

A DIABETES ÉS A KOMORBID DEPRESSZIÓ GENETIKAI VONATKOZÁSAI



Doktori (Ph. D.) értekezés

DR. NAGY GÉZA

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Prof. Dr. Somogyi Anikó DSc

Hivatalos bírálók: Dr. Szalai Csaba DSc.
Dr. Farkas Klára PhD.

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Gerő László DSc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Prechl József PhD.
Dr. Reismann Péter PhD.

Budapest
2011

A munka molekuláris genetikai része
a Semmelweis Egyetem
Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézetében,
Prof. Dr. Sasvári-Székely Mária laboratóriumában készült.

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS.....	1
IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	3
2.1. A humán genom variabilitása.....	3
2.1.1. A genetikai információ megfejtése – a Humán Genom Projekt.....	3
2.1.2. Mennyire különbözik a különböző emberek genomja?	3
2.1.3. A genetikai asszociáció-vizsgálatok fő típusai.....	5
2.1.4. PCR-amplifikáció.....	6
2.2. A diabetes genetikai tényezői.....	10
2.2.1. Monogénis öröklésmentű diabetes típusok.....	11
2.2.2. A komplex öröklődésű diabetes genetikai rizikófaktorai.....	15
2.3. A diabetes és a komorbid depresszió	21
2.3.1. A depresszió diagnózisa és a depresszív tünetek mérése	21
2.3.2. A depresszió és a monoaminerg rendszer	23
2.3.3. A depresszió néhány kandidáns génje.....	24
2.3.4. A diabetes és depresszió komorbiditásának okai	28
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	32
4. MÓDSZEREK.....	34
4.1. Résztvevők	34
4.2. Hangulatmérő kérdőív	34
4.3. Szájnyálkahártya-mintavétel és DNS-izolálás	35
4.4. Polimorfizmusok vizsgálata	35
4.4.1. Hosszúság-polimorfizmusok vizsgálata	35
4.5. Statisztikai módszerek.....	37
5. EREDMÉNYEK.....	38
5.1. A diabetes új genetikai faktorai.....	38
5.1.1. A Kv1.3 (KCNA3) gén -1645C/T SNP vizsgálati módszerének kiválasztása.	38
5.1.2. A Kv1.3 (KCNA3) gén -1645CT SNP eset-kontroll vizsgálata	40
5.1.3. A HIF-1 α gén 45035 C/T (rs11549465) SNP vizsgálata.....	41
5.2. A diabetezzel komorbid depresszió genetikai tényezői	46
5.2.1. A vizsgált betegcsoport jellemzői	46
5.2.2. Hangulati jellemzők az eltérő anyagcseréjű betegcsoportokban.....	47
5.2.3. A genetikai polimorfizmusok hatása a hangulati jellemzőkre	48
6. MEGBESZÉLÉS.....	53
6.1. A diabetes új kandidáns génjei	53
6.1.1. KCNA3.....	53
6.1.2. HIF-1 α	55
6.1.3. Az 1-es és a 2-es típusú diabetes közös genetikai rizikófaktorai	58
6.2. A diabetes és a depresszióra való hajlam kölcsönhatása.....	59
6.2.1. Nem szerotonerg kandidáns gének vizsgálata.....	59
6.2.2. A szerotonerg rendszer polimorfizmusai	61
7. KÖVETKEZTETÉSEK.....	65
8. ÖSSZEFOGLALÁS	66
9. SUMMARY.....	67
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	68
11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	70
12. IRODALOMJEGYZÉK	72

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

- 1TDM 1-es típusú diabetes mellitus
- 2TDM 2-es típusú diabetes mellitus
- 5HTT 5-hidroxi-triptamin transzporter:
szerotonin-transzporter (SLC6A4)
- 5-HTTLPR 5-hidroxi-triptamin transzporter linked polymorphic region:
szerotonin-transzporter hosszúság polimorfizmus
- ABCC8 ATP-kötő kazetta transzporter alosztály C tag 8
- AD autoszomális domináns
- AGPAT 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase
- Ala alanin
- AR autoszomális recesszív
- Arg arginin
- BDI Beck Depression Inventory: Beck depresszió kérdőív
- BDNF Brain-Derived Neurotrophic Factor: agyi neurotrofikus faktor
- BMI body mass index: testtömeg-index
- BNO-10 Betegségek Nemzetközi Osztályozása 10
- bp bázispár
- BSCL Berardinelli-Seip Congenital total lipodystrophy:
Berardinelli-Seip szindróma
- C1QTNF6 complement 1q tumor necrosis factor related protein 6
- CCR7 kemokin receptor 7

- CDKAL1 CDK5 regulatory subunit associated protein 1-like 1
- CES-D Center for Epidemiologic Studies Depression Scale
- CLEC16A C-type lectin domain family 16, member A
- CTLA citotoxikus T-limfocita asszociált protein
- CTSH cathepsin H
- DGI Diabetes Genetics Initiative
- DIAGRAM Diabetes Genetics, Replication And Meta-Analysis
- DM diabetes mellitus
- DSM-IV Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
- eNOS endothelialis nitrogén oxid szintáz
- ETT-TUKEB Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság
- Gln glutamin
- GLUT4 glükóz-transzporter 4-es típus
- GWAS Genome-Wide Association Study: teljes genom analízis
- HADS Hospital Anxiety and Depression Scale
- HADS-a HADS skála szorongás pontszám
- HADS-d HADS skála depressziós pontszám
- HbA1C glycált haemoglobin
- HDL High-Density Lipoprotein: magas denzitású lipoprotein
- HGP Human Genome Project
- HIF-1 α hypoxia-indukált faktor 1 α
- HLA humán leukocita antigén

- HNF-1 α hepatocyte nuclear factor-1 α
- IDDM inzulin dependens diabetes mellitus
- IFIH1 interferon-indukált helikáz 1
- IL2RA interleukin 2 receptor alfa gén
- INSR inzulin receptor
- IPF-1 inzulin promotor faktort 1
- KA kielégítő szénhidrát-anyagcseréjű csoport
- kb kilobázis
- KCNA3 voltage-gated potassium channel protein 3:
feszültség-függő K-csatorna 3
- KCNJ11 potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11:
befelé rektifikáló kálium csatorna Kir6.2
- KCNQ1 potassium voltage-gated channel KQT-like subfamily 1:
KQT-szerű feszültség függő kálium csatorna
- kDa kilodalton
- KIR központi idegrendszer
- Kv.1.3 feszültség-függő depolarizáció aktivált K-csatorna (KCNA3)
- LMNA laminin A
- M metionin
- MANOVA Multivariate Analysis Of Variance:
többszempontos variancia analízis
- MAO monoamino-oxidáz

- MELAS mitokondriális myopathia, encephalopathia, laktát acidózis, s troke szerű epizódok szindrómája
- Met metionin
- MIDD Maternally Inherited Diabetes and Deafness
- MODY Maturity Onset Diabetes of the Young:
felnőtt diabétesz, mely fiataloknál jelentkezik
- NEO-PI-R NEO Personality Inventory – Revised személyiség kérdőív
- NeuroD1 Neurogenic differentiation 1 gén
- NK-sejtek Natural Killer cells: természetes ölósejtek
- OGTT orális glükóz tolerancia teszt
- OR Odds Ratio: Esély hányados
- P prolin
- P2RX7 purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7:
purinerg ioncsatorna gén
- PCR polimeráz-láncreakció
- PCR-RFLP polimeráz láncreakció- restrikciós fragment hosszúság
polimorfizmus
- PPAR Peroxisoma Proliferátor Aktivált Receptor
- PRKCQ protein kinase C theta
- Pro prolin
- PTPN protein tirozin foszfatáz, nem-receptor
- Q glutamin
- RA rossz szénhidrát-anyagcseréjű csoport

- RhA rheumatoid arthritis
- SLC30A8 solute carrier family 30 (zinc transporter), member 8
- SLCA4 szerotonin-transzporter gén
- SM Sclerosis Multiplex
- SNP Single Nucleotide Polymorphism:
Egy pontos nukleotid-polimorfizmus
- SPECT Single Photon Emission Computed Tomography
- SSRI Selective Serotonin Reuptake Inhibitors:
szelektív szerotonin-reuptake gátlók
- SSTR3 szomatosztatin-receptor 3
- STin2 szerotonin-transzporter intron 2 polimorfizmus
- TCF7L2 transcription factor 7-like 2 gén
- TPH2 triptofán-hidroxiláz 2
- UBASH3A ubiquitin-asszociált és SH3 doménnel rendelkező protein A gén
- Val valin
- VEGF vaszkuláris endotheliális növekedési faktor
- VHL von Hippel-Lindau
- VNTR variable number of tandem repeats: hosszúság-polimorfizmus
- WFS1 Wolfram szindróma-1 gén
- WHO World Health Organisation: Egészségügyi Világszervezet
- WTCC Wellcome Trust Case Control Consortium

ÁBRÁK JEGYZÉKE

1. ábra. A PCR reakció elve	6
2. ábra. Hosszúság polimorfizmusok genotipizálásának elve	7
3. ábra. A PCR-RFLP elve	8
4. ábra. A TaqMan® SNP genotipizáló rendszer elve	9
5. ábra. SNP genotipizálása TaqMan® rendszerrel	9
6. ábra. A Kv1.3 gén -1645CT SNP vizsgálata PCR-RFLP módszerével.	38
7. ábra. A Kv1.3 gén -1645CT SNP vizsgálata valós idejű PCR használatával	39
8. ábra. A HIF-1 α gén 45035 CT SNP vizsgálata PCR-RFLP-vel	42
9. ábra. A HIF-1 α gén 45035 CT SNP vizsgálata TaqMan próbával	43
10. ábra. Nemi hatás a HADS kérdőíves eredmények értékeiben.....	47
11. ábra. A TPH2 és a szénhidrát anyagszere-állapot kölcsönhatása a hangulati jellemzők vonatkozásában	50

TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

1.	táblázat. Monogénes öröklődésű diabetes típusok	14
2.	táblázat. Az 1-es típusú diabetes kandidáns génjei, illetve kromoszóma régiói	17
3.	táblázat. A 2-es típusú diabetes kandidáns génjei, illetve kromoszóma régiói.	20
4.	táblázat. A Kv1.3 gén -1645CT polimorfizmusának allél gyakoriság értékei.	40
5.	táblázat. A Kv1.3 gén -1645CT genotípus gyakoriság eloszlása.	41
6.	táblázat. A Hypoxia indukálta faktor-1 alfa (rs11549465) CT SNP genotípus megoszlása férfiak és nők között.	44
7.	táblázat. A HIF-1 α allél és genotípus megoszlása a kontroll és a cukorbeteg populáció összehasonlításánál	45
8.	táblázat. A HIF-1 α allél és genotípus megoszlása a kontroll, az 1-es típusú (1TDM) és a 2-es típusú (2TDM) csoportokban	45
9.	táblázat. A betegcsoport demográfiai és klinikai jellemzői	46
10.	táblázat. A kielégítő (KA) és a rossz anyagcseréjű (RA) cukorbetegek hangulati jellemzőinek összehasonlítása.....	48
11.	táblázat. Az 5-HTTLPR és a HADS kérdőíves eredmények	49
12.	táblázat. A TPH2 -703 G/T SNP és a HADS kérdőíves eredmények.....	49
13.	táblázat A BDNF gén polimorfizmusa és a HADS kérdőíves eredmények.....	51
14.	táblázat A P2RX7 gén Gln460Arg (A/G) hatása a szorongás és a depresszió pontszámokra.	52

BEVEZETÉS

A diabetes mellitus a 20. század végére, 21. század elejére olyan elterjedtté vált, hogy ma már népbetegségnek számít. A cukorbetegségben szenvedők számát 2000-ben 171 millió főre becsülték a 20 éven felüliek körében, és ez 2030-ra várhatóan 366 millióra fog növekedni. Magyarországon nincs központi regiszter, ami pontosan nyilvántartaná a cukorbetegeket, de az ismert cukorbetegek száma a népesség mintegy 5-5,5%-át teszi ki. Figyelemre méltó az is, hogy a szűrővizsgálatok általános tapasztalata szerint minden ismert cukorbetegre egy fel nem ismert diabetesben szenvedő esik. Így Magyarországon körülbelül egymillió főre tehető azok száma, akik diagnosztizált, vagy fel nem ismert diabetesben szenvednek [1].

A diabetes mellitus amellet, hogy népbetegség, előkelő helyet foglal el az úgynevezett civilizációs betegségek sorában. Civilizációs betegségeknek hívjuk azokat a kórokat, amelyek a társadalmak fejlődésével, a környezet szennyeződésének fokozódásával, az életmód és a szociális viszonyok változásával jönnek létre. A cukorbetegség ismeretlen volt a korábban a civilizációtól elzárt közösségekben egészen addig, amíg a „fehér ember” hatása meg nem jelent a környezetükben. Mára a nyugati civilizáció közvetítette „jólét” eredményeként igen nagy a 2-es típusú cukorbetegség gyakorisága körükben is.

A XX-XXI. század fordulójának egyik, népegészségügyi szempontból legfontosabb lelki betegsége a depresszió, mely 340 millió embert érint világszerte. Várhatóan a betegség jelentős terhet fog róni a társadalomra, hiszen az Egészségügyi Világszervezet (WHO) előrejelzése szerint 2020-ra a depresszió lesz a második leggyakoribb, munkaképesség-csökkenésért felelős megbetegedés [2] (leggyakoribbnak a szív és érrendszeri betegségeket jelzik).

A Hungarostudy szerint, mely egy Magyarországon 2002-ben végzett országos reprezentatív felmérés volt [3], enyhe depressziós tünetekről a megkérdezettek 27,3%-a számolt be. Közepesen súlyos vagy súlyos, tehát klinikai kezelést igénylő depressziós tüneteket a megkérdezettek 12,9%-nál találtak. A súlyos, mindenképpen mielőbbi kezelést igénylők aránya pedig 7,3% volt.

A depresszió nem egy múló hangulatingadozás, melyet lehangoló események, túlhajszoltság váltanak ki, hanem egy súlyos klinikai tünetmintázat, olyan súlyos pszichológiai zavar, amely elhúzódó természetű lelki gyötrelmekkel jár, a hónapok-évek

múltával egyre rosszabbá válhat, és a klinikai értelemben depressziós ember súlyos esetben a legegyszerűbb dolgok kivitelezésére is képtelenné válik, s tehetetlenségében megpróbál véget vetni életének. A depressziósok egy része képes fenntartani korábbi életvitelét, ám a betegség jelentősen csökkenti hatékonyságukat, és megfosztja őket örömeiktől.

Az elmúlt évek epidemiológiai vizsgálatainak összesítése alapján a diabeteses populációban, a depresszió átlagos prevalenciája 20%. A depresszió körülbelül két-háromszor gyakoribb diabetesesekben, mint a kor és nem szerint illesztett egészséges populációban [4].

Közös vonása e két népbetegségnek, hogy elsősorban a robbanásszerűen felgyorsuló társadalmi hatások révén létrejött káros környezeti tényezők és a megváltozott környezethez nem megfelelően adaptálódott gének elégtelen működése vezet a betegség kialakulásához. A diabetesre és a depresszióra hajlamosító környezeti tényezőkről, és a háttérükben rejlő biológiai mechanizmusról sok mindent felfedtek az elmúlt évek vizsgálatai, mégis egyik betegség kóroktana sem tekinthető tisztázottnak a mai napig. Talán ennek is köszönhető, hogy kezelésükre ugyan van lehetőség, de a ma ismert terápiás lehetőségek a betegeket nem gyógyítják meg véglegesen, a gyógyszeres kezeléseknek szerteágazó mellékhatásai vannak, és sok esetben a megfelelő kezelés ellenére sem sikerül e betegségek szövődményeit megelőzni.

Napjaink vizsgálatai, melyek e kórképek genetikai rizikófaktorainak megismerését tűzik ki célul, egyrészt hozzásegíthetnek a betegség korai szűréséhez, másrészt a genetikai rizikófaktorainak megismerése a két betegség ez idáig tisztázatlan pathogenezisének megismerését is elősegítheti, és a jövőben olyan farmakológia célpontokat tárhat fel, melyek új, hatékonyabb kezelési módok kifejlesztéséhez segíthetnek hozzá.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A HUMÁN GENOM VARIABILITÁSA

2.1.1. A GENETIKAI INFORMÁCIÓ MEGFEJTÉSE – A HUMÁN GENOM PROJEKT

A Humán Genom Projektet, 1989-ben alapította J. Watson. Ez a szervezet nemzetközi összefogással célozta meg a humán genom megfejtését, az első haploid kromoszóma-szett „betűinek”, azaz a humán DNS szekvenciának megismerését. A Humán Genom Projekt (HGP) első, úgynevezett „nyers” szekvenciájának közlésére 2001-ben került sor [5], mely a teljes szekvencia kb. 94%-át tartalmazta. Az eredményeket szabadon hozzáférhető adatbázisokban tették közzé (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), melyek azóta is folyamatos fejlesztés alatt állnak. Az eredmények szempontjából az egyik legizgalmasabb kérdés az volt, hogy hány génünk van? Az első eredmények alapján a fehérjét kódoló gének számát kb. 30-40 ezerre becsülték, később azonban ez a szám lényegesen csökkent. Ez egyben azt is jelentette, hogy az emberi testben kifejeződő fehérjéket kódoló rész kevesebb, mint 5%-ra becsülhető. A genetikai információ maradék 95%-nak pontos funkciója máig sem ismert.

A humán genom megfejtését időközben azonban egy, főleg gyógyszergyárak által támogatott privát konzorcium, a Celera is megcélozta. Eredményeiket ugyancsak 2001-ben, a Science hasábjain közzétették [6]. A Celera által megfejtett szekvencia is elérhető az interneten (<http://www.celera.com>), de használata nem ingyenes. Az eredmények szempontjából lényeges különbség, hogy ez a projekt jóval kevesebb (26 588) fehérjekódoló gént jósolt, mely közelebb áll a jelenlegi becslésekhez (18-19 ezer).

Az első, „nyers” szekvenciák közlése után mindkét konzorcium 2003-ban, a DNS kettős spirál felfedezésének 50. évfordulóján jelentette be a humán genom megfejtésének befejezését [7]. Ez sem jelent azonban 100%-os ismeretet, azaz maradtak kisebb, ismeretlen szekvenciájú hézagok, elsősorban a nem-kódoló, inkább a kromoszóma struktúráját meghatározó szakaszokban.

2.1.2. MENNYIRE KÜLÖNBÖZIK A KÜLÖNBÖZŐ EMBEREK GENOMJA?

A humán genom individuális különbségeinek vizsgálata viszonylag régóta folyik, de a variabilitás első pontos becsléseit két személy, a Nobel-díjas J. Watson [8] és a Celera vezetője, Craig Venter [9] teljes diploid genomjának analízise szolgáltatta. Ezek az adatok az előzetes eredmények alapján becsült 0,1%-nyi különbség mintegy ötszörösét igazolták

(legalább 0,5% különbség). Még ebben az évben meghatározták egy ázsiai [10], és egy afrikai [11] személy egyedi genomszekvenciáját is. Napjainkban, a DNS szekvenálási technikák rohamos fejlődésének eredményeképp egyre több ember teljes (diploid) genomját ismerjük meg (1000 genom project, <http://www.1000genomes.org/>), ami nagyban hozzájárul majd a populáció genetikai heterogenitásának jobb megismeréséhez.

A genetikai különbségeket szokás két kategóriába sorolni: mutációknak nevezik azokat a genetikai eltéréseket, melyek viszonylag ritkák, és általában monogénesen öröklődő, súlyos betegségekhez vezetnek. Polimorfizmus alatt értik az 1%-nál gyakrabban előforduló variánsokat, melyek hatása az egyedre nézve kicsi vagy semleges [12]. Ez a megkülönböztetés orvosi szempontból hasznos, mivel a monogénesen öröklődésű mutációk meghatározása klinikai szempontból fontos, míg a komplex öröklődésű variációk inkább csupán öröklött hajlamosító tényezőknek tekinthetők, melyek hatását más gének és a környezet is befolyásolja.

A rohamosan fejlődő technikák miatt egyre több új polimorfizmust fedeznek fel, melyeknek gyakorisága vagy hatásaik megismerése még várat magára, így gyakran nem tudjuk, hogy egy-egy genetikai variáns melyik kategóriába esik. Ezért ma már elterjedtebb a „polimorfizmus” kifejezés használata mindenféle genetikai variáció jelölésére. Formai szempontból az egyetlen bázispár cseréjét SNP-nek (single nucleotide polymorphism), míg a rövidebb-hosszabb szakaszok változó számú ismétlődését hosszúság-polimorfizmusnak nevezik.

2.1.2.1. Monogénesen öröklődésű betegségek (mutációk)

A súlyos rendellenességet okozó mutációk gyakorisága a populációban igen kicsi, mivel a mutáns allél változat nem terjedhet el a populációban. Így az egyetlen génhibán alapuló, monogénesen öröklődésű betegségek igen ritkák. Ugyanakkor, ha egy családban előfordul egy adott mutáció, ennek genetikai diagnózisa maximális prediktív értékkel bír. A monogénesen öröklődésű betegségek esetében igen nagy szerepe van a diagnosztikus és prognosztikus értékű genetikai diagnózisnak (lásd 2.2.1. fejezet).

A monogénesen öröklődésű betegségek megismerése elméleti szempontból is igen jelentős: megmutatja az adott gén funkciókiesésének következményeit az emberi szervezetben. Genetikai gyógyításának elméleti lehetősége a génterápia, melynek azonban ma még kevés példáját ismerjük. A mutáció pontos hatásmechanizmusának ismerete azonban sokat segít a megfelelő terápia kialakításában. Hazai kutatások is megerősítették például a

cisztás fibrózis [13], illetve a 21-hidroxiáz-hiány genetikai/prenatális diagnózisának jelentőségét [14-16].

