, Vasseur-Delannoy V, Helbecque N, Charpentier G, Froguel P. Effect of common polymorphisms in the HNF4alpha promoter on susceptibility to type 2 diabetes in the French Caucasian population. *Diabetologia.* 2005; 48:440-444.

Velho G, Blanché H, Vaxillaire M, Bellanné-Chantelot C, Pardini VC, Timsit J, Passa Ph, Deschamps I, Robert JJ, Weber IT, Marotta D, Pilkis SJ, Lipkind GM, Bell GI, Froguel P. Identification of 14 new glucokinase mutations and description of the clinical profile of 42 MODY-2 families. *Diabetologia* 1997; 40: 217-224.

Velho G, Petersen KF, Perseghin G, Hwang JH, Rothman DL, Pueyo ME, Cline GW, Froguel P, Shulman GI. Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) subjects. *J Clin Invest.* 1996; 98:1755-1761.

Wang H, Maechler P, Hagenfeldt KA, Wollheim CB. Dominant-negative suppression of HNF-1alpha function results in defective insulin gene transcription and impaired metabolism-secretion coupling in a pancreatic beta-cell line. *EMBO J.* 1998; 17(22):6701-6713.

Wang L, Coffinier C, Thomas MK, Gresh L, Eddu G, Manor T, Levitsky LL, Yaniv M, Rhoads DB. Selective deletion of the Hnf1beta (MODY5) gene in beta-cells leads to altered gene expression and defective insulin release. *Endocrinology.* 2004; 145:3941-3949.

Wanic K, Malecki MT, Wolkow PP, Klupa T, Skupien J, Bobrek J, Kozek E, Krolewski AS, Sieradzki J. Polymorphisms in the gene encoding hepatocyte nuclear factor-4alpha and susceptibility to type 2 diabetes in a Polish population. *Diabetes Metab.* 2006; 32:86-88.

Weedon MN <sup>a)</sup>, Frayling TM, Shields B, Knight B, Turner T, Metcalf BS, Voss L, Wilkin TJ, McCarthy A, Ben-Shlomo Y, Davey Smith G, Ring S, Jones R, Golding J, Byberg L, Mann V, Axelsson T, Syvanen AC, Leon D, Hattersley AT. Genetic regulation of birth weight and fasting glucose by a common polymorphism in the islet cell promoter of the glucokinase gene. *Diabetes*. 2005; 54:576-581.

Weedon MN <sup>b)</sup>, Owen KR, Shields B, Hitman G, Walker M, McCarthy MI, Hattersley AT, Frayling TM. A large-scale association analysis of common variation of the HNF1alpha gene with type 2 diabetes in the U.K. Caucasian population. *Diabetes*. 2005; 54:2487-2491.

Weedon MN, Owen KR, Shields B, Hitman G, Walker M, McCarthy MI, Love-Gregory LD, Permutt MA, Hattersley AT, Frayling TM: Common variants of the hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  P2 promoter are associated with type 2 diabetes in the U.K. population. *Diabetes*. 2004; 53:3002-3006.

Weng J, Macfarlane WM, Lehto M, Gu HF, Shepherd LM, Ivarsson SA, Wibell L, Smith T, Groop LC. Functional consequences of mutations in the MODY4 gene (IPF1) and coexistence with MODY3 mutations. *Diabetologia*. 2001; 44:249-258.

Winckler W, Burt NP, Holmkvist J, Cervin C, de Bakker PI, Sun M, Almgren P, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Ardlie KG, Daly MJ, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop L. Association of common variation in the HNF1alpha gene region with risk of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005; 54:2336-2342.

Yamada K, Yuan X, Ishiyama S, Ichikawa F, Kohno S, Shoji S, Hayashi H, Nonaka K. Identification of a single nucleotide insertion polymorphism in the upstream region of the insulin promoter factor-1 gene: an association study with diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1998; 41:603-605.

Yamada K, Yuan X, Ishiyama S, Ichikawa F, Koyama KI, Koyanagi A, Koyama W, Nonaka K: Clinical characteristics of Japanese men with glucokinase gene  $\beta$ -cell promoter variant. *Diabetes Care*. 1997; 20 :1159 -1161.