2.1.2.2. Népbetegségek genetikai háttere

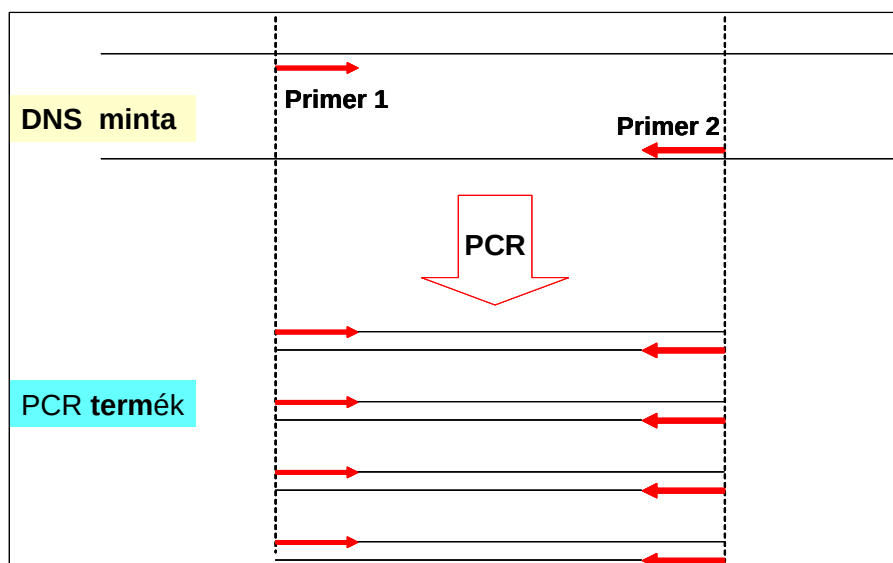
A gyakori betegségek hátterében csakis olyan genetikai tényezők állhatnak, melyek egyenként kis hatásúak, így a populációban elterjedhettek („Common Disease – Common Variant” elmélet [17]. Így a népbetegségek rizikófaktorai sokfélék, a genetikai (poligén öröklődés) és környezeti rizikófaktorok összjátéka alakítja ki a betegséget.

2.1.3. A GENETIKAI ASSZOCIÁCIÓ-VIZSGÁLATOK FŐ TÍPUSAI

A komplex öröklődésű betegségek genetikai hátterének kutatása genetikai asszociációvizsgálatokkal történik, melynek során egy egészséges és egy beteg populáció egy vagy több génjének variációit határozzuk meg. Jelenleg a legmodernebb módszer a **teljes genom asszociáció analízise (GWAS=Genome-Wide Association Study)**, melynek során a genom teljes területén szétszórta több ezer markert határoznak meg. A markerek ismert kromoszómális pozíciójú polimorfizmusok, általában SNP-k. Kérdés az, hogy mely markerek azok, melyek alléljai szignifikánsan különböznek a két csoport között. A betegcsoportban gyakrabban előforduló marker allélok alapján lokalizálható a betegséghez kapcsolódó kromoszómális régió. Az adott régió finom elemzésével meghatározhatók azok a gének, melyek kapcsolódnak (asszociálnak) a betegség előfordulásával. Mivel a fent leírt elemzéshez több ezer beteg SNP-chip analízise szükséges, a GWAS vizsgálatok igen költségesek, és általában nemzetközi konzorciumok munkájának eredményeképp jönnek létre [18]. Sajnos a GWAS eredményei gyakran ellentmondásosak, például a 2-es típusú diabetes vonatkozásában több GWAS is készült, melyek reprodukálható eredményeit egy nemrég megjelent meta-analízis értékeli [19].

A **kandidáns gének asszociáció-vizsgálata** során a vizsgálandó gének kiválasztása az adott betegség molekuláris mechanizmusában elméleti alapon feltételezhető komponensek alapján történik. A diabetes elméletileg feltételezett kandidáns génjei például az inzulin jelpálya alkotóiból, a hangulati zavarok legfontosabb kandidáns génjei a neurotranszmitterek (dopamin, szerotonin) felépítésében, lebontásában és visszavételének komponensei közül kerültek ki. Újabban a GWAS eredményei szolgáltatnak olyan új kandidáns géneket, melyek szerepe az adott pathomechanizmusban a GWAS eredményei alapján valószínűsíthető.

2.1.4. PCR-AMPLIFIKÁCIÓ



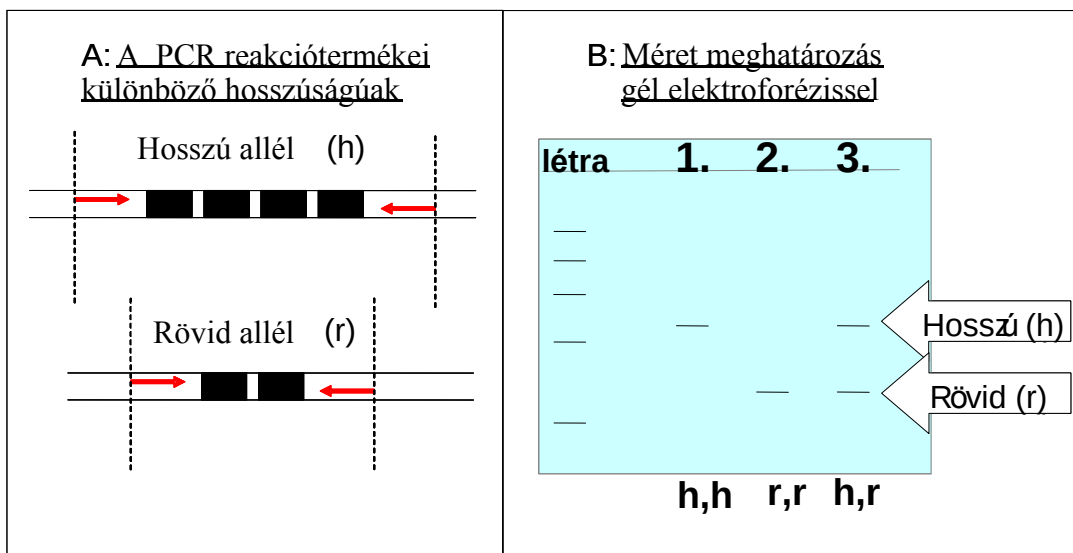
1. ábra. A PCR-reakció elve

Forrás: (Molekuláris biológiai alapismeretek c. PhD kurzus (Dr. Sasvári Mária) alapján megrajzolva)

A polimeráz-láncreakció (PCR) során a humán minta felszorzósítani kívánt részletét primerekkel jelöljük ki. A primer 18-22 bázisból álló, szintetikus, egyszálú DNS (oligonukleotid), mely egy adott DNS-szakasszal komplementer, azaz hozzátapad. A HGP eredményeképp gyakorlatilag bármilyen genomi szakaszra tervezhetők primerek, hiszen a DNS-szekvencia ismert. A primerek tervezése során az egyik primer a kettősszálú DNS egyik szálára, a másik primer a másik szálra tapad (lásd 1. ábra). Az így kijelölt DNS-szakasz sokszorosítása hőstabil polimeráz segítségével, egy termociklus sokszoros ismétlésével történik, melynek lényege, hogy minden ciklusban megkettőződik a kiválasztott ampikon.

2.1.4.1. Hosszúság-polimorfizmusok genotipizálása

Ha a populációban előforduló allélok egymástól hosszúságukban különböznek, akkor a PCR-termék méretéből a genotípus közvetlenül meghatározható [20]. A PCR-termékek méretét elektroforézissel határozzák meg, melynél a DNS-fragmentumok elektromos térben vándorolnak – a kisebbek gyorsabban, a nagyobbak lassabban. A pontos méret-meghatározáshoz egy úgynevezett „létrát” használnak, mely ismert hosszúságú darabokat tartalmaz (2. ábra).



2. ábra. Hosszúság-polimorfizmusok genotipizálásának elve

Az ábra 3 személy (1,2,3) genotípusának meghatározását mutatja be
(h=hosszú; r=rövid. Homozigóták: h,h és r,r; heterozigóta: h,r)

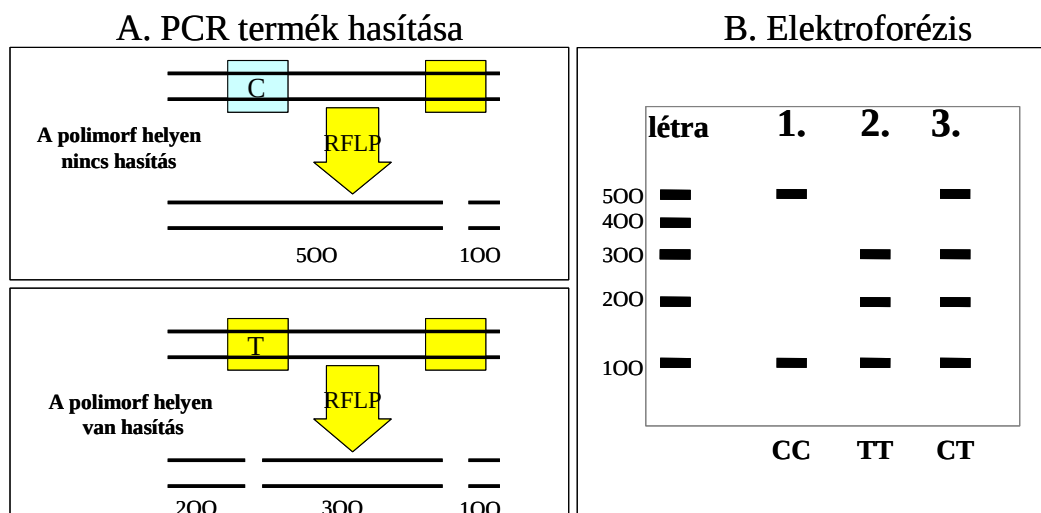
Forrás: Molekuláris biológiai alapismeretek c. PhD kurzus (Dr. Sasvári Mária) alapján megrajzolva

2.1.4.2. SNP-genotipizálási módszerek

Az SNP nem okoz változást a PCR-termék hosszában, így a genotípus meghatározásához további „trükkök” szükségesek. Az alábbiakban csak néhány, a jelen munkában felhasznált SNP-meghatározási módszert mutatok be.

2.1.4.2.1. PCR-RFLP

A betűcsere hosszúságbeli különbséggé alakítható a PCR reakciót követő restrikciós hasítással (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP). Ehhez a DNS-szekvencia 4-8 „betűjét” nagyon specifikusan felismerő restrikciós endonukleázokat használnak, melyek közül kiválasztják azt, amelyik „felismeri” a báziscserét, és az enzimátikus hasítást követően az egyik allél két kisebbre hasad, a másik nem hasítható a betűcsere miatt. Mivel a hasítás lehetőségét kontrollálnunk kell, ezért igen fontos egy kontroll hasítási hely is, amely nem polimorf, tehát mindkét allél esetében elvágódik [21] (3. ábra).



3. ábra. A PCR-RFLP elve

Az ábra 3 személy (1,2,3) genotipizálásának elvét mutatja be.

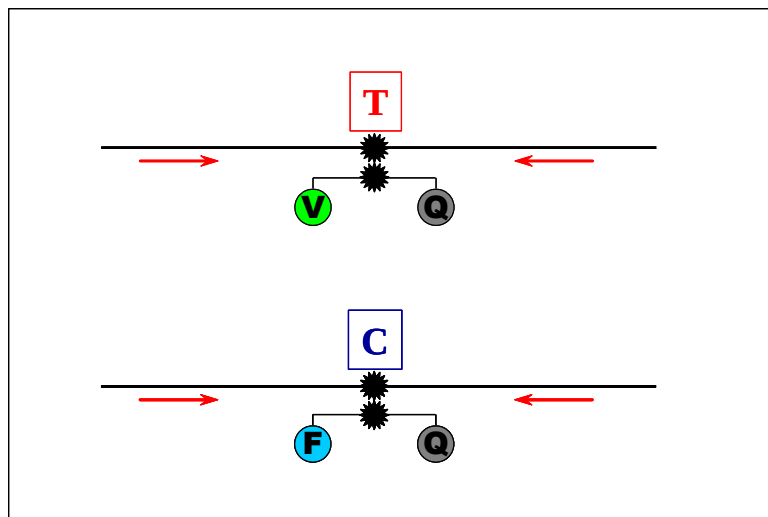
A meghatározandó genotípus egy CT SNP. A restrikciós endonukleáz felismerési helye sárga négyzettel van jelölve. A C változatot az enzim el tudja hasítani, a T változatot nem. A számok a keletkezett DNS-fragmentumok hosszúságát jelzik bázispárokból kifejezve.

Forrás: Molekuláris biológiai alapismeretek c. PhD kurzus (Dr. Sasvári Mária) alapján megrajzolva

2.1.4.3. SNP-genotipizálás TaqMan© rendszerrel

A genetikai vizsgálatok módszerei az elmúlt években óriási fejlődésnek indultak. Számos nagy hatékonyságú, azaz sok személy és/vagy sok SNP meghatározására alkalmas, gyors módszert dolgoztak ki, ezek egyike a TaqMan© rendszer [22].

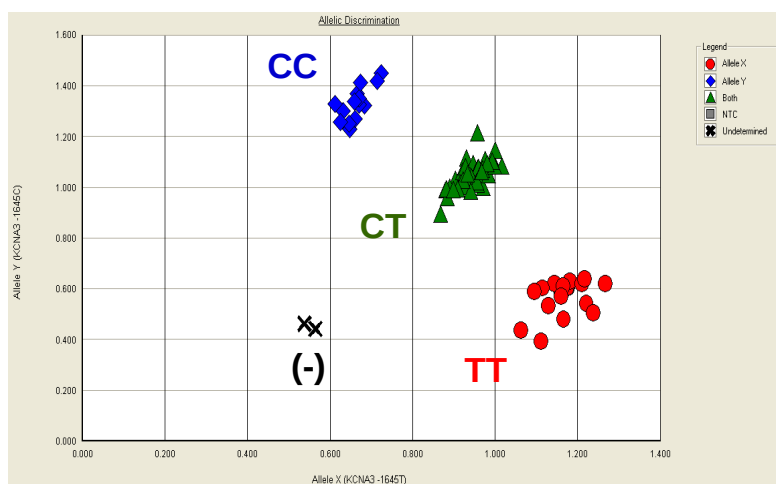
A TaqMan© rendszer az Applied Biosystems által kidolgozott módszer, melynek elve merőben különbözik a legtöbb genotipizálási módszertől. Itt ugyanis nem a PCR-terméket mérjük, hanem a PCR során lehasadó próbát. A próba allélspecifikus, azaz egy SNP két alléljának megfelelően kétféle lehet: az egyik próba csak az egyik (4. ábrán V=VIC nevű fluoreszcens festék), a másik csak a másik allélt tartalmazó DNSszakaszhoz kapcsolódik (4. ábrán F=FAM nevű fluoreszcens festék). A vizsgálandó szakaszhoz kapcsolódó fluoreszcens próba nem ad jelet, mert a másik végéhez egy kioltó (4. ábrán „quencher” Q-val jelölve) molekulát is kapcsoltak kovalensen. Ha az adott szakasz a PCR-reakció során amplifikálódik, a fluoreszcens jel detektálhatóvá válik. Ezáltal a PCR-reakció során a kétféle allélról képződő PCR-termék kétféle fluoreszcenciás jelet ad.



3. ábra. A TaqMan® SNP genotipizáló rendszer elve

Forrás: Molekuláris biológiai alapismeretek c. PhD kurzus (Dr. Sasvári Mária) alapján megrajzolva

Ennél a módszernél valós-idejű PCR (real-time PCR, RT-PCR) készüléket használnak. A 96-os tálcával működő készülékekkel egyszerre 94 személy genotípusát lehet meghatározni (plusz 2 kontroll, amelyben nincs DNS). Minden egyes PCR-ciklus után fluoreszcencia intenzitásmérés történik, mellyel az amplifikáció menete követhető. Ezért nevezik valós idejű (real-time) PCR-nek.



5. ábra. SNP genotipizálása TaqMan® rendszerrel

Az ábrán minden egyes színes jel egy-egy személy genotípusát adja meg a mért fluoreszcencia intenzitások alapján. (-): negatív kontroll (a mintában nincs DNS).

Forrás: (Molekuláris biológiai alapismeretek c. PhD kurzus (Dr. Sasvári Mária) alapján megrajzolva)

Az 5. ábra úgynevezett végpontdetektálást mutat be, mely a PCR-reakció befejezése után létrejövő fluoreszcencia-intenzitás értékeit mutatja. Az 5. ábrán minden pont egy-egy

személynek felel meg. A „kék” jelet adó minták genotípusa CC, a „zöld” jelet adóké CT, a „piros” jelet adóké TT. Megjegyzem, hogy az ábrán a pontok színe a programban szabadon választható, a valóságban mért értékek fluoreszcens jelek, melyek detektálása jelen esetben két, különböző hullámhossztartományra érzékeny detektorokkal történik. Az 5. ábrán az is látható, hogy az egyes genotípuscsoportok jól elkülönülnek egymástól, ami a módszer megbízhatóságát igazolja.

3.1. A DIABETES GENETIKAI TÉNYEZŐI

A diabetes mellitus egy olyan anyagcsere-betegség, amelynek legfontosabb tényezője a szénhidrát-anyagcsere zavara, de egyaránt jellemzi a komplex zsír- és fehérje-anyagcserezavar. A pathomechanizmusban alapvető tényező az inzulin abszolút vagy relatív hiánya. Egyes esetekben mindkét eltérés együttesen fordul elő. A diabeteses esetek kb. 10%-a 1-es típusú cukorbetegség (1TDM). Ezekben az esetekben a kóroktan középpontjában az abszolút inzulinhiány áll, ami autoimmun mechanizmusú (sejt-mediálta autoimmun béta-sejt károsodás), vagy ún. idiopátiás betegség.

A béta-sejt károsodását beindító folyamat menete pontosan nem tisztázott, de mint környezeti tényező szerepet játszhatnak benne különböző külső, környezeti fehérjék, melyek aminosav-szekvenciája többé-kevésbé hasonló a szigetsejt saját antigénjeihez (molekuláris mimikri). A fehérje ellen termelt antitest elindíthatja az autoimmun folyamatot. Egy másik lehetőség, hogy egy vírusfertőzés a vírus antigének expresszióját hozza létre a béta-sejt felszínén és ez sejtek elleni immunválaszt vált ki. A kórkép klasszikus tünetekkel jár (polyuria, polydipsia, fogyás), és többségében 35 éves kor előtt manifesztálódik. Inzulin hiányában ketoacidotikus kóma alakul ki, ami megfelelő terápia hiányában halállal végződik.

2-es típusú diabetes mellitusban (2TDM) szenved a cukorbetegek közel 90%-a. Ebben az esetben egyszerre beszélhetünk az inzulinhatás károsodásáról és az inzulin elválasztás zavaráról. A kórkép típusos esetben klasszikus tünetek nélkül, elhízáshoz társulva, többnyire a 35. életév felett jelenik meg. Az örökletes fogékonyság talaján kialakuló inzulin-rezisztencia miatt, a normoglikémia fenntartása csak egyre magasabb inzulinszint mellett lehetséges. A túlhajtott inzulinszekréció végül – nagyon leegyszerűsítve - a béta-sejtek kimerüléséhez vezet. Az inzulinelválasztás elkezd fokozatosan csökkenni, a vércukorszint pedig a fiziológias tartományt átlépve emelkedik. Ez a tendencia egy bizonyos határon túl orális antidiabetikum adása mellett vagy helyett szükségessé teszi az inzulin adagolását.

A cukorbetegség két leggyakoribb formáján túlmenően megkülönböztetjük a gesztációs diabetest, mely a terhesség során jelentkező, vagy terhesség alatt felismert szénhidrátanyagcsere-zavar.

Az egyéb, speciális diabetesformák csoportjába tartoznak a béta-sejtműködés genetikai zavarai (MODY, MIDD), az inzulinhatás genetikai zavarai, a pancreas exocrin állományának megbetegedéseivel társuló formák, endocrinopathiákhoz csatlakozó, gyógyszerek és kémiai anyagok által kiváltott, infekciókhoz társuló diabetesesek, ill. az immungenézisű diabetes szokatlan esetei, és más, esetenként diabétesssel társuló genetikai szindrómák.

3.1.1. MONOGÉNES ÖRÖKLÉSMENETŰ DIABETES TÍPUSOK

Az örökletes hajlam diabetesben általában egyfajta fogékonyságot jelent, amely környezeti hatásokkal (életmód, étrend, fizikai aktivitás, elhízás, vírusinfekció, szociokulturális tényezők, egészségi állapotot rontó behatások) társulva inzulinrezisztenciát, hiperinzulinémiát vagy béta-sejt diszfunkciót eredményez. Az esetek meghatározó részében a cukorbetegség kialakulásáért öröklött és környezeti tényezők egyaránt felelősek. Ezzel szemben ismerünk olyan eseteket is, amikor a diabetes kialakulásáért egyértelműen egyetlen gén mutációja felelős. A monogénesen öröklődő diabetes hat különböző MODY (maturity-onset diabetes of the young) altípust foglal magába, továbbá az inzulinrezisztencia-szindrómákat és a mitokondriális eredetű diabest.

3.1.1.1. MODY (maturity-onset diabetes of the young)

A legismertebb monogén öröklésmenetű diabetes típusok a MODY kategóriába sorolhatók. A kifejezést 1965-ben Fajans használta először [23]. Jellemzője a fiataalkori, általában 25 év előtti kezdet, a családi halmozódás, legalább három generáció érintettsége, az autoszómális domináns öröklődés, az obesitas hiánya és a béta-sejtek működésének primer zavara. A mai napig hat különböző gén mutációit hozták összefüggésbe a MODY-val, ennek megfelelően hat alcsoportot ismerünk (MODY1-6). Érdemes megjegyezni, hogy valamennyi MODY-mutáció domináns öröklésmenetű (lásd 1. táblázat 14. oldalon).

A MODY1 és a MODY3 klinikai megjelenése hasonló. A betegeket kezdetben mérsékelt hiperglikémia jellemzi, de életük későbbi időszakában orális antidiabetikum adása vagy inzulinterápia válhat szükségessé. A MODY1-ért a hepatocytá nukleáris faktor 4 alfa (HNF-4 α) gén mutációja felelős, míg a MODY3 esetében a hepatocytá nukleáris faktor 1 alfa (HNF-1 α) funkciója romlik el. A HNF-4 α a 20q kromoszómán található, míg a HNF-1 α -t a 12q kromoszóma hordozza. A MODY3 és a MODY1 fenotípusos hasonlóságának alapja az,

hogy a HNF-4 α szabályozza a HNF-1 α működését [24, 25]. Ezek a transzkripciós faktorok az inzulin gén kifejeződését irányítják a béta-sejtekben, illetve olyan génekét, melyek a glükóz transzportjában és metabolizmusában résztvevő fehérjéket kódolják. A legtöbb humán populációban a MODY leggyakoribb oka a HNF-1 α gén hibája, melyet jelenlegi tudásunk szerint több mint 120 mutáció okozhat. Ugyanakkor a MODY1 háttérében álló HNF-4 α gén mutációi viszonylag ritkák, ez idáig hazánkban összesen 13 családot azonosítottak ebben a típusban [26].

A MODY2-t a 7q kromoszómán található glukokináz gén mutációja okozza, melynek több mint 100 különböző formája ismert. A mutáció hatására csökken a glukokináz – azaz a béta-sejt glükóz szenzorának - aktivitása, ezáltal csökken a glükózra adott inzulinválasz és a posztprandiális glikogénszintézis a májban. A mutáció homozigóta formában neonatális permanens diabetes mellitust okoz, mely inzulinkezelést igényel [27, 28]. A betegek legtöbbször panaszmentesek, csupán diétára szorulnak, ritkák a diabeteses szövödmények [29].

Az inzulin promoter faktort (IPF-1) kódoló gén egy igen ritka mutációja okozza a MODY4-et. A gén a 13q kromoszómán helyezkedik el. A mutáció homozigóta formában pancreas agenesist és neonatális diabetest okoz. Az IPF-1 is egy transzkripciós faktor, mely központi szerepet tölt be a hasnyálmirigy fejlődésének szabályozásában elsősorban az inzulin, a glukokináz, és az islet amyloid polypeptid gének expressziójának szabályozásával. Úgy tűnik, hogy elsősorban ez a faktor közvetíti az inzulin gén glükóz indukált transzkripciós aktivitását. Ezt támasztja alá az a tény, hogy MODY4-ben elsősorban az inzulinszekréció első fázisa kóros [30, 31]. A hepatocyta nukleáris faktor 1 β -t (HNF-1 β) kódoló gén mutációi a ritka, de elkülöníthető MODY5 (17q lókus) altípust jelenítik meg. A fenotípusra jellemző veseeltérések (vesecysták, proteinuria, veseelégtelenség) nem a diabeteses nephropathia következményei. Az eddigi 4 női hordozó közül kettőnél belső genitális eltéréseket is leírtak [32].

A NeuroD1 (neurogenic differentiation 1) transzkripciós faktor mutációja a 2q32 pozícióban a MODY6-ot okozza, eddig mindössze két családnál írták le [33]. Erről a transzkripciós faktorról jelenleg mindössze annyit tudunk, hogy ez is szükséges az inzulin gén expressziójához.

3.1.1.2. Inzulin-rezisztencia szindrómák

Az inzulin rezisztencia szindróma egy heterogén betegségcsoport, mely magába foglalja az inzulin receptor szindrómákat és a lipodisztrófiákat. Közös bennük, hogy extrém

hyperinzulinaemiával járnak, és hogy az inzulin nem képes kellő metabolikus hatást kifejteni az érintettek máj, izom és zsír szövetében.

Napjainkig több mint 60féle inzulinreceptor génmutációt hoztak összefüggésbe az inzulin rezisztencia kialakulásával. A legtöbb mutáció az inzulinreceptor extracelluláris részét változtatja meg, (pl.: Donahue, Rabson-Mendelhall szindrómák) mely gátolja az inzulin kötődését [34]. Az „A” típusú inzulin rezisztencia szindrómában viszont az inzulin receptor intracelluláris része módosul, mely az inzulin jelpálya normális szignáltranszdukcióját gátolja.

A lipodisztrófiákban az extrém inzulin rezisztencia mellett az a közös vonás, hogy a zsírszövet olyan szervekben halmozódik fel kóros mértékben, melyeknek fiziológiai körülmények közt nem szerepe a zsír raktározása (pl.: vázizmok, máj). A congenitális generalizált lipodisztrófiát (Berardinelli-Seip szindróma) a 9q34 kromoszóma régióban elhelyezkedő BSCL2 és AGPAT2 gének mutációjával magyarázzák. A laminin A és C (LMNA) gén három különböző mutációjáról is ismert, hogy lipodisztrófiát és inzulinrezisztenciát okoz. A familiáris parciális lipodisztrófia Dunningen típusa autoszomális domináns formában öröklődik. A betegséget pubertás után kezdődő lipodisztrófia, növekedett 2-es típusú diabetes rizikó, magas vérnyomás, dyslipidaemia, és korai koszorúér-meszesedés jellemzi [35].

Két családban írták le a PPAR-gamma gén ligandkötő helyeinek mutációit (P476L V290M). A mutáció által okozott 3-as típusú parciális familiáris lipodisztrófia domináns öröklésmenetet mutat. A kórképre jellemző a súlyos inzulin rezisztencia, korai diabetes, hypertonia, magas szérum triglicerid és alacsony HDL szint.

3.1.1.3. Mitokondriális diabetes

Elsőként egy 10,4 kb méretű mitokondriális delécióról írták le, hogy 20-30 éves korban cukorbetegséget és neuronális hallásvesztést okoz. A mutáció anyai ágon öröklődik, az ATP szintézisének zavarához vezet a béta-sejtekben, így a glükóz szenzor hibája miatt csökken az inzulin szekréció, ami diabetest okoz. A MELAS (mitokondriális myopathia, encephalopathia, laktátacidózis, stroke-szerű epizódok) szindrómát egy mitokondriális tRNS génmutáció okozza, mely anyai ágon öröklődő diabétesssel és kétoldali süketiséggel jár együtt [36, 37].

	Gén lókus	Gén neve	Öröklés menet	Fenotípusos jellemzők
MODY (maturity-onset diabetes of the young)				
MODY1	20q	Hepatocita nukleáris faktor 4 α (HNF4 α)	AD	Kezdeti mérsékelt hyperglycaemia, később orális antidiabetikumot vagy inzulint igényelhetnek, gyakoriak a késői diabeteses komplikációk
MODY2	7p	Glukokináz (GCK)	AD	Homozigótákban neonatális permanens diabetes mellitus. Heterozigóták panaszmentesek és Csak diétára szorulnak, ritkák a diabeteses szövődmények.
MODY3	12q	Hepatocita nukleáris faktor 1 α (HNF1 α)	AD	Lásd. MODY1
MODY4	13q	inzulin promotor faktor (IPF-1)	AD	Orális antidiabetikumot vagy inzulint igényelő diabéteszt okoz.
MODY5	17q	Hepatocita nukleáris faktor 1 β (HNF1 β)	AD	Vesecysták, proteinuria, veseelégtelenség. Orális antidiabetikumot vagy inzulint igényelő diabéteszt okoz.
MODY6	2q32	Neurogén differenciációs faktor 1 (NEUROD1)	AD	Orális antidiabetikumot vagy inzulint igényelő diabéteszt okoz.
Inzulin rezisztencia szindrómák				
Donahue szindróma	19q	Inzulin receptor (INSR)	AR	Extrém inzulin rezisztencia, éhezési hypoglycaemia és postprandialis hyperglycaemia intrauterin retardáció, lipoatrófia, arc diszmorfia, jellemzi. 1 éven belüli halálhoz vezet.
Rabson-Mendenhall szindróma	19q	Inzulin receptor (INSR)	AR	Inzulin rezisztencia, éhezési hypoglycaemia és postprandialis hyperglycaemia acanthosis nigricans, korai pseudopubertás, gyakori diabeteses ketoacidózis, krónikus komplikációkkal. 1 évnél hosszabb túlélés.
A típusú inzulin rezisztencia szindróma	19q	Inzulin receptor (INSR)	AR/AD	Inzulin rezisztencia, acanthosis nigricans, hirsutizmus, obesitas és lipoatrófia hiánya.
Kongenitális generalizált lipodisztrófia	9q34 11q13	Bernardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 (BSCL2) 1-acylglycerol-3- phosphate O- acyltransferase 2 (AGPAT2)	AR	A zsírszövet közel teljes hiánya, inzulin rezisztencia, hepatomegalia, izom hypertrophia, hyperlipidaemia mentális retardáció, cardiomiopátia.
Familiaris parciális lipodisztrófia (Dunningan típus)	1q21	lamin A/C (LMNA)	AD	Progresszív subkutan zsírszövet vesztés a végtagok a törzs és glutealis regióban, zsírfelhalmozódás a nyakon és az arcon. acanthosis nigricans.
Mandibulo-acralis típusú lipodisztrófia	1q21	Lamin A/C (LMNA)	AR	
3-as típusú parciális familiaris lipodisztrófia	3p	Peroxisome proliferator- activated receptor gamma (PPARG)	AD	Végtag és glutealis régióra lokalizált subcutan lipodisztrófia.
Mitokondriális diabetesz				
MIDD (maternally inherited diabetes and deafness)	Mt DNS	10.4kb delécio	Anyai ágon	20-30 éves korban jelentkező diabetesz, sükettség
MELAS (mitokondriális miopátia, encefalopátia, laktát acidózis, stroke szerű epizódok)	Mt DNS	Mitochondrial transfer RNA(Leu(UUR)) (MTTL1)	Anyai ágon	mitokondriális miopátia, encephalopathia, laktát acidózis, stroke szerű epizódok, diabetesz, sükettség

1. táblázat. Monogénis öröklődésű diabetes típusok

Forrás: saját összefoglaló közlemény [38]

3.1.2. A KOMPLEX ÖRÖKLŐDÉSŰ DIABETES GENETIKAI RIZIKÓFAKTORAI

A monogénesen öröklődő diabetesesek az összes diabetes előfordulásának kevesebb, mint 5%-át adják. Ugyanakkor az 1-es és a 2-es típusú diabetes, valamint a gesztációs diabetes jóval gyakoribb, a szénhidrát-anyagcsere zavarok közel 85%-át adják. A gyakori diabetesesek komplex öröklődésű betegségek, melyek kialakulásában a környezeti rizikófaktorok (pl.: elhízás, mozgásszegény életmód, nem megfelelő diéta, vírusinfekciók, stb.) mellett öröklött tényezők is szerepet játszanak. A cukorbetegség háttérében szereplő genetikai rizikófaktorok egyenként általában kis hatásúak, és csupán más genetikai és környezeti faktorokkal együtt okoznak betegséget [39].

Az 1980-as évek végén napvilágot látott, diabeteses ikreken végzett családvizsgálatok voltak az első bizonyítékok, melyek alátámasztották mind az 1-es [40-45] mind a 2-es típusú cukorbetegség [46-48] örökölhetőségéről szóló elméleteket. Napjainkban a több tízezres populációkon végzett teljes genom analízisek (GWAS) eredményeinek köszönhetően [49] folyamatosan bővül azon gének listája, melyek számításba jöhetnek a diabetesre való genetikai hajlam kialakításában. Ugyanakkor csupán néhány kandidáns génvariánst sikerült egyértelműen a DM rizikófaktoraként azonosítani.

3.1.2.1. Az 1-es típusú diabetes kandidáns génei

Az 1TDM örökölhetőségében nagy valószínűséggel szerepet játszó genetikai tényezők közül többet már a „GWAS éra” előtt sikerült azonosítani. Általánosan igazolt genetikai tényezőként tartjuk számon a HLA II osztályú (IDDM1 (6p21 kromoszóma) gének közül a DRB1 és DQB1 géneket, melyek az 1TDM genetikai meghatározottságának kb. 50%-áért felelősek. A gének által kódolt MHC II molekulák szerepe egyrészt az, hogy megkötik, és a T-sejtek felé prezentálják a betegség kialakulásában szerepet játszó antigéneket, másrészt a DR és DQ gének által kódolt molekulák kulcsszerepet játszanak a béta-sejtek pusztulását okozó, autoreaktív T-sejtek csecsemőmirigyben való kiválasztódásában és aktiválódásában.

Több, nem-HLA génről is viszonylag régóta ismert, hogy kisebb mértékben ugyan, de egyértelműen hajlamosít az 1TDM kialakulására. Ilyen például az inzulin génjén található (INS) VNTR-régió (11p15 kromoszóma szakaszon, [50-53]; a citotoxikus T-limfocita asszociált protein 4 (CTLA4) lókusza a 2-es kromoszóma q31-es régiójában [54-56]; a nem-receptor típusú protein-tirozin-foszfataz 22 (PTPN22) gén a 1-es kromoszóma p13-as régiójában [57, 58]; valamint az interleukin-2 receptor alfa gén (IL2RA, [59-61].

Röviddel a teljes genom vizsgálatok kezdete után már látható volt, hogy a GWAS vizsgálatok további nagy segítséget nyújthatnak az 1TDM genetikai hátterének feltárásában. Például az első – viszonylag kisebb – GWAS vizsgálat is markáns pozitív eredményt hozott: azonosították az interferon-indukált helikáz (IFIH1) gén egyik SNP-jét, mely a fehérje 946-os pozíciójú alaninját threoninra módosítja, és szignifikánsan gyakrabban fordult elő az 1TDM betegekben [62]. Érdemes megjegyezni, hogy ebben a vizsgálatban 6500 darab aminosavcserét okozó SNP-t vizsgáltak. Ez az eredmény megerősítést nyert a további eset-kontroll, illetve családvizsgálatokban is [63]. Az IFIH1 gén biológiai hatását tekintve is jó kandidáns génje a 1TDM-nek, hiszen a gén terméke a vírusfertőzések szenzoraként működik. Feltehetően a vírus-RNS felismerésében játszik kulcsszerepet, így ez lehet a hiányzó láncszem a környezeti triggerként szereplő vírusinfekciók és a kialakuló autoimmun betegség között.

Az első két, valóban nagy volumenű, 1TDM-es mintán végzett GWAS vizsgálatot egy amerikai (Center for Applied Genomics, Abramson Research Center, The Children's Hospital of Philadelphia) és egy angol (Wellcome Trust Case–Control Consortium) munkacsoport párhuzamosan végezte. A Hakonarson vezette amerikai munkacsoport az Illumina cég 550000 SNP markert tartalmazó chip-jét használta egy több mint 2000 fős európai mintán. Az elemzés a korábban megismert lókuszokon felül kandidáns génként azonosította a CLEC16A (C-type lectin domain family 16, member A) fehérje génjét, mely a 16p13 kromoszómális régióban helyezkedik el. A gén kizárólag elsődleges dentritikus sejtekben, B-limfocitákban és természetes ölő sejtekben (NK-sejtek) expresszálódik. Funkcióját tekintve – mai tudásunk szerint – sejtadhézióban és a kórokozók felismerésében szerepelhet, így az – IFIH1-hez hasonlóan – biológiai funkciója jól értelmezhető [64].

A Wellcome Trust Case–Control hétféle, multifaktoriális öröklésmenetű betegség genetikai rizikófaktorait kutatta, köztük az 1TDM-ét is [65]. A vizsgálat 1TDM-es szakaszában 2000 eset és 3000 kontroll minta genotipizálására került sor az 500.000 SNP-markert tartalmazó Affymetrix chip segítségével. Analízisük megerősítette a Hakonarson munkacsoportja által felismert 16p13 lókusz hatását és emellett további kromoszóma régió szerepére mutatott rá: 12q24 (kandidáns gén: C12orf30) 12q13 18p11 (kandidáns gén: PTPN2).

További meta-analízisek lehetőséget nyújtottak arra, hogy az esetszám növelésével, illetve specifikusan kiválogatott SNP-markerek segítségével kimutathatóak legyenek olyan rizikófaktorok is, melyek még multifaktoriális szinten is kis hatásúak (OR 1,1-1,2). Ezen vizsgálatok során azonosították a következő géneket: UBASH3A (ubiquitin-asszociált és SH3

doménnel rendelkező protein A gén); BTB (broad complex tramtrack-bric-a-brac); BACH2 (cap 'n' collar (CNC) homology 2); PRKCQ (protein-kináz C theta), valamint a 15q24 régió kilenc génje közül a CTSH-t (cathepsin H), a C1QTNF6-t (complement 1q tumor necrosis factor related protein 6) és az SSTR3-t (szomatosztatin receptor 3) [66].

Index SNP	Kromoszóma régió	Esély hányados	Kandidáns gén
rs2476601	1p13	1,8	PTPN22
rs1990760	2q24	0,86	IFIH1
rs1004446	2q31	0,62	CTLA4
rs17388568	4q27	1,27	IL2-IL21
Többszörös	6p21	–	MHC
rs3757247	6q15	1,13	BACH2
rs41295061	10p15	0,61	IL2RA
rs947474	10p15	0,81	PRKCQ
rs6356	11p15	1,52	INS
rs2292239	12q13	1,3	ERRB3
rs17696736	12q24	1,37	C12orf30
rs3825932	15q24	0,87	CTSH
rs2903692	16p13	0,65	CLEC16A
rs2542151	18p11	1,33	PTPN2
rs9976767	21q22	1,16	UBASH3A
rs229541	22q13	1,15	C1QTNF6

2. táblázat: Az 1-es típusú diabetes kandidáns génjei, illetve kromoszóma régiói
 Forrás: összefoglaló közlemények alapján [65, 67-70].

3.1.2.2. A 2-es típusú diabetes kandidáns génjei

A 2TDM genetikai rizikófaktorainak feltérképezésére tett kísérletek során elsőként elméleti szempontból felvetett kandidáns géneket vizsgáltak, azaz olyan géneket, melyek működési zavara funkciójuk alapján 2TDM-hez vezethet. Ilyenek például a monogénes diabetest okozó gének polimorfizmusai (pl. MODY gének, WFS1), az inzulin rezisztencia génjei (pl. PPARG), vagy a béta-sejt funkcióhoz és a megfelelő inzulin elválasztáshoz szükséges gének (pl. KCNJ11).

A MODY gének polimorfizmusai

A MODY génekről évtizedek óta ismert, hogy működési zavaruk monogénes diabetes kialakulásához vezet. Feltételezhető volt, hogy ugyanezen gének az anyagcserére kisebb befolyást gyakorló polimorfizmusai ugyan önmagukban nem okoznak diabetest, de más rizikófaktorokkal együtt hatva hajlamosíthatnak a 2TDM kialakulására. Az ismert hat MODY gén közül a HNF1 β egy intronban elhelyezkedő SNP-jéről (rs757210) sikerült igazolni, hogy kis fokban ugyan (OR: 1,12) de 2TDM-re hajlamosít. Ezt az eredményt több mint 15000 minta összesítésével igazolták, és ezt a hatást egy későbbi GWAS is megerősítette [71-73].

A Wolfram-szindróma a WFS1 gén mutációi következtében fellépő komplex tünetekkel járó betegség, melynek része a szénhidrát-anyagcsere zavara is [74]. A gén polimorfizmusainak 24000 mintán végzett vizsgálata kimutatott 2 SNP-t, melyek kis mértékben ugyan (OR: 1,1), de egyértelműen asszociálnak a 2TDM előfordulásával, és hatásuk később GWAS eredmények alapján is megerősítést nyert [75, 76]. A gén a wolframin fehérjét kódolja, mely az endoplazmás retikulum membránjában található. Kimutatták ugyan, hogy a rizikót fokozó variáns fokozza a béta-sejtek diszfunkcióját [77, 78], de a wolframin fehérje funkciójáról a mai napig keveset tudunk.

Az inzulin rezisztencia génjei

A PPARG (peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor γ) kezdettől fogva egy különösen vonzó kandidáns gén volt, hiszen a gén terméke a diabetes egyik alapgyógyszere, a tiazolidindionok célmolekulája. Így nem meglepő, hogy a PPARG génben azonosítottak először multifaktoriális diabetesre hajlamosító génvariánst [79]. A témában mérföldkőnek számító meta-analízis [80] igazolta, hogy - érdekes módon - a gyakoribb allél a rizikófaktor, mely homozigóta formában 20%-al növeli a 2TDM kialakulási valószínűségét. Ezt elsősorban a rizikó allélt hordozók magasabb inzulinrezisztenciájával lehetett magyarázni [81].