Yamada S, Tomura H, Nishigori H, Sho K, Mabe H, Iwatani N, Takumi T, Kito Y, Moriya N, Muroya K, Ogata T, Onigata K, Morikawa A, Inoue I, Takeda J. Identification of Mutations in the Hepatocyte Nuclear Factor-1 $\alpha$  Gene in Japanese Subjects With Early- Onset NIDDM and Functional Analysis of the Mutant Proteins. *Diabetes* 1999; 48:645-648.

Yamagata K <sup>a)</sup>, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, Southam L, Cox RD, Lathrop GM, Boriraj VV, Chen X, Cox NJ, Oda Y, Yano H, Le Beau MM, Yamada S, Nishigori H, Takeda J, Fajans SS, Hattersley AT, Iwasaki N, Hansen T, Pedersen O, Polonsky KS, Turner RC, Velho G, Cheer J-C, Froguel P, Bell GI. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature*. 1996; 384:455-458.



Yamagata K<sup>b)</sup>, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, Fajans SS, Signorini S, Stoffel M, Bell GI. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature*. 1996; 384:458-460.

Yang Q, Yamagata K, Yamamoto K, Miyagawa J, Takeda J, Iwasaki N, Iwahashi H, Yoshiuchi I, Namba M, Miyazaki J, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Structure/function studies of hepatocyte nuclear factor-1alpha, a diabetes-associated transcription factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 266: 196-202.

Yoshiuchi I, Yamagata K, Yang Q, Iwahashi H, Okita K, Yamamoto K, Oue T, Imagawa A, Hamaguchi T, Yamasaki T, Horikawa Y, Satoh T, Nakajima H, Miyazaki J, Higashiyama S, Miyagawa J, Namba M, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Three new mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  gene in Japanese subjects with diabetes mellitus: clinical features and functional characterization. *Diabetologia* 1999; 42: 621-626.

Zaidi FK, Wareham NJ, McCarthy MI, Holdstock J, Kalloo-Hosein H, Krook A, Swinn RA, O'Rahilly S. Homozygosity for a common polymorphism in the islet-specific promoter of the glucokinase gene is associated with a reduced early insulin response to oral glucose in pregnant women. *Diabet Med*. 1997; 14:228 -234.

Zhang Y., Warren-Perry M., Saker P.J., Hattersley A.T., Mackie A.D., Baird J.D., Greenwood R.H., Stoffel M., Bell G.I., Turner R.C. Candidate gene studies in pedigrees with maturity-onset diabetes of the young not linked with glucokinase. *Diabetologia*. 1995; 38:1055-1060.

Zhu Q, Yamagata K, Miura A, Shihara N, Horikawa Y, Takeda J, Miyagawa J, Matsuzawa Y. T130I mutation in HNF-4alpha gene is a loss-of-function mutation in hepatocytes and is associated with late-onset Type 2 diabetes mellitus in Japanese subjects. *Diabetologia*. 2003; 46:567-573.

Zouali H, Vaxillaire M, Lesage S, Sun F, Velho G, Vionnet N, Chiu K, Passa P, Permutt A, Demenais F, Cohen D, Beckman JS, Froguel P. Linkage analysis and molecular scanning of glucokinase gene in NIDDM families. *Diabetes*. 1993; 42:1238-1245.

Zung A, Glaser B, Nimri R, Zadik Z. Glibenclamide treatment in permanent neonatal diabetes mellitus due to an activating mutation in Kir6.2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89:5504-5507.

## 17. PŘÍLOHY

V příloze jsou uvedeny grantové úkoly, na kterých jsem spolupracovala či dosud spolupracuji, seznam publikační a přednáškové činnosti a účast na zahraničních a domácích sympoziích.

### 17.1 ÚČAST NA GRANTOVÝCH PROJEKTECH

**1999–2003:** výzkumný záměr EÚ – MZ 000000023761; Klíčové problémy rozvoje endokrinologie a řešení metabolických poruch VZ: (odp. řešitel Prof. MUDr. RNDr. Stárka Luboslav, DrSc.)

**1999–2003:** IGA MZ ČR NB/5395-5; Genetické příčiny NIDDM a jeho komplikací – studium genů „kandidátů“ (hl. řešitel RNDr. Běla Bendlová, CSc. – hodnoceno A, navrženo na Cenu ministra zdravotnictví)

**2000–2002:** KONTAKT CZE 020-00 MŠMT; Genetické příčiny gestačního diabetu (hl. řešitel RNDr. Běla Bendlová, CSc. – mezinárodní projekt)

**2000–2002:** KONTAKT ME 464; Hledání genetických příčin gestačního diabetu (hl. řešitel RNDr. Běla Bendlová, CSc. – mezinárodní projekt)

**2000–2005:** COST OC.B17.10 MŠMT; „Insulin resistance, obesity and diabetes mellitus in the elderly“ (hl. řešitel RNDr. Běla Bendlová, CSc. – mezinárodní projekt)

**2004–2006:** GA ČR 301/04/1085; Studium genetického pozadí syndromu polycystických ovárií (hl. řešitel RNDr. Běla Bendlová, CSc.)

**2004–2008:** IGA MZ ČR NR/7809-5; Studium kandidátních genů a jejich role v patogenezi diabetes mellitus 2. typu a gestačního diabetu (hl. řešitel RNDr. Běla Bendlová, CSc.)

## 17.2 PUBLIKAČNÍ ČINNOST

Šamalíková P., Bendlová B., Včelák J.: MODY (Maturity-onset diabetes of the young)-nové poznatky o kandidátních genech. DMEV 2002: 5(1); 238-245.

Dušková M., Čermáková I., Hill M., Vaňková M., Šamalíková P., Stárka L.: What may be the markers of the male equivalent of polycystic ovary syndrome? *Physiol Res.* 2004: 53; 287-294. (IF = 1,140)

Bendlova B, Zavadilova J, Vankova M, Vejrazkova D, Lukasova P, Vcelak J, Hill M, Cibula D, Vondra K, Starka L, Vrbikova J.: Role of D327N sex hormone-binding globulin gene polymorphism in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007: 104; 68-74. (IF = 2,715)

Bendlova B., Vankov M., Zajickova K., Hill M., Zemanova A., Cibula D., Vejrazkova D., Lukasova P., Vcelak J., Vondra K., Vrbikova J.: LRP5 C/T polymorphism in exon 18 is associated with C peptide and proinsulin levels in patients with polycystic ovary syndrome and controls. *Fertil Steril* 2007; podáno. (IF = 3,114)

Šrámková D., Krejbichová Š., Včelák J., Vaňková M., Šamalíková P., Hill M., Kvasničková H., Dvořáková K., Hainer V., Vondra K., Bendlová B. The UCP1 gene polymorphism A-3826G in relation to type 2 diabetes mellitus and body composition in Czech population. *Exp Clin Endocrinol Diab* 2007; v tisku. (IF = 1,367)

Lukášová P., Včelák J., Vaňková M., Vejražková D., Bendlová B.: Regulační síť transkripčních faktorů: klíčová role ve vývoji a funkci pankreatu. *ČLČ* 2007: 146 (3); 227-234.

Vaňková M., Lukášová P., Zemanová A., Včelák J., Vejražková D., Mazura I., Bendlová B.: Genetické příčiny mitochondriálního diabetu. *ČLČ* 2007: 146 (3); 235-239.

Bendlová B., Vaňková M., Lukášová P., Včelák J., Vejražková D., Kunešová M., Vrbíková J., Zajíčková K., Žofková I., Vondra K., Hainer V.: Studium genetických příčin polygenně determinovaných endokrinopatií – aneb trpělivostí k úspěchu. *ČLČ* 2007: 146 (3); 198-204.

Lukášová P., Včelák J., Vaňková M., Vejražková D., Andělová K., Bendlová B.: Screening of mutations and polymorphisms in the glucokinase gene in the Czech diabetic and healthy control populations. *Physiol Res.* 2007; podáno. (IF = 1,806)

### **17.3 PŘEDNÁŠKOVÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST –**

#### **ÚČAST NA ZAHRANIČNÍCH SYMPOZIÍCH**

Včelák J., Šamalíková P., Selisko T., Schwarz P.E.H., Bendlová B.: Teplotní gradientová gelová elektroforéza - rychlá metoda screeningu mutací HNF1-alfa genu. XVIII. Biochemický zjazd s mezinárodní účastí, Stará Lesná 10.–13. 9. 2002. Zborník S2.29. (diskutovaný poster)

Vcelak, J., Samalikova, P., Andělová, K., Selisko, T., Schwarz, P., Schulze, J., Bendlova, B.: Neurogenin 3 gene polymorphism (Ser199Phe) in the Czech and German diabetic patients and controls. 18th International Diabetes Federation Congress Paris, France, 24.–29. 8. 2003, Diabetes and Metabolism 2003: 29; 4S49:1473. (diskutovaný poster)