A béta-sejtfunkció génjei

Három évbe és hosszas kutatómunkába került, míg a PPARG-hoz hasonlóan jól megalapozott genetikai rizikófaktorot sikerült felfedezni a béta-sejtek funkcióját befolyásoló génállományban. A rizikófaktor azonosításában itt is kulcsszerepe volt a farmakológiának. A diabetes kezelésének egy másik célmolekulája a szulfanilurea receptor, melynek génje (ABCC8) csupán néhány kilobázisnyi távolságra található a KCNJ11 géntől. A KCNJ11 a szulfanilurea receptor funkcionális partnere, a szigetsejt ATP szenzitív K⁺ csatornáját (Kir6.2) kódolja. Több vizsgálatban igazolták a KCNJ11 egyik aminosav-cserét okozó polimorfizmusának szerepét, mely a 23. pozícióban lévő glutamátot lizinre változtatja

(E23K). A polimorfizmus hatását [82], egy további meta-analízis [83] is igazolta. További vizsgálatok igazolták, hogy a rizikó allél hordozása kóros inzulintermeléssel hozható összefüggésbe [84, 85].

Nemrég számoltak be [86] egy viszonylag erős hatású genetikai rizikófaktorról (O.R.: 1,5), mely egy transzkripciós faktort kódol (TCF7L2, transcription factor 7-like 2). Az asszociációvizsgálat igen nagy mintaszámú volt (1000 feletti 2-es típusú diabetes csoport és 2000 feletti kontroll), és több populáción (izlandi, dán, európai-amerikai) igazolták az összefüggést. Ez a kandidáns gén egy teljes genomvizsgálat során merült fel, melyben a 10-es kromoszóma q karján lokalizáltak egy 2-es típusú diabetesre hajlamosító régiót. Ennek a kromoszómális régiónak a fokozatos szűkítése végül a TCF7L2 gén 3-as intronjában lévő SNP-k haplotípusának szerepét mutatta ki. A rizikót jelentő allél kóros inkretin hatással összefüggő inzulinszekréció csökkenést okoz [87]. A populációs szintű rizikó erre a génvariánsra 21%, azaz ennyivel csökkenne a betegség előfordulása a populációban, ha ezt a rizikófaktort ki tudnánk küszöbölni.

A teljes genom asszociációs vizsgálatok (GWAS) eredményei

Eddig több mint 30 2TDM teljes genom analízist közöltek [88, 89], köztük hat olyan európai [65, 90-95] és egy japán [96] vizsgálatot, melyek során több mint 150000 SNP-markert alkalmaztak. Ezekben a vizsgálatokban sikeresen azonosítottak olyan kromoszómális régiókat, melyek összefüggnek a diabetes előfordulásával.

A korai GWAS vizsgálatok sikertelenségét elsősorban azzal magyarázzák, hogy kezdetben nem tudták elérni a kis genetikai hatás kimutatásához szükséges viszonylag nagy esetszámot, illetve a genotipizáló technikák fejletlensége miatt kevés SNP-markert alkalmaztak. A genotipizáló módszerek fejlődésének köszönhetően a közelmúlt teljes genom analízisei minden esetben 150000-nél több SNP-markert alkalmaztak. Valamennyi nagy esetszámú, eset-kontroll vizsgálat volt, melyek a mintavételi módszer, a konkrét esetszám, a vizsgált populáció és a résztvevők követése tekintetében különböztek egymástól.

Elsőként 661 beteg és 614 egészséges, francia származású résztvevő vizsgálata során a HHEX/IDE és a SLC30A8 régiókat sikerült azonosítaniuk a kutatóknak [93]. Nem sokkal ezután négy másik GWAS eredményei váltak ismertté. Steinhorsdottir és munkatársai 300000 SNP-t tartalmazó Illumina chip-et használva egy 1399 esetet és 5275 kontrollt számláló izlandi populációt vizsgálva találtak rá a CDKAL1 gént tartalmazó régióra, mely összefüggésbe volt hozható a 2TDM-el.

Index SNP	Kromoszóma	Kromoszóma régió/gén	Felfedezés módja
rs10010131		4 <i>WFS1</i>	Kandidáns gén
rs1801282		3 <i>PPARG</i>	Kandidáns gén
rs757210		17 <i>HNF1B</i>	Kandidáns gén
rs5219		11 <i>KCNJ11</i>	Kandidáns gén
rs7901695		10 <i>TCF7L2</i>	Kapcsoltsági analízis (finom térképezés)
rs10811661		9 <i>CDKN2A/B</i>	GWAS
rs10946398		6 <i>CDKAL1</i>	GWAS
rs13266634		8 <i>SLC30A8</i>	GWAS
rs4402960		3 <i>IGF2BP2</i>	GWAS
rs5015480		10 <i>HHEX/IDE</i>	GWAS
rs8050136		16 <i>FTO</i>	GWAS
rs2237892		11 <i>KCNQ1</i>	GWAS
rs10830963		11 <i>MTNR1B</i>	GWAS
rs10923931		1 <i>NOTCH2</i>	GWAS meta-analízis
rs12779790		10 <i>CDC123/CAMK1D</i>	GWAS meta-analízis
rs4607103		3 <i>ADAMTS9</i>	GWAS meta-analízis
rs7578597		2 <i>THADA</i>	GWAS meta-analízis
rs7961581		12 <i>TSPAN8/LGR5</i>	GWAS meta-analízis
rs864745		7 <i>JAZF1</i>	GWAS meta-analízis

3. táblázat: A 2-es típusú diabetes kandidáns génjei, illetve kromoszóma régiói.

Forrás: összefoglaló közlemények alapján [19, 39, 89, 93]

Ugyancsak a *CDKAL1* régió szerepét látszik megerősíteni három további, független, nagy esetszámú vizsgálat is. A Wellcome Trust Case Control Consortium, és a Diabetes Genetics Initiative vizsgálat az 500000 SNP vizsgálatára alkalmas Affymetrix chip segítségével 1924 2TDM és 2938 kontroll, illetve 1464 2TDM és 1467 kontroll egyént vizsgált az Egyesült Királyságból, valamint Svéd-és Finnországból. A Fussion vizsgálat egy 1161 esetet és 1174 kontrollt tartalmazó finn populációt tanulmányozott az Illumina 300000 SNP chip segítségével. Az említett három vizsgálat eredményeinek összesítését követően megerősítést nyertek a korábban felismert lókuszok (*PPARG*, *KCNJ11* és *TCF7L2*), és további új kandidáns géneket fedeztek fel (*CDKN2A/2b*, *FTO*, *IGF2BR2*). Újabb, európai populáción végzett teljes genom szűrés, melyben egy közel 1000 fős finn, izraeli, német és brit egyénekből álló populációt vizsgáltak, nem hozott új eredményeket [94]. Egy japán populáción végzett vizsgálat, melyben 194 eset és 1558 kontroll egyént genotipizáltak, a már ismert kromoszóma-régiókon felül a *KCNQ1* gén szerepét mutatta ki [96], melynek hatása kisebb mértékben ugyan, de az európai mintán is kimutatható volt [97].

Meta-analízis

A korábbi három, nagy GWAS vizsgálatot végző európai kutatócsoport (WTCC, DGI, Fussion) egyesüléséből jött létre a DIAGRAM (Diabetes Genetics, Replication And Meta-Analysis) konzorcium, melynek célja az első 2TDM GWAS meta-analízis elkészítése volt. Elemzésük során az 57366 európai származású 2TDM és kontrollt magába foglaló, egyesített minta eredményei alapján hat új szuszeptibilitási lókuszt azonosítottak (NOTCH2, CDC123/CAMK1D, ADAMTS9, THADA, TSPAN8/LGR5, JAZF1) melyek közül a NOTCH2-t már korábbi kandidáns gén vizsgálatok is felvetettek.

3.2. A DIABETES ÉS A KOMORBID DEPRESSZIÓ**3.2.1. A DEPRESSZIÓ DIAGNÓZISA ÉS A DEPRESSZÍV TÜNETEK MÉRÉSE**

A DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) alapján a major depresszió diagnózisának felállításához két major tünet közül egy, a minor kritériumok közül legalább négy egyidejű fennállása szükséges két héten keresztül.

Major tünetek:

1. A nap legnagyobb részében és csaknem minden nap levert hangulat, amelyet az egyéni beszámoló (pl. szomorúság vagy üresség érzése) vagy mások megfigyelései (pl. könnyezni látják) jelez. Gyerekeknél vagy serdülőknél elég az ingerült hangulat jelzése.
2. Az érdeklődés és öröm jelentős csökkenése minden vagy majdnem minden tevékenységben a nap túlnyomó részében, és majdnem minden nap (akár szubjektív beszámoló, akár mások megfigyelése).

Minor tünetek

1. Jelentős súlycsökkenés, vagy gyarapodás (havonta a testsúly 5%-át elérő változás) diétázás nélkül, vagy az étvágy jelentős csökkenése/növekedése, csaknem minden nap (gyermekekben a súlygyarapodás elmaradása).
2. Insomnia vagy hypersomnia csaknem minden nap.
3. Motoros agitáció vagy gátoltság csaknem minden nap (mások megfigyelése, nem elegendő csupán a nyugtalanság vagy meglassultság szubjektív érzete).
4. Fáradtság vagy anergia csaknem minden nap.
5. Értéktelenség érzete vagy kifejezett, ill. inadekvát önvád/bűntudat, akár téveszmés fokban is, szinte minden nap (nem pusztán a beteg-lét miatti lelkiismeret-furdalás vagy bűntudat).

6. Csökkent gondolkodási, összpontosítási vagy döntési képesség, szinte minden nap (akár szubjektív élmény, akár mások megfigyelése).
7. A halál gondolatával való gyakori foglalkozás (nem csak halálfélelem), visszatérő öngyilkossági gondolatok konkrét terv nélkül vagy öngyilkossági kísérlet vagy konkrét öngyilkossági terv.

A depresszió diagnosztikájának felállítása a DSM-IV (az Amerikai Pszichiátriai Szövetség rendszere) vagy a BNO-10 (Betegségek Nemzetközi Osztályozása 10) alapján pszichiáter szakorvos által történik. A szomatikus betegségek mellett jelentkező depresszió diagnosztikájában azonban nehézséget okoz az, hogy a napjainkban használatos klasszifikációs rendszerekben (BNO-10), (DSM-IV) nem különítik el a szomatikus betegségek mellett jelentkező pszichiátriai zavart. A DSM-IV tartalmaz egy kategóriát, melyben a szomatikus betegséget kísérő pszichés betegségeket sorolhatjuk, azonban ez a kategória nem pontosan definiált, validitása kétséges [98].

Annak érdekében, hogy segítsék a kezdődő hangulati zavar felismerését elősegítsék, és előre jelezzék a páciens fokozott kockázatát, depresszióra való hajlamát, a depresszió szűrésére különböző pszichológiai tesztek fejlesztettek ki (CES-D, BDI, HADS, stb.). A kérdőívek egy része úgynevezett strukturált, diagnosztikus kérdőív, amelyet a pszichiáter tölt ki a beteggel való interjú alapján. A másik csoportba a beteg által kitöltött kérdőívek tartoznak. Ezek olyan önbecslő skálákat szolgáltatnak, amelyek lehetőséget nyújtanak a beteg állapotának gyors felmérésére, nyomon követésére. A depresszió tüneteinek mérésére kidolgozott kérdőívek alkalmasak a depresszió súlyosságának számszerűsítésére, gyakorlati alkalmazásuk egyszerű. Felhasználásuk különösen fontos lehet azokban az esetekben, amikor a páciens nem éri el a depresszió diagnosztikához szükséges (DSM-IV) kritériumokat.

A depressziós betegek elenyésző része fordul közvetlenül pszichiáter szakorvoshoz. Többségük először háziorvosánál jelentkezik, hiszen panaszait elsősorban testi eredetűnek véli. Így a betegség sok esetben nem, vagy csak hosszú idő elteltével kerül felismerésre. Ezt a tényt támasztja alá Lustman és munkatársainak felmérése is, mely szerint az alapellátásban az esetek kétharmadában nem ismerik fel a depresszió tüneteit. Az orvosok ilyenkor a depresszív tüneteket a cukorbetegség okozta nehézségekkel és szövődeményekkel magyarázzák, és a betegeknek nem javasolnak antidepresszív terápiát [99].

Ezen diagnosztikus probléma megoldása céljából, valamint a depresszió fokozott kockázatának jelzésére, a mentális betegség felismerésére, a depresszió szűrésére és a tünetek súlyosságának mérésére fejlesztettek ki az elmúlt időben több olyan kérdőívet, mely alkalmas

a depresszió tüneteinek kimutatására az alapellátásban is. A tünetlistán alapuló skálák (Hamilton, Beck) tételeiből sok lehetne szervi betegség tünete is. Ezen probléma megoldása céljából fejlesztette ki Zigmond és Snaith 1983-ban a „Kórházi szorongás és depresszió” (HADS: Hospital Anxiety and Depression Scale) kérdőívet, melynek magyar fordítását saját munkánkban is felhasználtuk. Ez a kérdőív elsősorban a különböző szomatikus betegségek mellett fellépő szorongásos és depressziós tünetek meglétére kérdez rá [100]. A kérdőíves vizsgálat eredményeképp két, a szorongás (HADSa) és a depresszió (HADSd) önbecslésen alapuló skálaértékét kapjuk meg, amelyek lehetőséget nyújtanak a beteg állapotának gyors felmérésére, illetve nyomonkövetésére. Ismert, hogy az atípusos tünetekkel jelentkező betegek felismerésére a fent felsorolt tesztek nem kifejezetten alkalmasak, hiszen pont a tipikus depressziós tünetekre kérdeznak rá. Ennek ellenére ezek a kérdőíves vizsgálatok mind a depresszió szűrésénél, mind az epidemiológiai vizsgálatokban, mind pedig az egyéni terápiás munkában jól használhatónak bizonyultak.

Az úgynevezett szubklinikai depresszió mérésének jelentőségét számos publikáció bizonyítja. Ezekben a vizsgálatokban kimutatták, hogyha a beteg nem is éri el a major depresszió diagnózisának kritériumát, de jelentős depresszív tüneteket mutat, azaz szubklinikus depresszióban szenved, lényegesen rosszabb lehet a beteg életminősége és a gyógyuláshoz szükséges együttműködése [101]. Diabetesez betegekben különösen fontos a „klinikailag releváns” depresszió felismerése, ami a major depresszió túl magában foglalhatja a minor depressziót és disztímiát is. Ezen állapotok akadályozzák a betegek mindennapi tevékenységet, beleértve cukorbetegségük kezelését, ezáltal meggátolhatják a szénhidrát-anyagcsere rendezését, rontják a betegek életminőségét, tehát kezelést igényelnek.

3.2.2. A DEPRESSZIÓ ÉS A MONOAMINERG RENDSZER

A depresszió monoamin-elmélete szerint a hangulati zavart elsősorban a központi idegrendszeri katekolamin és szerotonin hiánya okozza [102-104]. A hangulati élet egyik legfontosabb szabályozója a szerotonin. Ugyanakkor a szerotonin szerepe igen sokrétű: részt vesz a cirkadián ritmusok (például a táplálékfelvétel) és az alvás szabályozásában is, valamint a neurogenézisben [105]. Kiemelt jelentőségű a szerotonin szerepe az agyi jutalmazási/büntetési rendszerben. Épp ezért a szerotonin-egyensúly zavara a drog-abúzus és az alkoholizmus kialakulásában is kulcsfontosságú. A szerotonin perifériás hatásai közül ki kell emelni a gyomor-bél motilitás szabályozását, melyben az enterokromaffin sejtek

játszanak szerepet. Ezen kívül a szerotonin fontos szerepet tölt be a vérárvadásban és az értónus fenntartásában.

3.2.3. A DEPRESSZIÓ NÉHÁNY KANDIDÁNS GÉNJE

3.2.3.1. A depresszió örökölhétése

A major depresszió genetikai meghatározottságát számos ikervizsgálat igazolta [106-109]. Az ikervizsgálatok meta-analízise a major depresszió örökölhétéségét (heritability) 33%-ra becsülte [110], mely a jelentős környezeti hatás mellett (67%) egyértelműen azonosítja a genetikai komponenszt is. A depresszió „stressz-diathesis” modellje szerint többféle környezeti és genetikai tényező együttes hatása nyilvánul meg a hangulati zavar kialakulásában és súlyosságában [111]. A környezeti tényezők közül fontos a nem [112, 113], a stresszt okozó életesemények [111, 114, 115], a gyerekkori negatív életesemények, és egyes személyiségtípusok is [116]. Az esendőség (vulnerabilitás) egyénenként különböző lehet, és ez elsősorban genetikai meghatározottsággal bír [117].

3.2.3.2. A szerotonin-transzporter és az 5HTTLPR

A szinaptikus szerotoninszint két alapvető meghatározója a szerotonin-szintézis sebessége és a szinaptikus résből történő visszavétel mértéke. A szerotonin visszavételéért egyetlen transzporter fehérje, a preszinaptikusan elhelyezkedő szerotonin-transzporter (5HTT: 5-hidroxi-triptamin transzporter, génjének hivatalos neve: SLC6A4) felelős. A fehérje 12 transzmembrán doménnel rendelkezik, és a monoamin transzporterek családjába tartozik. Maga a fehérje valójában egy ioncsatorna, mivel a szerotonin visszavétele Na^+ és Cl^- kotranszportoz és K^+ antiportozoz kötött. A transzporter Na^+ -grádiens ellenében veszi vissza a szerotonint, ezáltal szabályozva a szinaptikus rés szerotoninszintjét [118]. Expressziója kifejezetten magas a mediális és dorzális raphe magvak sejttestén, valamint a szerotonerg rostok axon terminálisain, dendritjein és egyes asztrocitákon.

A szerotonin-transzporter számos pszichoaktív vegyület célpontja, tehát a depresszió és a szerotoninszint összefüggését farmakológiai adatok is alátámasztják. Jól ismert ugyanis, hogy az egyik legelterjedtebb antidepresszáns gyógyszercsoport, a szelektív szerotonin visszavétel gátlók (SSRI, selective serotonin reuptake inhibitor) hatásának lényege a szerotoninszint növelése a visszavétel gátlásával. Az SSRI-típusú antidepresszánsok a transzporter gátlásával, a pszichostimulánsok (pl.: amfetamin) pedig a transzport megfordításával növelik a szinaptikus szerotoninszintet [119]. In vivo SPECT (single photon

emission computed tomography) vizsgálatok során leírták, hogy major depresszióban kimutathatóan változik a szerotonin-transzporter mennyisége az agytörzsi régióban [120].

A szerotonin-transzporter gén (SLCA4) a 17-es kromoszóma hosszú karján található (17q11.2). A szerotonin-transzporter leggyakrabban vizsgált polimorfizmusa az 5HTTLPR-t (5HTT linked polymorphic region). Ez egy hosszúság-polimorfizmus a promóter régióban, melynél 20-23 bázispárnyi egységek ismétlődnek 12-szer vagy 14-szer, bár előfordulnak más, ritkább változatok is (14-22 ismétlődés). Ezért szokás a „hosszú” (long, l, 14-szeres ismétlődést tartalmazó), illetve a „rövid” (short, s, 12-szeres ismétlődés) allélt megkülönböztetni. A polimorfizmus funkcionális hatását többféleképp is bizonyították. Különböző genotípusú lymphoblast sejtvonalakat használva azt találták, hogy a hosszú allélra homozigóta sejtekben a szerotonin-transzporter mRNS- és fehérjeszintje szignifikánsan magasabb, mint a rövid (s/s) és a heterozigóta (s/l) genotípusú sejtekben [121]. In vitro luciferáz riportergén-rendszerben is kimutatták a kétféle promótervariáns eltérő transzkripció aktivitását [122]. A funkcionális hatást SPECT vizsgálatokkal is alátámasztották [123]. Mindezek alapján az 5HTTLPR molekuláris-funkcionális hatása több oldalról is bizonyítottnak tekinthető.

A szerotonin-transzporter másik gyakran vizsgált hosszúság-polimorfizmusa a gén 2. intronjában található STin2 (serotonin transporter intron 2), amelyben egy 16-17 bp hosszú szakasz ismétlődik leggyakrabban 9-, 10- vagy 12-szer. A 12 ismétlődést tartalmazó allél jelenlétében fokozottabb génexpressziót tapasztaltak, mint a 10 ismétlődést hordozó forma esetén [124], azaz ez a polimorfizmus is hatással lehet a termelődő fehérje mennyiségére.

Pszichogenetikai vizsgálatok alapján szignifikáns összefüggés áll fenn az 5HTTLPR rövid allélja, és a hangulatzavarok között, bár az összefüggés ellentmondásos [125, 126]. Lesch munkacsoportja 1996-ban először mutatta ki, hogy a rövid alléllal rendelkezők (az s/s homozigóta és s/l heterozigóta egyedek) magasabb pontszámot értek el a NEO-PI-R személyiség kérdőív (NEO Personality Inventory - Revised) „neuroticizmus” skáláján, mint a homozigóta l/l genotípusú egyének [121]. A replikációs tanulmányok azonban ellenkező eredményeket is kaptak [127, 128]. Mint ahogy ez ilyen esetekben szokás, a megjelent eredményeket meta-analízisnek vetették alá, mely összességében igazolt összefüggést talált a szorongással kapcsolatos személyiség jegyek és az 5HTTLPR rövid allélja között [129]. A személyiségjegyek és az 5HTTLPR-polimorfizmus kapcsolatát hazai vizsgálatok is igazolták [130].

A személyiségjegyek vizsgálata mellett hamarosan elindult az 5HTTLPR és a bipoláris depresszió kapcsolatának vizsgálata is, mely egy 2005-ös meta-analízis alapján

igazoltnak tűnt [131]. Hasonló eredményeket kaptak az 5HTTLPR rövid allélja és az öngyilkosságra való hajlam összefüggésében is [132].