Šrámková D., Vaňková D., Šamalíková P., Včelák J., Hainer V., Bendlová B.: The Kir6.2 gene E23K SNP in relation to DM2 in Czech population. 13th European Congress on Obesity, Prague, Czech Rep., 26.–29. 5. 2004, Int. J. Obesity 2004: 28 (suppl. 1); T3: P3-025. (poster)

Vaňková M., Šrámková D., Šamalíková P., Včelák J., Hainer V., Bendlová B.: Study of the association of Gln27Glu variant of the beta2-adrenoreceptor gene with obesity and diabetes mellitus type 2. 13th European Congress on Obesity, Prague, Czech Rep., 26.–29. 5. 2004, Int. J. Obesity 2004: 28 (suppl. 1); T3: P3-031. (poster)

Vaňková M., Šrámková D., Šamalíková P., Kvasničková H., Včelák J., Vondra K., Bendlová B.: Beta-cell function and insulin resistance in relation to candidate genes of diabetes mellitus type 2 in Czech. 40th Annual Meeting of EASD, Munchen, 5.–9. 9. 2004, Diabetologia 2004: 47 (Suppl.1) 572:A209. (diskutovaný poster)

Bendlova B., Vcelak J., Vankova M., Sramkova D., Samalikova P., Kvasnickova H., Vondra K.: The genetic background study of the oGTT glucose curve types in czech population. 40th Annual Meeting of EASD, Munchen, 5.–9. 9. 2004, Diabetologia 2004: 47 (Suppl.1) 517:A189. (diskutovaný poster)

Lukášová-Šamalíková P., Včelák J., Šrámková D., Vaňková M., Andělová K., Bendlová B.: Screening mutací a polymorfismů v genu pro glukokinázu v české diabetické a nediatetické populaci. XXVII. Endokrinologické dni s mezinárodní účastí, Piešťany 30. 9. – 2. 10. 2004. Interná medicína 2004: 9. (Supl.3): 41. (diskutovaný poster)

Šrámková D., Vaňková M., Šamalíková P., Včelák J., Vondra K., Bendlová B. (2004): Polymorfismy E23K genu KCNJ11 a G-886A genů UCP2 ve vztahu k DM2 u české populace. XXVII. Endokrinologické dni s mezinárodní účastí, Piešťany 30. 9. – 2. 10. 2004. Interná medicína 2004: 9. (Supl.3): 41. (diskutovaný poster)

Včelák J., Šrámková D., Vaňková M., Šamalíková P., Kvasničková H., Vondra K., Bláha P., Bendlová B. (2004): Je somatotyp spojen s některými ze sedmi kandidátních genů obezity a DM? XXVII. Endokrinologické dni s mezinárodní účastí, Piešťany 30. 9. – 2. 10. 2004. Interná medicína 2004: 9. (Supl.3): 19. (přednáška)

Vaňková M., Šrámková D., Šamalíková P., Včelák J., Kvasničková H., Vondra K., Bláha P., Bendlová B. (2004): Inzulínová rezistence a funkce beta-buněk ve vztahu ke kandidátním genům DM2. Je somatotyp spojen s některými ze sedmi kandidátních genů obezity a DM? XXVII. Endokrinologické dni s mezinárodní účastí, Piešťany 30. 9. – 2. 10. 2004. Interná medicína 2004: 9. (Supl.3): 19. (přednáška)

Bendlová B., Šrámková D., Vaňková M., Šamalíková P., Včelák J., Stanická S., Dvořáková K., Vondra K., Cibula D., Vrbíková J. (2004): Rizikové polymorfismy genů UCP1 a PPAR2 u pacientek se syndromem polycystických ovárií. XXVII. Endokrinologické dni s mezinárodní účastí, Piešťany 30. 9. – 2. 10. 2004. Interná medicína 2004: 9. (Supl.3): 23. (přednáška)

Bendlová B., Šrámková D., Vaňková M., Šamalíková P., Včelák J., Stanická S., Dvořáková K., Vondra K., Cibula D., Vrbíková J.: The risk polymorphisms of UCP1 and PPARG2 genes in patients with polycystic ovary syndrome. Carotenoids and Dietary Lipids in Health and Disease and COST B17 WG1 Action. Krakow 9.–12. 12. 2004, Acta Angiologica 2004: 10: 35. (vyzvaná přednáška)

Vaňková M., Šrámková D., Šamalíková P., Včelák J., Kvasničková H., Vondra K., Bendlová B.: Insulin resistance and the beta cell function in relation to selected DM2 candidate genes. Carotenoids and Dietary Lipids in Health and Disease and COST B17 WG1 Action. Krakow 9.–12. 12. 2004, Acta Angiologica 2004: 10: 35-36. (krátké sdělení)

Šrámková D., Vaňková M., Šamalíková P., Včelák J., Hainer V., Bendlová B.: The KCNJ11 gene polymorphism E23K in relation to DM2 in Czech population. Carotenoids and Dietary Lipids in Health and Disease and COST B17 WG1 Action. Krakow 9.–12. 12. 2004, Acta Angiologica 2004: 10: 36. (krátké sdělení)

M. Vankova, D. Sramkova, P. Lukasova, J. Vcelak, S. Stanicka, K. Dvorakova, K. Vondra, D. Cibula, J. Vrbikova, B. Bendlova: UCP1 (A-3826G) and PPARG2 (Pro12Ala) polymorphisms in women with polycystic ovary syndrome. 24th Joint Meeting of the British Endocrine Societies, Harrogate 4.–6. 4. 2005. Endocrine Abstracts 2005:9; P77. (diskutovaný poster)

**P. Lukasova**, J. Vcelak, M. Vankova, K. Andelova, B. Bendlova: Screening of mutations and polymorphisms in the glucokinase gene in the Czech diabetic and healthy control populations. Les 48èmes Journées Internationales d'Endocrinologie Clinique Henri-Pierre Klotz, Paris, 19.–20. 5. 2005. Annales d'endocrinologie 2005: 66 (3); 313. (poster)

**P. Lukasova**, J. Vcelak, D. Sramkova, M. Vankova, K. Andelova, B. Bendlova: A Newly detected mutation in the glucokinase gene in a Czech family with maturity-onset diabetes of the young. 41th Annual Meeting of EASD, Athens 12.–15. 9. 2005. Diabetologia 2005: 48. (Suppl.1) 312:A118. (diskutovaný poster)

B. Bendlova, D. Sramkova, D. Burkonova, M Vankova, **P. Lukasova**, J. Vcelak, K. Vondra: Free fatty acids concentration and composition is associated with family history of diabetes mellitus type 2 in healthy Czech subjects. 41th Annual Meeting of EASD, Athens 12.–15. 9. 2005. Diabetologia 2005: 48. (Suppl.1) 620:A228. (diskutovaný poster)

Vejražková D., Vaňková M., **Lukášová P.**, Včelák J., Kvasničková H., Vondra K., Bendlová B.: The KCNJ11 E23K and UCP2 G-866A SNPs in relation to DM2 in Czech population. 8th European Congress of Endocrinology incorporating the British Endocrine Societies. 1–5 April 2006, Glasgow, UK. Endocrine Abstracts 11: P386. (diskutovaný poster)

Vrbíková J., Zavadilová J., Vaňková M., Vejražková D., **Lukášová P.**, Včelák J., Dvořáková K., Vondra K., Bendlová B.: Role of D327N sex-hormone binding globulin gene polymorphism in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. 8th European Congress of Endocrinology incorporating the British Endocrine Societies. 1–5 April 2006, Glasgow, UK. Endocrine Abstracts 11: P709. (diskutovaný poster)

**Lukášová P.**, Spálová J., Včelák J., Vaňková M., Vondra K., Hainer V., Bendlová B.: Neuromedin beta: the polymorphism P73T in Czech diabetic and nondiabetic populations. 42 nd Annual Meeting EASD, Copenhagen, Malmö, 14.–17. 9. 2006, Diabetologia 2006: 49 (Suppl 1); 462: A0762. (diskutovaný poster)

Bendlová B., Včelák J., Vaňková M., **Lukášová P.**, Vejražková D., Zemanová A., Andělová K., Kvasničková H., Vondra K.: Association of neurogenin 3 polymorphisms with insulin secretion. 42 nd Annual Meeting EASD, Copenhagen, Malmö, 14.–17. 9. 2006, Diabetologia 2006: 49 (Suppl 1); 384:A0632. (diskutovaný poster)