Egy új irányzatot képvisel a gén és a környezet kölcsönhatásának vizsgálata, melynek első példája Caspi csoportjának munkája [133] az 5HTTLPR és a depresszió/öngyilkossági gondolatok összefüggéséről. Az igen nagy elemszámú, longitudinális vizsgálatban kimutatták, hogy az 5HTTLPR genetikai hatása elsősorban akkor érvényesül, ha a személyek több stresszhelyzetet éltek meg. Ugyanez a genetikai hatás nem mutatható ki azoknál a személyeknél, akik az életesemények vizsgálata során nem számoltak be jelentős stresszhelyzetekről. Ez az eredmény nemcsak magyarázatot adott az ellentmondásos szakirodalmi adatokra, de egy új irányzatot indított el, melyben a genetikai hatásokat a környezeti tényezők függvényében vizsgálták.

3.2.3.3. A szerotonin szintézisével és bontásával kapcsolatos polimorfizmusok

A szerotonin triptofánból szintetizálódik, a reakció sebességmeghatározó lépése a triptofán-hidroxiláz (TPH) által katalizált reakció. A TPH aktivitása kalciumfüggő, és a neuron aktivitásától függ. A TPH az aromás aminosav-hidroxilázok szupercsaládjába tartozik, hasonlóan a tirozin- és a fenilalanin-hidroxilázokhoz.

A triptofán-hidroxiláz génkiütött egér vizsgálata érdekes eredményeket hozott: míg a génkiütött egér perifériás szöveteiben valóban lecsökkent a szerotoninszint, az agykéregben és a hippocampusban nem változott számottevően [134]. Ezek az eredmények utaltak először arra, hogy a triptofán-hidroxiláznak legalább 2 génje van. A későbbiekben a 12-es kromoszómán azonosították a TPH2-t, és megállapították, hogy a két fehérje aminosav szekvenciája 71%-ban azonos [135].

A TPH2 genetikai polimorfizmusai közül funkcionális szempontból jól igazolt az 1463G/A SNP, mely egy aminosavcserét okoz (Arg441His), ami a szerotonin-termelés 80%-os csökkenésével jár. A szerotoninhiányt okozó allélvariáns viszonylag ritka (2% alatt), egyes adatok szerint azonban gyakorisága nő major depressziós betegek körében [136, 137]. Később azonban nagyobb populációkat vizsgálva sem tudták azonosítani a ritka TPH2 variánst [138-140]. Ugyanakkor újabb aminosavcserével járó SNP-ket fedeztek fel (Pro206Ser, Arg55Cys, Ser41Tyr), de a depresszióval való kapcsolatuk nem egyértelműen tisztázott. Újabban a gyakoribb, nem aminosav cserével járó SNP-k vizsgálata került előtérbe, melyeknél jelentős kapcsoltságot is kimutattak és két haplotípus blokkot azonosítottak, melyet összefüggésbe hoztak a major depresszió előfordulásával [141]. 2007-ben Lin és munkatársai a gén -703 (G/T) (rs4570625) és a -473 (A/T)-as pozícióban elhelyezkedő promóter-polimorfizmusok

funkcióját vizsgálták. Ennek során bemutatták, hogy a GA haplotípus hordozása a promóteraktivitás szignifikáns csökkenésével járt a többi három T allélt tartalmazó haplotípushoz képest [142]. Ezt követően a polimorfizmus további funkcionális jelentőségét célkeresztbe állító vizsgálatok részben alátámasztották a kezdeti eredményeket [143]. Ugyanakkor ezen kezdeti vizsgálatokkal ellentmondó eredmények is napvilágot láttak, ami miatt nem tekinthetjük lezártnak ismereteinket a TPH2 gén rs4570625 polimorfizmusáról [144]. A közelmúltban az rs4570625 polimorfizmusát összefüggésbe hozták az érzelmek szabályozásával; a G allél hordozása összefüggést mutatott szorongásos személyiségjegyek gyakoribb előfordulásával egészséges személyekben [145] és megváltozott amygdala funkcióval [146].

A szerotonin és más aromás aminok bontását a mitokondrium külső membránjában található monoamin-oxidáz (MAO) végzi. Két eltérő szubsztrát-specifitású izoformát ismerünk (MAO-A és MAO-B). Mindkettő génje az X kromoszóma rövid karján található [147]. A MAO-A elsősorban a szerotoninra és a noradrenalinra specifikus, míg a MAO-B a feniletil-aminokat és a dopamint bontja. Lokalizációjukat tekintve a MAO enzimek nemcsak az idegrendszerben fordulnak elő. Trofoblasztokban a MAO-A, thrombocitákban a MAO-B, fibroblasztokban pedig mindkét izoforma kimutatható. Farmakológiai szempontból a MAO-inhibitorok igen jelentősek, mint például a moclobemid, egy specifikus MAO-A inhibitor, a kedélybetegség egyik fontos gyógyszere [148].

3.2.3.4. Az agyieredetű neurotrofikus hormon (BDNF)

A BDNF (brain-derived neurotrophic factor)-t a kortikális neuronok termelik és inaktív formában szekretálják. Az előalak proteolitikus aktiválódás során alakul át a biológiailag aktív formává. Feltételezik, hogy a BDNF fontos faktora a neurogenesisnek, és szerepe lehet az idegsejtek stressz-érzékenységében is. A gén Val66Met polimorfizmusa megváltoztatja a fehérje szerkezetét. Kimutatták, hogy a metionin variáns in vivo és in vitro körülmények közt is alacsonyabb depolarizáció-indukált szekréciót hozott létre [149]. A BDNF szintje a depresszió biomarkereként is felvetődött, mivel szérumszintje alacsonyabb depressziós betegekben. Mindezek alapján a BDNF a pszichiátriai genetikai vizsgálatok egyik fontos kandidáns génje, és Val66Met polimorfizmusát összefüggésbe hozták kognitív defektusokkal és hangulati zavarokkal is [150].

3.2.3.5. Egy purinerg ioncsatorna, a P2RX7

Az utóbbi években elindult a major és az unipoláris depresszió teljes genom analízise (GWAS) is, mely érdekes eredményeket hozott. A 12q24.31-es kromoszómarégió részletes térképezése derített fényt a P2RX7 génvariánsok lehetséges szerepére major és a bipoláris depresszióban [151, 152]. Ez a purinerg receptor egy ATP-kötő kalciumcsatorna, mely neuronokon és mikroglia sejteken expresszálódik számos agyi régióban [153]. A P2RX7 génvariánsok funkcionális hatása, és az agyműködéssel való közvetlen összefüggése azonban nem tisztázott. Annyit azonban lehet tudni, hogy az egyik vizsgált SNP, mely a Gln460Arg aminosavcserét okozza, az ioncsatorna C-terminális doménjében hoz létre konformációváltozást, ami feltehetően hatással van a receptorfehérje ligandkötésére [154].

3.2.4. A DIABETES ÉS DEPRESSZIÓ KOMORBIDITÁSÁNAK OKAI

Diabeteses populációt vizsgálva azt találták, hogy a depresszió előfordulása gyakoribb pozitív családi anamnézis mellett, nőkben (a depresszió valószínűsége kétszeres a férfiakéhoz képest), alacsonyabb iskolázottság mellett, ha egyedül élnek és ha a környezetük kevés társas támogatást tud nyújtani a számukra, és ha elhízottak (BMI>30) [155]. Azt is kimutatták, hogy depresszióban szenvedő cukorbetegeknek magasabb a glikált hemoglobin-értéke (HbA1c) [156], ezért gyakrabban jelennek meg diabeteses szövődmények [157] ebben a betegcsoportban, mely gyógykezelésüket jóval költségesebbé teszi [158, 159]. Major depressziós cukorbeteg 80%-ának van 5 éven belül 1 vagy több depressziós relapsusa [160]. Az elmúlt években 4 longitudinális vizsgálat is bizonyította, hogy a depresszióval komorbid cukorbetegnek magasabb a mortalitása a nem depressziós cukorbeteghez képest [161-164]. A depresszió korai felismerése és kezelése cukorbetegben javíthatná a glükóz kontrollt, [165-167], ugyanakkor megfelelő pszichiátriai kezelésben a depressziós cukorbeteg populáció csupán 25%-a részesül.

A depresszió és a diabetes kapcsolatának legkézenfekvőbb magyarázata a cukorbetegség krónikus, sokszor az életminőséget rontó jellege lehetne. A diabetes krónikus betegség, élethosszig tartó hatással van a betegre, súlyos és progrediáló szövődményekkel jár (atherosclerosis, retinopathia, nephropathia, erektilis diszfunkció, lábszárfekély). Ez jelentősen rontja a beteg életminőségét, ami alapját képezheti a depresszió kialakulásának. A kapcsolat a depresszív szimptómák súlyossága és a diabeteses komplikációk között szintén szignifikáns. Súlyosabb depressziós tünetek súlyosabb és több diabeteses komplikációval társulnak [168].

Ez az összefüggés azonban nem elégséges, ahhoz, hogy megmagyarázzuk, miért gyakoribb a depresszió azon betegek esetében is, akiknél csupán az inzulinrezisztens állapot mutatható ki, illetve azoknál, akiknél a manifeszt cukorbetegség újonnan felfedezett. Ezen túlmenően ismert, hogy a diabetes súlyosságától függetlenül is kimutatható az asszociáció a depresszió, depresszív tünetek és a csökkent életminőség között [101]. Nemrégiben látott napvilágot egy tanulmány, mely szintén a két betegség közös eredetét támaszthatja alá. Az 1715 személy bevonásával történt vizsgálat szerint a depresszió (mint független rizikótényező) növeli a 2-es típusú cukorbetegség kialakulásának kockázatát, ugyanis a vizsgálatban résztvevő depressziósok 2.23-szor gyakrabban váltak cukorbeteggé, mint nem depressziós társaik. [169]

Depressziós állapotban változik az inzulin-érzékenység is. Régi tapasztalat, hogy major depresszióban gyakran kapunk kóros vércukor-terhelési görbéket, különösen, ha intravénás glükóztolerancia-tesztet vizsgáljuk a betegeket. Ez a hangulati tünetek javulásakor normalizálódik, míg a folyamatosan depressziós tüneteket mutató betegekben akkor sem, ha antidepresszív gyógyszeres kezelésben részesülnek. Az inzulin-rezisztencia javulásáért tehát nem a kezelésre használt gyógyszer, hanem a depresszió javulása a felelős [170]. A depresszió során kialakuló inzulin-rezisztencia nem függ össze sem az életkorral, sem a tápláltsági állapottal, sem a testsúllyal, sem a fizikai aktivitással vagy a vércukorértéket kedvezőtlenül befolyásoló hormonok szintjével [170].

A depresszió kapcsán kialakuló inzulin-rezisztencia okai pontosan még nem tisztázottak, de létrejöttében feltehetően több tényező is szerepet játszik. Mind a major depresszióra, mind pedig az inzulin-rezisztenciára jellemző a hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg rendszer és a szimpatikus idegrendszer aktivációja, és a szerotonin által közvetített ingerület-átvitel alulműködése. Ez felveti azt, hogy a két kórállapot kialakulásában hasonló élettani mechanizmusok is szerepelnek [171].

A hipotalamusz-mellékvese tengely magába foglalja számos hormon, többek között a stressz-hormonok és egyes anyagcsere-hormonok szabályozását is. Aktivitása követi a beteg állapotát, a depresszív állapot megszűntével normalizálódhat. Az is ismert, hogy a szteroid hormonok emelkedett szintje inzulin-rezisztenciával párosulhat. A depressziósok és a nem depressziósok között a különbség nem annyira a reggeli, inkább a délutáni és az esti kortizolszint tekintetében figyelhető meg. A szóba jövő tényezők között szerepel még a depresszióban túlműködő szimpatoadrenális szabályozás és a szintén fokozott aktivitást mutató hypothalamus-hypophysis-mellékvese tengely. Ezek a tényezők nem csak a diabetes kialakulásában, de annak progressziójában is szerepet játszhatnak. [172]

A depresszió egyes típusaiban megfigyelhető az agyi szerotonin ingerület-átvitel alulműködése. Ezt hivatottak kezelni az SSRI-ok, a szelektív szerotonin reuptake gátlók, amelyek a depresszió első vonalbeli gyógyszeres kezelésévé váltak az elmúlt évtizedben. Az agyi szerotonerg aktivitás és az inzulin érzékenység között egészséges önkéntesekben pozitív összefüggést találtak. Arról is beszámoltak már, hogy az SSRI-kezelés depressziós diabetesesekben javította a szénhidrát-anyagcserét, csökkent az inzulinszükséglet. Ezen kívül az is ismert, hogy a csökkent szerotonerg működés fokozott étvággal járhat. A szerotonerg transzmisszió és az inzulin érzékenység összefüggései annak is felvetik a lehetőségét, hogy a depresszió bizonyos formái, valamint az ehhez társuló inzulin-rezisztencia kialakulásának hátterében közös genetikai tényezők állhatnak [171, 173, 174].

A depresszió egyes, a szervezet immunrendszerében fontos szerepet játszó vegyületek, a citokinek aktivációján keresztül is hozzájárulhat inzulin-rezisztencia létrejöttéhez. A citokinek emelkedett szintje egyaránt megfigyelhető diabetesben és depresszióban, mely hozzájárulhat az inzulin rezisztenciához és a béta-sejt diszfunkcióhoz [175]. Olyan teóriák is léteznek, amelyek a diabetes okozta metabolikus változásokat hozzák kapcsolatba a depresszióval, a legújabb kutatások pedig a sejten belüli jelátviteli útvonalak megváltozását próbálják összefüggésbe hozni a két betegséggel. A citokinek közvetlenül és a hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg rendszeren keresztül is befolyásolhatják az inzulin érzékenységet. Ilyen tényező lehet még a dohányzás, az obesitas, és a gyulladásos citokinek hatása [172].

Bár az agyszövetet sokan a klasszikusan nem glükóz érzékeny szövetek közé sorolják, mára már világossá vált, hogy az inzulin bejut az agyba és receptorain keresztül, jelpályájának tagjait aktiválja [176]. Az 1960-as években Margolis és munkatársai leleményes kísérletben bizonyították, hogy a perifériásan beadott inzulin egy része megjelenik a liquorban, tehát átjut a vér-agy gáton [177] sőt az agy bizonyos régiói in situ is előállítják a hormont, amely agyi inzulinreceptorokhoz kötődve a kognitív funkciókat és a hangulati életet befolyásolja [178]. Az agyba jutott inzulin, csakúgy, mint más szövetekben, az inzulin receptoron keresztül hat. 1978-ban Havrankova és munkatársai mutatták ki először az inzulin receptor jelenlétét a KIR-ben [179]. Azóta tudjuk, hogy az inzulin receptor az agy számos területén jelen van, legnagyobb koncentrációban a bulbus olfactorius, a hypothalamus, a cerebralis cortex, a kisagy és a hippocampus területén. Az inzulin központi idegrendszerei hatásaival kapcsolatoúj ismeretek egy eddig még fel nem tárt magyarázatát adhatják a diabetes és a depresszió kapcsolatának.

A közelmúltban a neurotranszmisszióban és az inzulintartalmú granulumok exocitózisában egyaránt fontos szerepet játszó kipányvázó fehérjék (mint pl. a SNAP25) génpolimorfizmus vizsgálatai is megerősítik a cukorbetegség és a depresszió kapcsolatát.[180].

Több szerző utal arra, hogy a diabetes és a depresszió közötti kétirányú kapcsolat létezik [155]. A depresszió azért növelheti a diabeteses komplikációk előfordulásának valószínűségét, mert csökkenti a beteg terápiás együttműködését, növeli az egészségre káros magatartásformák számát, és gyakran társul autonóm idegrendszeri abnormalitásokkal. Megfordítva, a diabetesben jelentkező funkcionális és fizikális változásokra (például a krónikus neuropátiás fájdalomra) adott pszichés válasz, hozzájárulhat a depresszió kialakulásához. [155]. Vannak kutatók, akik a depresszió oldaláról közelítik meg a problémát, és a depresszióban növekedett pszichés stressz szerepét hangsúlyozzák. A hosszú távú pszichés stressz növeli a kontrainzuláris hormonok (katekolaminok, glukagon, glukokortikoidok, növekedési hormon) szintjét, ami hyperglykaemiát okoz, és csökkenti a sejtek glükózfelvételét, ami diabetogén hatású.

4. CÉLKITŰZÉSEK

A bemutatásra kerülő munka fő célkitűzése a **diabetes mellitus és a komorbid depresszió genetikai háttértényezőinek vizsgálata** a pathomechanizmus jobb megértése céljából.

A munka első részében **eset-kontroll asszociációs vizsgálatokat kívántunk végezni diabeteszes betegek és kontroll személyek genetikai polimorfizmusainak vizsgálatával**. Kandidáns génvizsgálatainkban olyan gének analízisét tűztük ki célul, melyeket eddig a szakirodalomban még nem, vagy csak más szubpopuláción vizsgáltak. Vizsgálatainkhoz nem-invazív mintavételi eljárást (szájnyálkahártya-minta), és a kismennyiségű DNS-nek megfelelő, érzékeny genotipizálási módszereket kívántuk használni.

1. Célul tűztük ki a **Kv1.3 (KCNA3) gén** promóter-régiójában, a -1645-ös pozícióban elhelyezkedő **SNP** (rs2821557) vizsgálatát. Ezt a kandidáns polimorfizmust a következő okok miatt választottuk ki: (1) KCNA3 génkiütött egerek vizsgálata valószínűsítette, hogy ennek az ioncsatornának szerepe lehet az elhízás, illetve az inzulin-rezisztencia kialakulásában; (2) egy előzetes, egészséges populáción történt vizsgálatban kimutatták, hogy a gén T-1645C polimorfizmusa összefüggésben áll az inzulin-rezisztenciával és a csökkent glükóz toleranciával. Diabeteses betegeken azonban munkánk megkezdésekor nem történt még ilyen jellegű vizsgálat.

2.-3. Célul tűztük ki a **HIF- α génjének (HIF-1 α)** 12-es exonjában található, aminosavcserét (Pro582Ser) okozó **SNP** (rs11549465) **eset-kontroll analízisét**, mivel japán populációban előzetesen kimutatták [181] ennek az SNP-nek és a 2TDM előfordulásának szignifikáns összefüggését, azonban kaukázusi populációra nem voltak még adatok.

Célunk a fenti polimorfizmusok allél és genotípus gyakoriságának meghatározása volt 1-es típusú és 2-es típusú diabetes mellitusban szenvedők csoportjaiban, valamint egy kontroll csoportban.

Munkánk második fázisában **hangulatkérdőívek segítségével kívántuk felmérni a komorbid depresszió előfordulását betegcsoportunkban.** A nemzetközileg elfogadott, magyar fordításban is fellelhető és validált kérdőívek közül a **Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)** önkitöltő kérdőívet kívántuk felhasználni, mivel szakirodalmi adatok alapján jól elkülöníti az enyhe/közepes/erős súlyosságú depressziós eseteket.

Genetikai vizsgálatainkhoz 2 szerotonerg (5HTTLPR és TPH2) és két nem-szerotonerg (BDNF és P2RX7) kandidáns gént választottunk ki, melyeket korábban már összefüggésbe hoztak a major és/vagy a bipoláris depresszió előfordulásával.

4-5. A **nem szerotonerg kandidáns gének** közül a pszichiátriai genetika egyik sokat vizsgált kandidáns génjét, a **BDNF (brain-derived neurotrophic factor) Val66Met polimorfizmusát** (rs6265) kívántuk vizsgálni, valamint az uni- és bipoláris depresszióval a közelmúltban összefüggésbe hozott purinerg ioncsatorna génjét, a **P2RX7 Gln460Arg** aminosav cserét okozó SNP-jét (rs2230912).

Kérdésfeltevéseink a következők voltak:

(a.) **Kimutatható-e a diabetes csoportban genetikai hatás a komorbid depresszió vonatkozásában?**

(b.) **Kimutatható-e „gén-környezet” kölcsönhatás a depresszióval összefüggő genetikai faktor („gén”) és a betegek anyagcsereállapota (belső „környezet”) között?**

6. A fenti, széles körben vizsgált polimorfizmuson kívül még választottunk egy viszonylag **új szerotonerg kandidáns gént, a triptofán-hidroxiláz 2-t (TPH2 promóter - 703GT, rs4570625 SNP).** A triptofán-hidroxilázról ugyanis, mely a szerotonin-szintézis kulcsenzime, nemrég mutatták ki, hogy 2 izoformában fordul elő (TPH1 és TPH2).

7. A **szerotonerg polimorfizmusok** közül vizsgálni kívántuk a **szerotonin-transzporter promóter polimorfizmusát (5HTTLPR),** melyről korábban már kimutattak gén környezet kölcsönhatást kontroll populációban: a genetikai hatást erősebbnek találták azoknál, akiknél korábban stresszes életesemények is előfordultak.

5. MÓDSZEREK

5.1. RÉSZTVEVŐK

Végső analízisünk során 370 2TDM, 166 1TDM valamint 354 önkéntes (nemben illesztett) kontroll (K) személy adatait dolgoztuk fel. A résztvevőket részletesen tájékoztattuk a vizsgálat céljáról, és a vizsgálatához való hozzájárulásukat aláírásukkal rögzítettük. A vizsgálatok szakmai-etikai engedélyét az ETT-TUKEB adta meg.

A nem cukorbeteg kontroll személyeket az Eötvös Loránd Tudományegyetemen vontuk be vizsgálatunkba ($n=354$; kor: $25,1 \pm 8,5$ év; 32,5% férfi és 67,5% nő).

A betegek a Semmelweis Egyetem II-es és III-as számú Belgyógyászati Klinika járóbeteg-ambulanciáján és fekvőbeteg-részlegén gondozott egyénekből kerültek ki. A diabetes diagnózisának felállítása éhomi vércukorértékek illetve 75 gramm orális glükózterhelés kiértékelése (OGTT) alapján történt a WHO kritériumainak megfelelően. A két betegcsoport demográfiai paraméterei a következők voltak: 1TDM: $n=166$; kor: $36,9 \pm 13,1$ év; 54,8% férfi és 45,2% nő. 2TDM: $n=370$, kor: $64,0 \pm 12,0$; év 41,9% férfi és 58,1% nő. A vizsgálatban résztvevők között kezelésük tekintetében nem tettünk különbséget. A betegek szövödményeit és kísérőbetegségeit rögzítettük, majd az alábbi kizárási kritériumokat állítottuk fel:

A diabetes mellitus genetikai háttértényezőinek vizsgálata esetében kizáró ok volt bármely ismert genetikai betegség, egyéb inzulinrezisztenciával járó ismert endokrin betegség (hypo-, illetve hyperthyreosis, Cushing kór stb.), hasnyálmirigy-gyulladás okozta diabetes, szteroid készítmény szedése.

A diabetes mellitussal komorbid depresszió genetikai háttértényezőinek vizsgálata során kizártuk az antidepresszánt szedő cukorbetegeket - hiszen a gyógyszer-szedés befolyásolta volna hangulatukat jelző pontszámaikat –, valamint azokat, akik bármilyen súlyos, akut vagy krónikus megbetegedésben szenvedtek, mely életminőségüket jelentősen befolyásolta volna (pl. rosszindulatú daganatos betegség, veseelégtelenség, májelégtelenség stb.).

5.2. HANGULATMÉRŐ KÉRDŐÍV

A depresszió kvantitatív mérése céljából a Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) [100] kérdőívet használtuk fel, melynek magyar verzióját Halmai és munkatársai [182] validálták. A HADS kérdőív a depresszió és a szorongás jellemzésének nemzetközileg

elfogadott, önkítöltő kérdőíve, mert jól elkülöníti az enyhe/közepes/erős súlyosságú eseteket [183]. A kérdőív alkalmas a hangulati zavarok súlyosságának kvantitatív mérésére [184]. Két fő skálája a szorongás (HADSa) és a depresszió (HADSd) mértékét jellemzi. Mindkét skálához 7 kérdés tartozik. Az egyes kérdésekre 0-3 pontos választ lehet adni. A maximálisan elérhető pontszám egy adott skálán 21 pont. A kapott érték 0-7-ig normális, 8-10-ig közepes, 11 fölött pedig súlyos pszichés állapotra utal [185]. Hazai vizsgálatok alapján [186] a magyar fordítású kérdőív skálaértékeinek belső konzisztenciája megfelelő volt.

5.3. SZÁJNYÁLKAHÁRTYA-MINTAVÉTEL ÉS DNS-IZOLÁLÁS

A résztvevőktől nem-invazív eljárással vettünk szájnyálkahártya mintát előzetesen leírt módszer szerint [187]. Minden személy két, független mintát adott (A és B). A mintákat –

20 C°-on (mélyhűtőben) tároltuk. A DNS-izolálás Dr. Sasvári Mária laboratóriumában történt, a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Genetikai és Patobiokémiai Intézetében Gentra DNS-izoláló kit (Minneapolis, US) használatával történt. PCR-RFLP esetében az A és a B mintából egyszerre történt a genotípus meghatározása, real-time PCR alkalmazása esetén általában az A minták kerültek feldolgozásra, majd esetenként ellenőrzés céljából a B minták is, mert a real-time PCR megbízhatósága jóval nagyobb. Azokat az eredményeket fogadtuk el, ahol az A és B minta alapján meghatározott genotípus azonos volt.

5.4. POLIMORFIZMUSOK VIZSGÁLATA

5.4.1. HOSSZÚSÁG-POLIMORFIZMUSOK VIZSGÁLATA

Hosszúság-polimorfizmus vizsgálata esetén a bevezetőben leírtak (2.1.4.1. fejezet) alapján a megfelelő DNS-fragmentum PCR-amplifikációja után a genotípus meghatározása az elektroforetikus mobilitás alapján történt.

5.4.1.1. A szerotonin-transzporter-gén promóter-polimorfizmusának (5-HTTLPR) meghatározása

Az 5-HTTLPR rövid (s) és hosszú (l) variánsok (14 és 16 ismétlődés, rendszerünkben 469 és 512 bp fragmentumok) meghatározása Dr. Sasvári Mária laboratóriumában történt, az általuk validált módszerrel [188], melyet kiegészítettünk a benne lévő A/G SNP (rs25531) genotipizálásával Wendland módszere [189] szerint. Az A/G SNP genotipizálása RFLP-vel, a

HpaII restrikciós endonukleáz felhasználásával történt. A *HpaII* G jelenlétében hasít (SG: 402+ 67 bp; LG: 402+110 bp). Az eredményül kapott genotípusok (S'S', S'L' és L'L') a hosszúság-polimorfizmus és az SNP-adatok funkcionális egyesítése alapján történt (Parsey et al., 2006) szerint: S'S' = SS+SL_G+L_GL_G; S'L' = SL_A + L_AL_G, L'L' = L_AL_A.

5.4.1.2. SNP-vizsgálatok PCR-RFLP-vel

Az SNP-vizsgálatok klasszikus módszere a PCR-RFLP, melynek elve a 2.1.4.2-es fejezetben került összefoglalásra. Az egyes SNP-k vizsgálata a PCR-termociklus paramétereiben, az alkalmazott primerekben és a restrikciós enzimekben különbözik.

Kv1.3 gén (KCNK3) -1645CT SNP: Az alkalmazott PCR reakció: 15 perc 95 C°, majd 40 ciklus (94 C° 60 mp, 60 C° 30 mp, 72 C° 60 mp). A PCR termék meghatározása a *Tsp509 I* restrikciós endonukleáz alkalmazásával történt. A 141 bp hosszúságú PCR-termék két hasítási helyet tartalmazott: a kontroll hasítás egy 40 bp terméket adott, az allélspecifikus hasítás eredménye T allél esetében egy 31 és egy 70 bp hosszúságú fragmentum, C allél esetében a 141 bp PCR termék csak a kontroll hasítási helyen vágódik el (101 bp + 40 bp). Az emésztés körülményei: 0.1 egység enzim, restrikciós puffer a gyártó előírása szerint (1 x NEBuffer 1) 45 µl végtérfogatban + 5 µl PCR termék. Az emésztés 65 C°-on történt 12 óráig. A termékek elválasztása 1,5%-os agaróz – 2% metaphor kevert gélű horizontális agaróz gélelektroforézis, 1 óra futtatás 100 V feszültséggel.

HIF-1α gén 45035 C/T SNP: Az alkalmazott PCR reakció: 15 perc 95 C°, majd 40 ciklus (94 C° 30 mp, 52 C° 30 mp, 72 C° 60 mp). A PCR termék restrikciós emésztéséhez használt enzim a *Tsp45 I*, mely C genotípus esetén hasít mind a vizsgált, mind a kontroll pozícióban, így három különböző méretű terméket kapunk (121, 139 és 194 bp). T genotípus esetén a restrikciós emésztés csak a kontroll helyen történik meg, így két termék keletkezik (260 és 194 bp). Az emésztés körülményei: 0.2 egység enzim, 0.1 g/L BSA, restrikciós puffer a gyártó előírása szerint (1 x NEBuffer 1) 45 µl végtérfogatban + 5 µl PCR termék. Az emésztés 65 C°-on történt 12 óráig. A termékek elválasztása 1,5%-os agaróz – 2% metaphor kevert gélű horizontális agaróz gélelektroforézis, 1 óra futtatás 100 V feszültséggel.

5.4.1.3. SNP vizsgálatok valós idejű PCR-rel

A valós idejű PCR alkalmazása az SNP-vizsgálatokban jelentősen meggyorsította a genotipizáló munkát, ugyanis a genotípus meghatározásához csupán egyetlen lépés - a PCR-amplifikáció – szükséges, ahol a termociklus egy 10 perces 95 fokos DNS denaturációval és enzimaktivációval kezdődik, majd ezt követi 35-40 ciklus, ciklusonként két fázissal (95 °C –

15 sec, 60 °C – 1 perc). Minden esetben az Applied Biosystems TaqMan© rendszerét használtuk, melynek elvét a 2.1.4.3-as fejezet tartalmazza. A vizsgálatok 6 µl végső térfogatban történtek, mely tartalmazott 1-10 ng genomi DNS-t, valamint az Applied Biosystems-től megrendelt „ABI TaqMan mix”-et és a primerek-próbák keverékét. Az egyes SNP-k vizsgálatánál mindössze az alkalmazott primerek és próbák térnek el, melyek előre meghatározott kit-ben vásárolhatók, illetve esetenként Dr. Sasvári Mária laboratóriumában kerültek megtervezésre. A módszert a következő polimorfizmusok meghatározására alkalmaztuk: KCNA3 (-1645CT SNP, rs2821557), HIF-1 α -gén P582S (45035CT SNP, rs11549465), triptofán-hidroxiláz 2 (TPH2) promóter (-703GT, rs4570625 SNP), BDNF Val66Met (CT SNP, rs6265), P2RX7 gén Gln460Arg (AG SNP, rs2230912).

5.5. STATISZTIKAI MÓDSZEREK

A statisztikai elemzéseket a Windows SPSS 13.0 szoftver alkalmazásával végeztük.

Eset-kontroll vizsgálataink során a mért genotípus-gyakoriságok nem tértek el a Hardy-Weinberg egyensúly értékétől. Ez esetben a Pearson-féle Chi négyzet, illetve Fisher-féle egzakt tesztekkel végeztük a statisztikai elemzést.

A depresszió tüneteinek értékelése során a HADS pontszámok nem mutattak normál eloszlást. Ezért négyzetgyök-transzformációt alkalmaztunk a HADS pontszámokkal való számítás esetén. Kétmintás T-próbát és Pearson korrelációs tesztet alkalmaztunk a nemi és kor hatásának tesztelése a HADS pontszámokra.

A gén környezet interakció vizsgálatához többszemponos variancia-analízist (MANOVA) használtunk.

A többszörös összehasonlításból eredő téves felderítési arány elkerülése végett a szignifikancia-küszöböt jelentő p-értéket Benjamin és munkatársai képlete alapján számítottuk [190].

6. EREDMÉNYEK

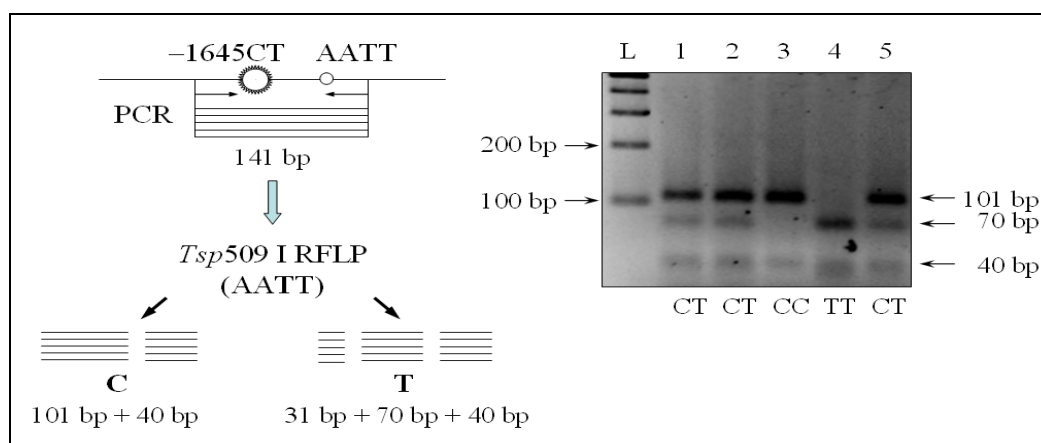
6.1. A DIABETES ÚJ GENETIKAI FAKTORAI

6.1.1. A Kv1.3 (KCNA3) GÉN -1645C/T SNP VIZSGÁLATI MÓDSZERÉNEK KIVÁLASZTÁSA

A vizsgált kandidáns gén neve a „HUGO Gene Nomenclature Committee” alapján KCNA3 (potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 3). A molekuláris genetikai szakirodalomban egyre inkább ezt a nevet használják, azonban a szakirodalomban elterjedten fordul elő a Kv1.3 (voltage-gated potassium channel protein Kv1.3) elnevezés is. A továbbiakban, az orvosi irodalomban inkább elterjedt Kv1.3 nevet használom. A Kv1.3 -1645C/T SNP meghatározásához két, független módszert (PCR-RFLP és valós idejű PCR) használtunk fel.

PCR-RFLP alkalmazása a Kv1.3 -1645C/T SNP meghatározására

A 6. ábrán a Kv1.3. gén -1645C/T SNP PCR-RFLP-vel való genotipizálásának elvét, és egy tipikus eredményrészletet látható.



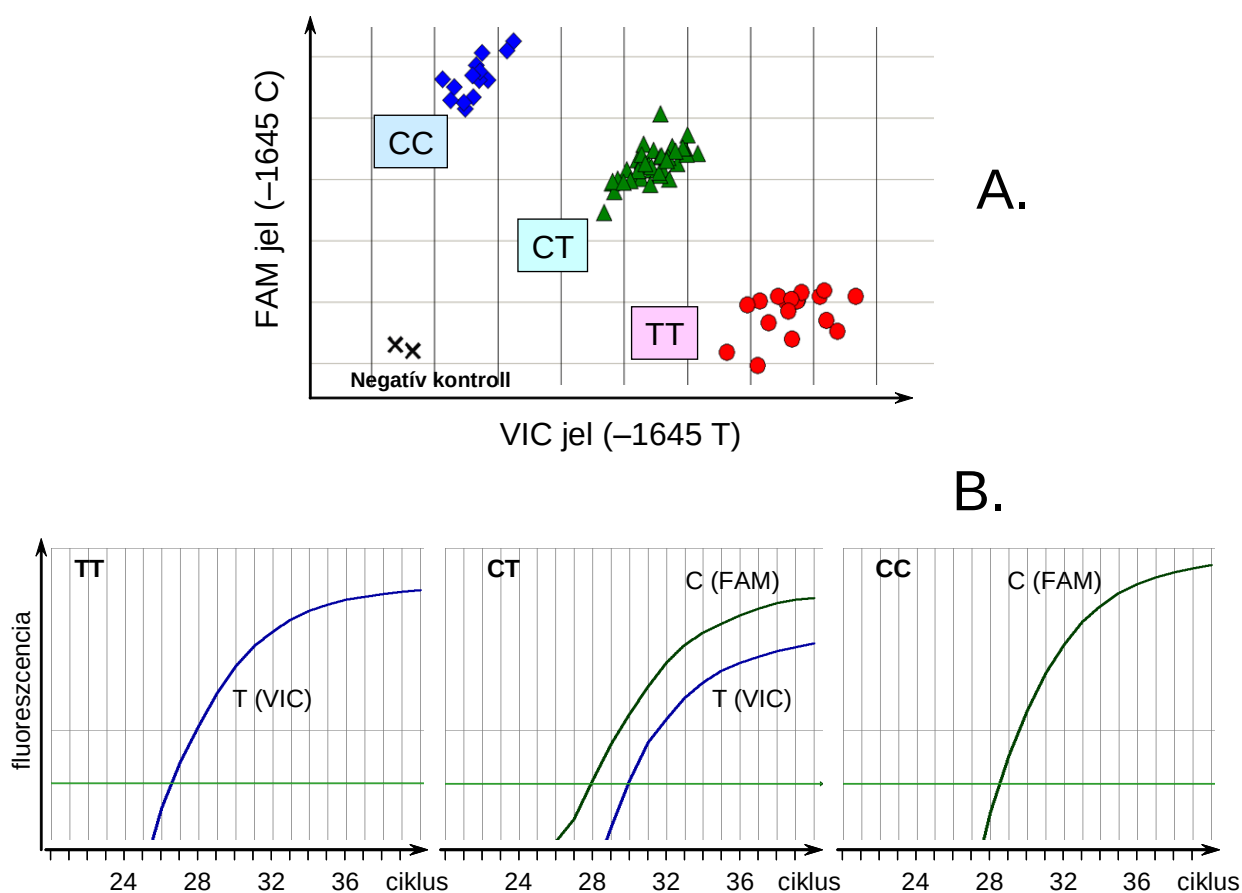
6. ábra. A Kv1.3 gén -1645C/T SNP vizsgálata PCR-RFLP módszerével

Forrás: saját közlemény alapján rajzolva [191]

A: A módszer elve: A Kv1.3 gén promóterrégiójából 141 bp hosszúságú szakaszt sokszoroztunk fel PCR-el, mely tartalmazza a -1645C/T SNP-t. A Tsp509I nevű restrikciós endonukleáz az AATT szekvenciát hasítja specifikusan. A PCR-rel felsokszorozott szakasz két ilyen hasítási helyet tartalmaz. Az egyik magába foglalja a vizsgálandó SNP-t (nagyobb kör), a másik egy kontroll hasítási hely (kisebb kör). A PCR-reakciót követő restrikciós hasítás során C allél jelenlétében csak a kontroll helyen történik vágás, és egy 101 bp és egy 40 bp méretű termék keletkezik. T allél esetében a vizsgálandó -1645 helyen is emészt a DNS-t az enzim, így három terméket kapunk (31 bp + 70 bp + 40 bp). B: A PCR-RFLP termékeinek elválasztása agaróz-gélelektroforézissel: Az ábra egy tipikus elektroforézis képet mutat be, mely mutatja, hogy a 3 féle, különböző méretű termék az elektroforézis során jól láthatóan elválik. L: 100 bp „létra” (marker); 1-5: vizsgált DNS minták; a leolvasható genotípus: 1: CT; 2: CT; 3: CC; 4: TT; 5: CT.

Valós idejű PCR módszer alkalmazása a Kv1.3 -1645C/T SNP meghatározására

A 7. ábra egy tipikus eredményt mutat be valós idejű PCR-t használva. A PCR amplifikáció során -1645C és -1645T allélspecifikus próbákat alkalmaztunk, melyek különböző fluoreszcens festékekkel voltak jelölve. A fluoreszcencia-intenzitás növekedése a megfelelő allél jelenlétét mutatja. Bár a valós idejű PCR készülékekben a fluoreszcencia intenzitás folyamatosan detektálható, jelen esetben elegendő volt az úgynevezett végpont-detektálás, azaz a fluoreszcencia intenzitások értéke a PCR reakció végén (lásd 7. ábra). A mérési eredmények azt mutatják, hogy a kiválasztott TaqMan rendszer allélspecifitása igen megbízható, azaz a három genotípuscsoport a mérés során jól elkülönül egymástól és a DNS-t nem tartalmazó negatív kontrolltól.

**7. ábra. A Kv1.3 gén -1645C/T SNP vizsgálata valós idejű PCR használatával**

Az ábra „A” részében 94 minta és 2 negatív kontroll (x) TaqMan rendszerrel történő genotipizálásának eredményeit mutatja be. A tengelyeken az allél specifikus próbákból lehasadó festékek fluoreszcencia-intenzitása van feltüntetve. Látható, hogy a 3 genotípus csoport (CC=kék négyzet; CT=zöld háromszög; TT=piros kör) jól elkülönül. Az ábra „B” része a különböző genotípusú minták tipikus időbeli lefutás-görbéjét mutatja. *Forrás: saját közlemény alapján rajzolva [190]*

A két módszer összehasonlításának eredménye

100 kontroll minta parallel genotipizálása a fent bemutatott PCR-RFLP és valós idejű PCR technikával azonos eredményt adott, mely egyben validálja mindkét módszert. A továbbiakban a gyorsabb és kevesebb munkát igénylő (de költségesebb) TaqMan rendszert használtuk.

6.1.2. A Kv1.3 (KCNA3) GÉN -1645CT SNP ESET-KONTROLL VIZSGÁLATA

A Kv1.3 gén promóter régiójában, a -1645-ös pozícióban elhelyezkedő SNP és a diabetes esetleges kapcsolatának vizsgálatához egy monocentrikus, keresztmetszeti tanulmány keretében [191] összesen 420 cukorbeteg (ebből 370 2TDM és 50 1TDM), valamint 274 nemben illesztett kontroll (nem cukorbeteg) személy genotípusát határoztuk meg.

A KCNA3 gén -1645CT polimorfizmusára kapott allél és genotípus eloszlás eredményeit a 4. és az 5. táblázatok foglalják össze. A 4. táblázat az allél gyakoriság értékeit tartalmazza. Amint ez a táblázatból látható, a -1645C allél a ritkább, a -1645T a gyakoribb mindegyik populációban. Ugyanakkor a -1645C allél valamivel magasabb frekvenciával (42,3%) fordult elő a kontroll csoportban, mint a betegcsoportokban. A C allél előfordulási gyakorisága a 2TDM csoportban 38,9%-ra, az 1TDM csoportban 36%-ra csökken, de ezek a különbségek statisztikailag nem bizonyultak szignifikánsnak (K vs. 2TDM: $p=0,217$; K vs. 1TDM: $p=0,481$).

	Kv1.3 allél		
	-1645 C	-1645 T	összes
Kontroll	42,3% (232)	57,7% (316)	100% (548)
1TDM	36% (36)	64% (64)	100% (100)
2TDM	38,9% (288)	61,1% (452)	100% (740)

4. táblázat. A Kv1.3 gén -1645C/T polimorfizmusának allél gyakoriság értékei.