Vejražková D., Včelák J., Vaňková M., **Lukášová P.**, Kvasničková H., Bláha P., Vondra K., Bendlová B.: Candidate gene polymorphism for obesity and DM2: association with the somatotypes. 42 nd Annual Meeting EASD, Copenhagen, Malmö, 14.–17. 9. 2006, Diabetologia 2006: 49 (Suppl 1);461:A0761. (diskutovaný poster)

Zavadilová J., Dušková M., Stárka L., Vrbíková J., Vaňková M., Vejražková D., Lukášová P., Včelák J., Čermáková I., Bendlová B.: Androgenní alopecie (AGA) a role polymorfismu D327N SHBG genu. 29. Endokrinologické dni, Ružomberok, Slovensko, 21.–23. 9. 2006. DMEV 2006: 9(3): 144-145. (přednáška)

## **17.4 PŘEDNÁŠKOVÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST –**

### **ÚČAST NA DOMÁCÍCH SYMPOZIÍCH**

Včelák J., Bendlová B., Selisko T., Šamalíková P., Schwartz P., Schulze J., Graessler J.: Hledání mutací v HNF-1 $\beta$  genu u diabetiků 2. typu s nefropatií. XXXVI. Diabetologické dny v Luhačovicích. 13.–15. 4. 2000. DMEV 2000. 3 (suppl.1): 94:A54. (poster)

Včelák J., Šamalíková P., Selisko T., Schwarz P., Graessler J., Schulze J., Bendlová B.: Teplotní gradientová gelová elektroforéza - účinná metoda screeningu mutací v MODY genech. XXXVII. Diabetologické dny v Luhačovicích. 19.–21. 4. 2001. DMEV 2001: 4 (suppl.1): 8:A6. (poster)

P. Šamalíková, J. Včelák, T. Selisko, K. Andělová, B. Bendlová: Screening mutací a polymorfismů v genu pro glukokinázu v české populaci diabetiků, jejich potomků a gestačních diabetiček pomocí TGGE. XXXVIII. Diabetologické dny v Luhačovicích. 17.–20. 4. 2002. DMEV 2002: 5 (suppl.1): 48:A73. (přednáška)

Včelák J., Selisko T., Šamalíková P., Schwarz P., Andělová K., Schulze J., Bendlová B.: Hepatocytární nukleární faktor-1 $\alpha$  a gestační diabetes. XXXVIII. Diabetologické dny v Luhačovicích. 17.–20. 4. 2002. DMEV 2002: 5 (suppl.1): 58:A92. (diskutovaný poster)

Včelák J., Šamalíková P., Andělová K., Selisko T., Schwarz P., Schulze J., Bendlová B.: Studium polymorfismů genu pro neurogenin3 v české a německé populaci a jejich role v patogenezi diabetu. XXXIX. Diabetologické dny s mezinárodní účastí, Luhačovice 24.–26.4.2003. DMEV 2003: 6 (suppl.1); 60:A79. (přednáška)

Šrámková D., Vaňková M., Šamalíková P., Včelák J., Hainer V., Bendlová B.: Polymorfismus E23K genu KIR6.2 ve vztahu k diabetes mellitus 2. typu v České republice. XL. Diabetologické dny s mezinárodní účastí, Luhačovice, 22.–24. 4. 2004, DMEV 2004: 7 (suppl. 1); 44:A55. (diskutovaný poster)

Vaňková M., Šrámková D., Šamalíková P., Včelák J., Bendlová B.: Vliv polymorfismu (Gln27Glu) B2AR na obezitu a diabetes mellitus 2. typu. XL. Diabetologické dny s mezinárodní účastí, Luhačovice, 22.–24. 4. 2004, DMEV 2004: 7 (suppl. 1); 47:A59. (diskutovaný poster)

Lukášová P., Včelák J., Šrámková D., Vaňková M., Andělová K., Bendlová B.: Glukokináza: genové varianty v české diabetické a kontrolní populaci. XLI. Diabetologické dny s mezinárodní účastí, Luhačovice, 20.–23. 4. 2005, DMEV 2005: 8 (suppl. 1); 34:A53. (diskutovaný poster)