Kontroll: nem cukorbeteg csoport; 2TDM=2-es típusú diabetes; 1TDM=1-es típusú diabetezzel diagnosztizált betegcsoport. A táblázat tartalmazza a vizsgált allélok százalékos megoszlását, valamint a konkrét esetszámot zárójelben.

Forrás: saját közlemény [191]

A 5. táblázat a mért genotípus gyakoriságértékeit mutatja. Az allél és a genotípus gyakoriság összehasonlítása során megállapítottuk, hogy a vizsgált genotípus megfelel a Hardy-Weinberg egyensúlynak, azaz az allélgyakoriság értékeiből számolható elméleti genotípus-gyakoriságok nem különböznek szignifikánsan a mért genotípus-gyakoriságoktól. Ez részint a genotipizáló módszer megbízhatóságát, részint pedig a vizsgált populáció (kaukázusi) homogenitását igazolja.

Az eset-kontroll vizsgálat során megállapítottuk, hogy a CC genotípus előfordulási gyakorisága a kontroll csoportban a legmagasabb (19%), a 2TDM csoportban valamelyest csökken (14.9%), az 1TDM csoportban ez a csökkenés még kifejezettebb (10%), a különbség azonban statisztikai értelemben nem szignifikáns. A CT és a TT genotípusok előfordulása hasonlóan változik a kontrollhoz képest, ezért megengedhető a CT és a TT genotípus kategóriák összevonása. Az összevonás után kapott értékeket a táblázat utolsó két oszlopa mutatja. Mivel ebben az esetben csupán két kategóriával számolunk, a statisztikai próba ereje megnő, és az 1TDM vs. K csoportok összehasonlításának vonatkozásában a Fisher-féle egzakt teszt tendenciózus eltérést mutat ($p=0,087$).

	Kv1.3 genotípus				Összevont genotípus	
	CC	CT	TT	összes	CC	CT+TT
Kontroll	19% (52)	46,7% (128)	34,3% (94)	100% (274)	19% (52)*	81% (222)*
1TDM	10% (5)	52% (26)	38% (19)	100% (50)	10% (5)*	90% (45)*
2TDM	14,9% (55)	48,1% (178)	37% (137)	100% (370)	14,9% (55)	85.1% (315)

5. táblázat. A Kv1.3 gén -1645CT genotípus gyakoriság eloszlása [191].

A táblázat tartalmazza az egyes genotípus csoportok százalékos megoszlását, valamint az ehhez tartozó tényleges elemszámot. *Fisher-féle egzakt teszt: $p=0,087$.

Forrás: saját közlemény [191]

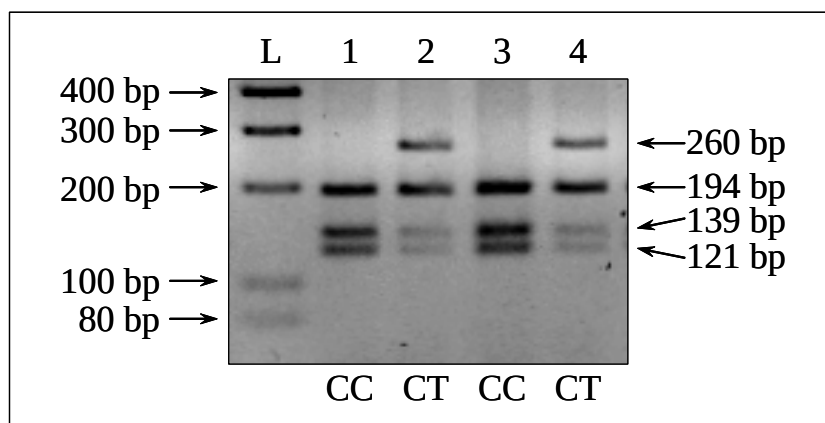
6.1.3. A HIF-1 α gén 45035 C/T (rs11549465) SNP VIZSGÁLATA

6.1.3.1. A HIF-1 α gén 45035 C/T SNP vizsgálati módszerének kiválasztása

Az optimális genotipizáló rendszer kiválasztása ebben az esetben is két független módszer, a PCR-RFLP és a TaqMan valós idejű PCR összehasonlító elemzésével történt.

PCR-RFLP alkalmazása a HIF-1 α gén 45035 C/T SNP meghatározására

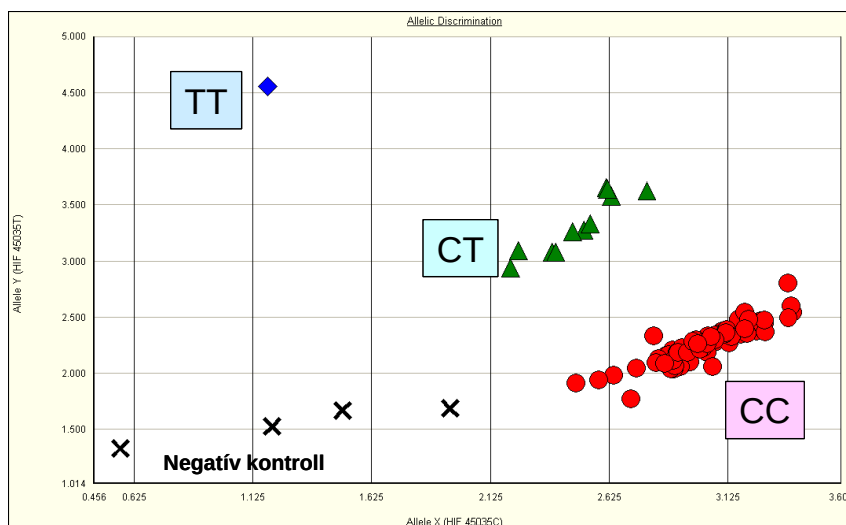
A PCR-RFLP módszerben a *TspI* nevű restrikciós enzim tűnt alkalmasnak a kétféle allél megkülönböztetésére. A módszer továbbfejlesztett változataként olyan primerek alkalmazására került sor, mely egy kontroll hasítási helyet is tartalmazott, hasonlóan a Kv1.3 gén vizsgálatánál leírtakhoz. Így a PCR során egy 454 bp nagyságú termék keletkezett, melynek *TspI* emésztett fragmentumai a genotípus szerint alakultak: T allél jelenléte esetén csak a kontroll, nem polimorf helyen történt hasítás, és így egy 260 bp és egy 194 bp nagyságú termék keletkezett. C allél esetében a vizsgálandó SNP régiójában egy további hasítás történt, így a 260 bp termék két kisebb fragmentumra (121 bp és 139 bp) esett szét. A 8. ábra a PCR-RFLP-vel történő genotipizálás egy tipikus eredményrészletét mutatja be. Az ábrán a nagyon ritka TT homozigóta személy nem látható, erre a genotípusra a 260bp és 194 bp termékek jelenléte, ugyanakkor a 121 bp és 139 bp fragmentumok hiánya jellemző.



8. ábra. A HIF-1 α gén 45035 C/T SNP vizsgálata PCR-RFLP-vel

Az ábrán egy molekulatömeg-marker (L) és 4 személy (1-4) DNS mintájának vizsgálata látható. A baloldalon a molekulatömeg-marker fragmentumok mérete, a jobb oldalon a restrikciós fragmentumok számított mérete van feltüntetve. Az ábra alsó felében a meghatározott genotípusok láthatók.

Forrás: saját közlemény alapján rajzolva [192]

Valós idejű PCR módszer alkalmazása a HIF-1 α gén 45035 C/T SNP meghatározására

9. ábra. A HIF-1 α gén 45035 C/T SNP vizsgálata TaqMan próbával

Az ábra „A” része 94 minta és 2 negatív kontroll (x) TaqMan rendszerrel történő genotipizálásának eredményeit mutatja be (2 minta mérése nem sikerült, mert fluoreszcencia intenzitásuk egyik kijelölt tartományba sem esett bele). A tengelyeken az allél specifikus próbákból lehasadó festékek fluoreszcencia intenzitása van feltüntetve. Látható, hogy a 3 genotípus csoport (TT=kék négyzet; CT=zöld háromszög; TT=piros kör) jól elkülönül. Az ábra „B” része a különböző genotípusú minták tipikus időbeli lefutás-görbéjét mutatja. *Forrás: saját közlemény alapján rajzolva* [192]

A másik, független módszer során allélspecifikus TaqMan próbákat alkalmaztunk, melyek megfelelően specifikusnak tűntek ahhoz, hogy a genotípus a valós idejű PCR során végpontdetektálással (lásd 9. ábra) leolvasható legyen.

A két módszer összehasonlításának eredménye

150 minta genotipizálása mindkét módszerrel ellentmondásos eredményt adott: a heterozigóták genotípusa az esetek több mint 10%-ában nem egyezett. A vitás minták szekvenálási eredménye azt mutatta, hogy a PCR-RFLP során esetenként nem jön létre a restrikciós hasítás a vizsgált SNP helyén annak ellenére, hogy a kontroll hasítás megtörténik. Ennek magyarázata az volt, hogy egy 4 bp távolságban elhelyezkedő másik SNP (rs34005929) esetenként gátolta a restrikciós enzim működését. Így az allél specifikus TaqMan rendszer használata nemcsak gyorsabbnak, de megbízhatóbbnak is bizonyult ebben a genotipizáló rendszerben.

6.1.3.2. Nemi hatás vizsgálat

A HIF-1 α gén rs11549465 eset-kontroll vizsgálata 536 cukorbeteg (370 2TDM és 166 1TDM) és 354 kontroll (nem cukorbeteg) személy bevonásával történt. Korábbi vizsgálatok szerint a nemnek befolyása lehet a szénhidrát-anyagcserére [193, 194], ezért a statisztikai

analízis első lépéseként megvizsgáltuk, hogy van-e kimutatható különbség a genotípus csoportok nemi megoszlásában. Eredményeinket a 6. táblázat mutatja. Mivel a TT genotípus ritka (<5%), ezeket összevontuk a CT genotípusú heterozigótákkal, és így egy T allélt hordozó (CT+TT) és egy T allélt nem hordozó csoportot hoztunk létre. Pearson χ^2 próbát alkalmazva nem találtunk különbséget a genotípusok nemek szerinti megoszlásában egyik vizsgált csoportban sem (Kontroll: $p=0.379$; 1TDM: $p=0.435$; 2TDM: $p=0.624$).

	Genotípus	férfi	nő
Kontroll	CC	73.0% (84)	77.4% (185)
	CT + TT	27.0% (31)	22.6% (54)
T1DM	CC	86.8% (79)	82.7% (62)
	CT+TT	13.2% (12)	17.3% (13)
T2DM	CC	81.3% (126)	83.3% (179)
	CT+TT	18.7% (29)	16.7% (36)

6. táblázat. A hypoxia-indukábilis faktor-1 alfa (rs11549465) C/T SNP genotípus megoszlása férfiak és nők között

A táblázat tartalmazza a genotipizált személyek számát, valamint azok százalékos megoszlását. C= 45035C allél; T= 45035T allél

Forrás: saját közlemény [192]

Megvizsgáltuk azt is, hogy összefüggés mutatható-e ki a vizsgált SNP és a diagnózis időpontja, illetve a testtömegindex között, de nem találtunk különbséget a T allélt hordozó és nem hordozó csoportok között.

6.1.3.3. A HIF-1 α gén C/T SNP eset-kontroll vizsgálata

Vizsgálatunk fő célja az volt, hogy megállapítsuk, van-e összefüggés a HIF-1 alfa polimorfizmusa és a diabetes előfordulása között. A 7. és 8. táblázatban látható az allél- és genotípus frekvenciák megoszlása százalékos értékekben kifejezve (zárójelben megadva a tényleges esetszámot). Első lépésként a cukorbeteg csoportot összességében hasonlítottuk össze a kontroll csoporttal (7. táblázat), majd ezt követően felbontottuk a betegcsoportot a diabetes típusa szerint 1TDM és egy 2TDM alcsoportokra (8. táblázat). A 7. és 8. táblázat adatai mutatják, hogy statisztikailag szignifikáns különbség mutatható ki mind a genotípusok, mind pedig az allélfrekvenciák megoszlásában az összevont beteg- és a kontroll csoport közt. A betegcsoportban a CC homozigóta genotípus szignifikánsan gyakrabban fordult elő a kontroll csoporthoz viszonyítva (83.2% vs. 76% $\chi^2(2)=10,792$, $p=0.005$). Ezzel egybevágyóan

a betegcsoportban a T allél ritkábban fordult elő (8,7%) mint a kontrollokban (13,3%) $\chi^2(1)=9,602$, $p=0.002$.

		Kontroll (K)	Cukorbeteg (C)	K vs. C
eredeti genotípus	CC	76.0% (269)	83.2% (446)	p=0.005
	CT	21.5% (76)	16.2% (87)	
	TT	2.5% (9)	0.6% (3)	
összevont genotípus	CC	76.0% (269)	83.2% (446)	p=0.008
	CT + TT	24.0% (85)	16.8% (90)	
allélok	C allél	86.7% (614)	91.3% (979)	p=0.002
	T allél	13.3% (94)	8.7% (93)	

7. táblázat. A HIF-1 α allél és genotípus megoszlása a kontroll és a cukorbeteg populáció összehasonlításánál. Forrás: saját közlemény [192].

	Kontroll (K)	1TDM	2TDM	1TDM vs. K	2TDM vs. K
CC	76.0% (269)	84.9% (141)	82.4% (305)	p=0.044	p=0.023
CT	21.5% (76)	14.5% (24)	17.0% (63)		
TT	2.5% (9)	0.6% (1)	0.6% (2)		
CC	76.0% (269)	84.9% (141)	82.4% (305)	p=0.020	p=0.032
CT + TT	24.0% (85)	15.1% (25)	17.6% (65)		
C allél	86.7% (614)	92.2% (306)	90.9% (673)	p=0.010	p=0.011
T allél	13.3% (94)	7.8% (26)	9.1% (67)		

8. táblázat. A HIF-1 α allél és genotípus megoszlása a kontroll, az 1-es típusú (1TDM) és a 2-es típusú (2TDM) csoportokban Forrás: saját közlemény [192]

Hasonló eredményt kaptunk abban az esetben is, ha a betegcsoportot felosztottuk 1-es (1TDM) és 2-es típusú (2TDM) cukorbeteg csoportjára (8. táblázat). A T allél viszonylag ritka, különösen a beteg csoportokban (8,7%), a TT homozigóták nem érik el a Pearson χ^2 tesztben a validitásküszöböt.

Ezért érdemesnek látszott a genotípus kategóriákat összevonni egy T allélt nem hordozó (CC) és egy T allélt hordozó (CT és TT) csoportra. Amint ez a 8. táblázatban látható, az 1TDM és a 2TDM csoportok egymástól nem különböztek jelentősen a genotípusok eloszlása szempontjából. Így mindkét beteg csoportban külön-külön is ki tudtuk mutatni a T allél jelenlétének statisztikailag szignifikáns hatását: a T allél jelenléte védő hatásúnak bizonyult mind az 1-es, mind pedig a 2-es típusú diabetes előfordulásával szemben.

6.2. A DIABETESSZEL KOMORBID DEPRESSZIÓ GENETIKAI TÉNYEZŐI

6.2.1. A VIZSGÁLT BETEGCSOPORT JELLEMZŐI

	Teljes minta	KA	RA	
	100% (N = 218)	100% (N = 81)	100% (N = 137)	KA vs. RA
férfi	48.2% (105)	48.1% (39)	48.2% (66)	$\chi^2(1) < 0.001, p > 0.99$
nő	51.8% (113)	51.9% (42)	51.8% (71)	
kor	58.00 ± 13.63	58.63 ± 15.37	57.63 ± 12.53	$t(1,216) = 0.52, p = 0.60$
BMI	29.56 ± 5.67	28.91 ± 5.44	29.90 ± 5.79	$t(1,180) = -1.11, p = 0.27$
HbA1c	8.01 ± 1.85	6.32 ± 0.50	9.01 ± 1.62	$t(1,176) = -18, p < 0.001$
1TDM	10.1% (22)	11.1% (9)	9.5% (13)	$\chi^2(1) = 0.15, p = 0.70$
2TDM	89.9% (196)	88.9% (72)	90.5% (124)	

9. táblázat. A betegcsoport demográfiai és klinikai jellemzői [195]

BMI: testtömegindex, KA: kielégítő szénhidrát-anyagcseréjű csoport, RA: rossz szénhidrát-anyagcseréjű csoport, HbA1c: hemoglobin A_{1c} értéke, 1TDM: 1-es típusú diabetes, 2TDM: 2-es típusú diabetes.

A statisztikai elemzés diszkrét változók esetén χ^2 próba alapján, folyamatos változók esetében t-próbával történt. A kielégítő (KA) és a rossz szénhidrát-anyagcseréjű csoportok (RA) a felsorolt jellemzőkben nem különböztek, kivéve a HbA1c értékeit, ami természetes, hiszen ennek alapján történt a besorolás.

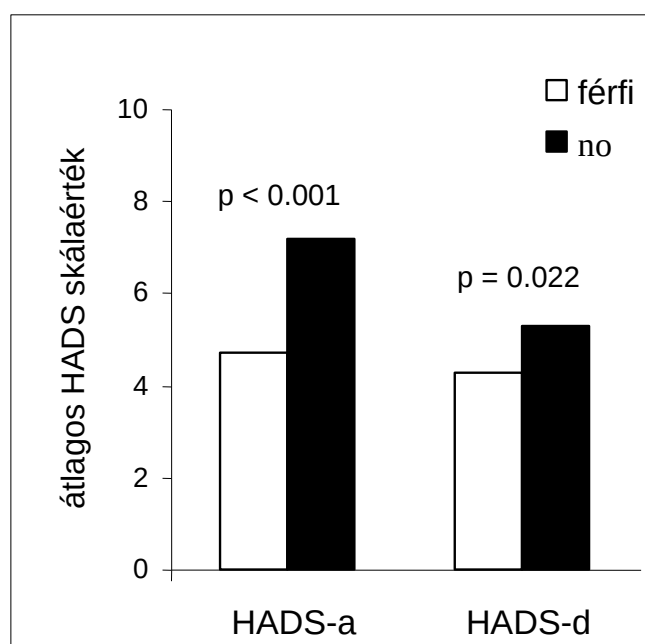
Forrás: saját közlemény [195]

A depresszióval társult 2-es típusú cukorbetegség genetikai rizikófaktorait tanulmányozó vizsgálatához 236 kaukázusi rasszba tartozó 2-es típusú cukorbetegét vontunk be. A 236 betegből 24-nek az anamnézisében szerepelt depresszió (a betegek 10.2%-a), közülük 18 beteg a vizsgálat időpontjában is antidepresszánt szedett - ezeket a betegeket kizártuk a további vizsgálatunkból. Így 218 cukorbeteg hangulati jellemzőit vettük fel egy nemzetközileg elfogadott kérdőív, a HADS felhasználásával [195].

A betegek demográfiai és klinikai jellemzőit, továbbá a testtömegindexet (BMI) és a tartós vércukorszintre jellemző hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) értékeit a 9. táblázat tartalmazza. A vizsgálatban nagyjából 2-es típusú cukorbetegségben szenvedők vettek részt (89.9%). A betegeket HbA_{1c} értékük alapján egy fiziológiás (HbA_{1c} szint ≤ 7%) és egy patológiás szénhidrát-anyagcseréjű (HbA_{1c} szint >7%) csoportra osztottunk, így kaptunk egy kielégítő

szénhidrát-anyagcseréjű csoportot (KA, n=81) és egy rossz szénhidrát-anyagcseréjű csoportot (RA, n=137).

A nem és az életkor hatását vizsgálva a szorongásos és depressziós tünetekre a következő eredményeket kaptuk: a kor tendenciózan korrelál a kérdőív skálaértékeivel (HADS-szorongás: $r = -0,129$, $p = 0,058$; HADS-depresszió: $r = 0,127$, $p = 0,061$). A nem hatása azonban szignifikánsnak mutatkozott (HADS-szorongás: férfi = $4,72 \pm 3,34$, nő = $7,20 \pm 3,92$, $t(1,216) = -5,13$, $p < 0,001$; HADS-depresszió: férfi = $4,29 \pm 3,34$, nő = $5,31 \pm 3,59$, $t(1,216) = -2,31$, $p = 0,022$), azaz a nők bevallott átlagos szorongás értékei jóval meghaladták a férfiakét. Hasonló eltérés mutatkozott az átlagos depressziószintben is (10. ábra). Mivel a nemi különbségek szignifikáns hatásúnak bizonyultak, a továbbiakban analízisünk során a nemet, mint kovariánst vettük figyelembe. A kétféle HADS skála értékei egymással is korrelációt mutattak ($r = 0,589$, $p < 0,001$).



10. ábra. Nemi hatás a HADS kérdőíves eredmények értékeiben

HADS-a= HADS skála szorongás pontszám, HADS-d= HADS skála depressziós pontszám
Forrás: saját közlemény alapján rajzolva [195]

6.2.2. HANGULATI JELLEMZŐK AZ ELTÉRŐ ANYAGCSERÉJŰ BETEGCSOPORTOKBAN

A következőkben megvizsgáltuk, hogy az anyagcsere-állapot önmagában (genetikai faktorok nélkül) hatással van-e a HADS kérdőívvel mérhető szorongás (HADS-a) és depresszió (HADS-d) mértékére (lásd 10. táblázat).