Vaňková M., Šrámková D., Lukášová P., Včelák J., Kvasničková H., Vondra K., Bendlová B.: Metabolický syndrom u lidí s rodinnou anamnézou DM2. XLI. Diabetologické dny s mezinárodní účastí, Luhačovice, 20.–23. 4. 2005, DMEV 2005: 8 (suppl. 1); 50:A86. (diskutovaný poster)

Šrámková D., Burkoňová D., Vaňková M., Lukášová P., Včelák J., Vondra K., Bendlová B.: Interakce složení volných mastných kyselin s polymorfismem v PPAR $\gamma$ 2 genu. XLI. Diabetologické dny s mezinárodní účastí, Luhačovice, 20.–23. 4. 2005, DMEV 2005: 8 (suppl. 1); 47:A80. (diskutovaný poster)

Bendlová B., Včelák J., Šrámková D., Vaňková M., Lukášová P., Kvasničková H., Hampl R., Stárka L., Vondra K.: Dehydroepiandrosteron u české nediabetické populace. XLI. Diabetologické dny s mezinárodní účastí, Luhačovice, 20.–23. 4. 2005, DMEV 2005: 8 (suppl. 1); 12:A6. (diskutovaný poster)

Včelák J., Vejražková D., Vaňková M., Lukášová P., Kvasničková H., Vondra K., Bendlová B.: Srovnání inzulínového tolerančního testu s indexy inzulínové rezistence odvozenými z oGTT. XXVIII. Endokrinologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc. 20.–22. 10. 2005. Program a abstrakta: 42. (přednáška)

Bendlová B., Včelák J., Vejražková D., Vaňková M., Lukášová P., Kvasničková H., Vrbíková J., Hampl R., Stárka L., Vondra K.: DHEA(S) ve vztahu k obezitě, inzulínové rezistenci a lipidovému spektru u potomků diabetiků 2. typu a kontrol. XXVIII. Endokrinologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc. 20.–22. 10. 2005. Program a abstrakta: 78. (přednáška)

Zavdilová J., Vrbíková J., Vaňková M., Vejražková D., Lukášová P., Včelák J., Dvořáková K., Vondra K., Bendlová B.: Role polymorfismu D327N SHBG genu v patogenezi syndromu polycystických ovárií. XXVIII. Endokrinologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc. 20.–22. 10. 2005. Program a abstrakta: 157. (poster)

Vaňková M., Včelák J., Vejražková D., Lukášová P., Kvasničková H., Vondra K., Bendlová B.: Vliv hormonální antikoncepce na metabolismus. XXVIII. Endokrinologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc. 20.–22. 10. 2005. Program a abstrakta: 159. (poster)



Vejražková D., Vaňková M., **Lukášová P.**, Včelák J., Kvasničková H., Vondra K., Bendlová B.: Polymorfismus E23K genu KCNJ11 a G-866A genu UCP2 u české diabetické a nediabetické populace. XXVIII. Endokrinologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc, 20.–22. 10. 2005. Program a abstrakta: 183. (poster)

**Lukášová P.**, Vejražková D., Vaňková M., Včelák J., Vrbíková J., Andělová K., Kvasničková H., Dvořáková K., Vondra K., Bendlová B.: Polymorfismus E23K v genu KCNJ11 u české populace gestačních diabetiček, žen se syndromem polycystických ovárií a kontrolní skupiny zdravých žen. XLII. Diabetologické dny s mezinárodní účastí, Luhačovice, 20.–22. 4. 2006, DMEV 9 (suppl. 2): 36:A50. (diskutovaný poster)

Bendlová B., Včelák J., Vaňková M., **Lukášová P.**, Vejražková D., Kvasničková H., Dvořáková K., Vondra K.: Inzulínová rezistence – porovnání indexů odvozených z oGTT a inzulínového tolerančního testu a její genetické pozadí. XLII. Diabetologické dny s mezinárodní účastí, Luhačovice, 20.–22. 4. 2006, DMEV 9 (suppl. 2): 16:A7. (diskutovaný poster)

Včelák J., Vaňková M., **Lukášová P.**, Vejražková D., Zemanová A., Andělová K., Kvasničková H., Vondra K., Bendlová B.: Vztah polymorfismů neurogeninu 3 k inzulínové rezistenci. XLII. Diabetologické dny s mezinárodní účastí, Luhačovice, 20.–22. 4. 2006, DMEV 9 (suppl. 2): 50:A76. (diskutovaný poster)