	Teljes minta 100% (N = 218)	KA 100% (N = 81)	RA 100% (N = 137)	KA vs. RA
HADS-a	6.01 ± 3.85	5.58 ± 3.55	6.26 ± 4.01	$t(1,216) = -1.26, p = 0.21$
HADS-d	4.82 ± 3.50	4.58 ± 3.43	4.96 ± 3.55	$t(1,216) = -0.77, p = 0.45$

10. táblázat. A kielégítő (KA) és a rossz anyagcseréjű (RA) cukorbetegsgek hangulati jellemzőinek összehasonlítása *Forrás: saját közlemény alapján szerkesztve [195]*

Eredményeink azt mutatják, hogy a szorongás (HADS-a) és a depresszió (HADS-d) jelzőszámai nem különböznek a kétféle betegcsoportban.

6.2.3. A GENETIKAI POLIMORFIZMUSOK HATÁSA A HANGULATI JELLEMZŐKRE

Megvizsgáltuk néhány, a szakirodalom alapján feltételezhetően depresszióra hajlamosító génvariáns (5-HTTLPR, TPH2, BDNF és P2RX7) esetleges összefüggését a cukorbetegsgek körében mérhető depresszió (HADS-d) és szorongás (HADS-a) skála értékeivel. A statisztikai kiértékelés során vizsgáltuk a kor, a nem, a HbA1c értékei és a genotípus lehetséges hatását az önkitöltő kérdőívvel mért szorongás (HADS-a) és depresszió (HADS-d) értékeire.

6.2.3.1. A szerotonin-transzporter-gén promóter-polimorfizmusának (5-HTTLPR) vizsgálata

A szerotonin-transzporter leggyakrabban vizsgált polimorfizmusa a promóterben található hosszúságpolimorfizmus (5-HTTLPR), melynek rövid (s) és hosszú (l) formáit különböztetik meg. Az s allél előfordulása viszonylag ritka, ezért az ss homozigóták száma relatíve alacsony (16,5 % a jelen vizsgálatban, lásd 11. táblázat). Eredményeink szerint azok a cukorbetegsgek, akik a szerotonin-transzporter-gén 5-HTTLPR rövid allélját (s) hordozták, magasabb pontszámot értek el mind a HADS-szorongás mind a HADS-depresszió skálán, de ez a különbség statisztikailag nem bizonyult eltérőnek. Az eltérések akkor sem voltak szignifikánsak, ha a Wendland-féle [189] 3 allélos rendszert használtuk (S'S' = SS+SL_G+L_GL_G; S'L' = SL_A + L_AL_G, L'L' = L_AL_A).

A triptofán-hidroxiláz a szerotonin-anyagcsere egyik kulcsenzime, melynek több polimorfizmusa ismert. Ezek közül a jelen vizsgálatban a TPH2 gén promóterének -703 GT SNP-variánsait vizsgáltuk részletesen (lásd 12. táblázat).

Szerotonin transzporter (5-HTTLPR)

Genotípus		HADS-a		HADS-d	
s/s	16.5 % (36)	6.22 ± 4.43		5.17 ± 3.81	
s/l	46.8 % (102)	6.34 ± 3.78		5.20 ± 3.62	
l/l	36.7% (80)	5.49 ± 3.64		4.18 ± 3.14	
MANOVA	df	F	p	F	p
kor	1	5.42	0.02	3	0.09
nem	1	20.1	**	3.53	0.06
HbA_{1C}	1	1.13	0.29	0.23	0.63
genotípus	2	0.41	0.66	0.62	0.54

11. táblázat. Az 5-HTTLPR és a HADS kérdőíves eredmények [195]

A HADS kérdőív szorongás (HADS-a) és depresszió (HADS-d) skálaértékeinek átlagát és szórását tüntettük el az egyes genotípuscsoportokban (s=short=rövid; l=long=hosszú allél). A genetikai hatást a kor, a nem, és a szénhidrát-anyagcsere (HbA_{1C}) szempontjából multivariate analysis of variance (MANOVA)-val határoztuk meg. ***p* < 0,001

Forrás: saját közlemény [195]

6.2.3.2. A triptofán-hidroxiláz 2 (TPH2) gén promóter-polimorfizmusának vizsgálata

Triptofán hidroxiláz 2 (TPH2) promóter (-703) G/T SNP

Genotípus		HADS-a		HADS-d	
G/G	59.6 % (130)	6.26 ± 3.74		4.98 ± 3.51	
G/T	36.2 % (79)	5.41 ± 3.91		4.49 ± 3.43	
T/T	4.1 % (9)	7.56 ± 4.48		5.53 ± 4.24	
MANOVA	df	F	p	F	p
kor	1	6.09	0.01	2.34	0.13
nem	1	24.7	**	4.37	0.04
HbA_{1C}	1	2.17	0.14	1.92	0.17
genotípus	1	4.11	0.04	1.83	0.18

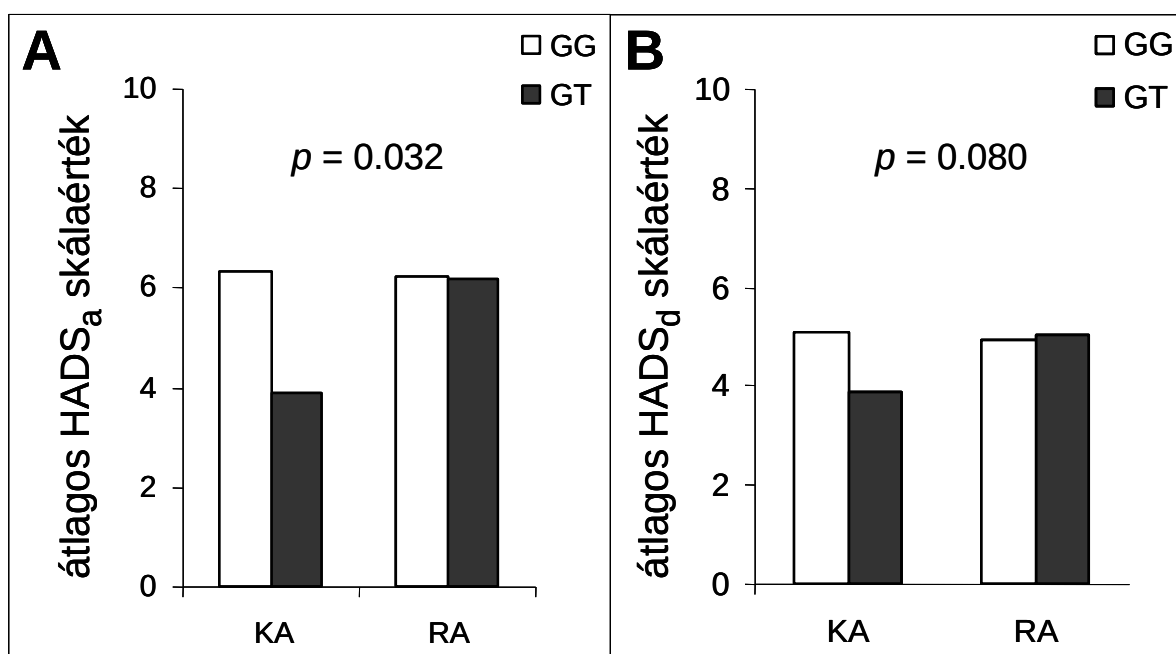
12. táblázat. A TPH2 -703 G/T SNP és a HADS kérdőíves eredmények [195]

A HADS kérdőív szorongás (HADS-a) és depresszió (HADS-d) skálaértékeinek átlagát és szórását tüntettük fel az egyes genotípus csoportok szerint. A genetikai hatást a kor, a nem, és a szénhidrát-anyagcsere (HbA_{1C}) szempontjából Multivariate analysis of variance (MANOVA)-val határoztuk meg. ***p* < 0,001

Forrás: saját közlemény [195]

A bemutatott adatokból jól látható, hogy a T allél ritka, ezért a TT genotípus előfordulása alacsony (<5%). Így a TT genotípust vagy kihagytuk az elemzésből, vagy összevontuk a heterozigóta csoporttal, mindkét esetben hasonló eredményeket kaptunk. Amint az a 12. táblázatban látható, a szorongás skálaértékeinek tekintetében szignifikáns genetikai hatást észleltünk ($F(1,200) = 4,11$, $p = 0,044$, $\eta^2 = 0,02$, erő = 0,52): a G/T heterozigóta csoport szignifikánsan alacsonyabb pontszámot ért el a G/G csoporthoz viszonyítva.

A genetikai variánsok és a szénhidrát-anyagcsereállapot, mint környezeti tényező, együttes hatását vizsgálva szignifikáns gén HbA_{1c} interakciót kaptunk a TPH2 gén vonatkozásában (lásd 11. A. ábra): a T allél jelenléte csökkentette a szorongásos tüneteket a jó szénhidrát-anyagcseréjű csoportban; (KA csoport: G/G $6,31 \pm 3,56$ vs. G/T $3,88 \pm 2,55$, RA csoport: G/G $6,24 \pm 3,88$ vs. G/T $6,15 \pm 4,25$, $F(1,200) = 4,64$, $p = 0,032$, $\eta^2 = 0,023$, erő = 0,57). Ez a hatás a depressziós pontszámokra is kimutatható volt (lásd 11. B. ábra), de csak tendencia szintű szignifikanciával. (KA csoport: G/G $5,06 \pm 3,68$ vs. G/T $3,38 \pm 2,50$, RA csoport: G/G $4,92 \pm 3,42$ vs. G/T $5,04 \pm 3,70$, $F(1,200) = 3,09$, $p = 0,080$, $\eta^2 = 0,015$, erő = 0,42).



11. ábra. A TPH2 és a szénhidrát-anyagcsereállapot kölcsönhatása a hangulati jellemzők vonatkozásában

KA: kielégítő szénhidrát-anyagcseréjű csoport; RA: rossz szénhidrát-anyagcseréjű csoportot.

4.A.: HADS szorongás; 4B: HADS depressziós skála.

Forrás: saját közlemény alapján szerkesztve [195]

6.2.3.3. A BDNF Val66Met (C/T) SNP-polimorfizmus vizsgálata

A BDNF Val66Met polimorfizmusának gyakoriság értékei nem mutattak szignifikáns eltérést sem a betegcsoportok összehasonlításánál, sem pedig a HADS skálaértékek statisztikai analízisének (lásd 13. táblázat). Így a BDNF-polimorfizmussal kapcsolatos vizsgálataink negatív eredménnyel zárultak. A 13. táblázatban látható szignifikáns nemi és korhatás a szakirodalomból jól ismert.

Agyi eredetű neurotrifikus faktor (BDNF) Val66Met (C/T) SNP					
Genotípus		HADS-a		HADS-d	
C/C	67.4% (147)	6.13 ± 3.85		4.59 ± 3.53	
C/T	29.4% (64)	5.83 ± 3.91		5.25 ± 3.40	
T/T	3.2% (7)	5.14 ± 3.72		5.57 ± 3.91	
MANOVA	df	F	p	F	p
kor	1	4.44	0.04	2.23	0.14
nem	1	32.3	**	5.47	0.02
HbA _{1C}	1	0.49	0.48	0.29	0.59
genotípus	1	0.19	0.66	1.7	0.19

13. táblázat A BDNF-gén polimorfizmusa és a HADS kérdőív eredmények [195]

A táblázat felső részében láthatók az átlag HADS szorongás (HADS-a) és depresszió (HADS-d) pontszámok és szórásátlaguk a három genotípuscsoportban. A MANOVA analízis a táblázat alsó részében látható: a kor, a nem, a szénhidrát-anyagcsere (HbA_{1C}) és a genotípus hatása a HADS szorongás és depresszió pontszámokra. ** $p < 0,001$

Forrás: saját közlemény alapján szerkesztve [195]

6.2.3.4. A P2RX7 Gln460Arg-cserét okozó polimorfizmus hatásai

A P2RX7 aminosavcserét okozó polimorfizmusának összefüggését a major, illetve a bipoláris depresszióval nemrég mutatták ki [151, 152]. Ezért érdemes volt megvizsgálni ennek a génnek a hatását is cukorbetegcsoportjában. Eredményeinket a 14. táblázat foglalja össze. Eredményeink azt mutatták, hogy a HADS kérdőív mindkét skáláján az A/G genotípusú csoportnak magasabbak a pontszámok az A/A csoportéhoz képest. Ha az igen ritka G/G homozigóta csoportot kihagyjuk az elemzésből, a következő statisztikai értékeket kapjuk: HADS-szorongás: $F(1,204) = 4,86$, $p = 0,029$, $\eta^2 = 0,023$, erő = 0,59; HADS-depresszió: $F(1,204) = 6,71$, $p = 0,010$, $\eta^2 = 0,032$, erő = 0,73. Emellett egy nem genotípus interakció volt megfigyelhető. A G allélt hordozó férfiakban magasabb depressziós pontszámokat mértünk

(férfi A/A: $3,53 \pm 2,78$ vs. A/G: $6,03 \pm 3,79$, nő A/A: $5,13 \pm 3,47$ vs. A/G: $5,51 \pm 3,89$, $F(1,204) = 3,79$, $p = 0,053$, $\eta^2 = 0,018$, erő = 0,49)

Hasonló eredményeket kaptunk abban az esetben is, ha a ritka GG homozigóta csoportot a heterozigóta csoporttal összevontuk (HADS-szorongás: $F(1,209)=5,16$, $p=0,024$, $\eta^2=0,024$, erő=0,62; HADS-depresszió: $F(1,209)=7,47$, $p=0,007$, $\eta^2=0,034$, erő=0,78). Ez a genetikai hatás a többszörös tesztelés figyelembe vétele után is szignifikáns maradt ($p < 0,012$).

P2RX7 Gln460Arg (A/G) SNP					
genotípus	N	HADS-a		HADS-d	
A/A	66.5% (145)	5.53 ± 3.71		4.31 ± 3.22	
A/G	31.2% (68)	7.00 ± 4.07		5.74 ± 3.83	
G/G	2.3% (5)	6.40 ± 2.61		7.00 ± 4.00	
MANOVA	df	F	p	F	p
kor	1	6.02	0.02	3.06	0.08
nem	1	17.8	**	1.17	0.28
HbA _{1C}	1	0.95	0.33	0.38	0.54
genotípus	1	4.86	0.03	6.71	0.01

14. táblázat A P2RX7 gén Gln460Arg (A/G) hatása a szorongás és a depresszió pontszámokra [195]

A táblázat felső részében láthatók az átlag HADS szorongás (HADS-a) és depresszió (HADS-d) pontszámok és szórásátlaguk a három genotípus csoportban. A MANOVA analízis a táblázat alsó részében látható: a kor, nem, szénhidrátanyagcsere (HbA_{1C}) és a genotípus hatása a HADS szorongás és depresszió pontszámokra. ** $p < 0,001$

Forrás: saját közlemény alapján szerkesztve [195]

7. MEGBESZÉLÉS

7.1. A DIABETESZ ÚJ KANDIDÁNS GÉNJEI

A diabetes genetikai rizikófaktorainak feltérképezése napjainkban zajlik. Az utóbbi időben több genetikai variánsról sikerült egyértelműen bizonyítani, hogy szerepet játszanak a diabetes kialakulásában [196, 197], ugyanakkor a diabétessel kapcsolatba hozott kandidáns gének száma napról napra emelkedik. Jelen munkánkban olyan gének polimorfizmusait vizsgáltuk, melyek eddig még nem merültek fel az irodalomban, vagy csupán más (pl. Japán) populációban vizsgálták a diabetes előfordulása és az allél variánsok közötti lehetséges kapcsolatot. A különböző humán szubpopulációk összehasonlító vizsgálata igen fontos, ugyanis a genetikai polimorfizmusok gyakran eltérő gyakorisággal jelentkeznek az egyes népcsoportokban, ezért előfordulhat, hogy egy adott allél az egyik szubpopulációban rizikófaktoraként szerepel, míg a másokban nem. Az allélfrekvenciák összehasonlító vizsgálata azért is fontos, mert ha egy allél más gyakorisággal fordul elő a humán szubpopulációkban, akkor kevert minta esetében a populáció-stratifikáció miatt ál-asszociáció jöhet létre [198].

Vizsgálatainkban két új gén szerepelt. Az egyik a KCNA3, melynek szerepe a diabetes kialakulásában elméletileg várható volt, de ezt a feltételezést eredményeink nem igazolták. A másik a HIF-1 α gén, melynek diabétesszel való összefüggését a közelmúltban japán populációban írták le, és a bemutatott vizsgálataink ezt az összefüggést kaukázusi populáción is alátámasztották.

7.1.1. KCNA3

A Kv1.3 feszültségfüggő K⁺-csatorna elsősorban az CCR7- (kemokin receptor) effektor memória T-sejtek (T_{EM}) sejtek) aktiválásában játszik szerepet, így immunmodulátor tulajdonságú. 1TDM-re genetikailag hajlamos patkányokban a Kv1.3 csatorna gátlószerei csökkentették a szigetsejtek T-sejt és makrofág infiltrációját, ezáltal a béta-sejtek pusztulása, és a betegség kialakulása is lelassult.

A Kv1.3 csatornát a közelmúltban, inzulin-érzékeny szövetekben (vázizom, zsír, máj, agy) is sikerült kimutatni [199]. A KCNA3 génkiütött egereken (Kv1.3^{-/-}) végzett kísérletek [200] felvetették, hogy az ioncsatornának szerepe lehet az elhízás, illetve az inzulinrezisztencia kialakulásában [201].

A KCNA3 gén egészséges embereken történt vizsgálata [202] során derült fény arra, hogy a gén T-1645C polimorfizmusa összefüggésben áll az inzulinrezisztenciával és a csökkent glükóztoleranciával, melyet a polimorfizmus funkcionális in vitro vizsgálata megerősített. Mivel a promóter régió 1645-ös pozíciójában a T/C allél cseréje befolyásolja a KCNA3 gén átíródását, valószínűnek látszott, hogy ez a polimorfizmus mind az 1TDM, mind a 2TDM kialakulásának genetikai tényezője lehet. A KCNA3 gén kandidáns génként való felvetését több elméleti felvetés is alátámasztotta. Egyrészt valószínűnek látszott, hogy a csatorna működése befolyásolja számos, a 2-es típusú diabetes kialakulásában szerepet játszó rizikófaktor megjelenését, másrészt immunmoduláló hatása révén szerepe van az autoimmun válasz kialakulásában.

A KCNA3 gén jelen munkában vizsgált polimorfizmusáról, a promóter régióban található T-1645C SNP-ről molekuláris elemzések során kimutatták, hogy az SNP egy transzkripciós faktor kötőhelyének megváltozása révén befolyásolja a gén átírását, és ezzel a képződő csatorna mennyiségét [202]. Ez utóbbi pedig összefüggésben állhat az inzulinrezisztencia és a glükóztolerancia kedvezőtlen alakulásával.

Tudomásunk szerint a jelen munkában bemutatott vizsgálat az első a szakirodalomban, mely a KCNA3 T-1645C polimorfizmusának gyakoriságát vizsgálja diabeteses betegek körében. Eredményeink szerint a KCNA3 gén mindkét allélvariánsa gyakori, a kontroll populációban a C allél 42.3%-ban fordul elő, a T allél gyakorisága 57.7 % (lásd 4. táblázat). Az egyes betegcsoportokban nem mutatható ki statisztikailag szignifikáns eltérés a kontrollhoz képest, bár a C allél előfordulása kismértékben csökken a betegekben. A genotípus kategóriák (CC, TT, CT) összehasonlítása azt mutatja, hogy az 1-es típusú cukorbetegben a CC genotípus előfordulása a kontroll gyakoriság (19%) értékének kb. a fele (10%, lásd 5. táblázat)). Ez azt jelentheti, hogy ha egy egyén a KCNA3 gén -1645CC genotípusával rendelkezik, kisebb valószínűséggel fog 1-es típusú diabetesben szenvedni, mint a T alléllal rendelkező társai, azaz a CC homozigóta genotípus védő hatású lehet az 1-es típusú diabetes kialakulásában. A védő hatás magyarázata valószínűleg az lehet, hogy a KCNA3 gén által kódolt Kv1.3 csatorna immunmoduláló hatású. Elképzelhető ugyanis, hogy a gén CC genotípusú variánsa a transzkripciós aktivitás különbség alapján jobban gátolja a hasnyálmirigy béta-sejtjeinek autoimmun pusztulását, mint a T alléllal rendelkező genotípusok. A CC genotípus védő hatásának igazolására azonban még további vizsgálatok szükségesek, mivel a bemutatott adatok statisztikai értelemben tendenciózus eredményeknek felelnek meg csupán, feltehetően a viszonylag kis esetszám miatt. Eredményeink azonban arra utalnak, hogy a KCNA3 gén T-1645C polimorfizmusát érdemes lenne nagyobb létszámú és

más típusú populációkban vizsgálni, mert elképzelhető a CC genotípus védő szerepe az 1-es típusú diabetes mellitus kialakulásában.

7.1.2. HIF-1 α

A hypoxia-indukálta faktor-1 (HIF-1) egy 120 kDa nagyságú α -alegységből és egy 91-94 kDa-os β -alegységből álló, heterodimer formában aktív transzkripciós faktor, mely hypoxiás körülmények között képes aktiválni a glikolízis enzimeinek, és az érújdonképzést aktiváló faktorok célgénjeit, így kulcsszerepet játszik az emlős szervezet hypoxiához történő adaptációjában [203]. A fehérje β -alegysége konstans módon expresszálódik. A fehérje transzkripciós aktivitásáért elsősorban az α -alegység felelős. Az α -alegység prolingazdag régiója oxigéndependens prolin-hidroxilázok hatására hidroxilálódik, majd a von Hippel-Lindau (VHL) fehérjével kapcsolódva normoxiás körülmények között degradálódik [204].

A HIF-1 fehérje α -alegységének génje (HIF-1 α) a 14-es kromoszóma q21-q24-es régiójában helyezkedik el, mely régiót a FUSION teljes genom analízis során mint 2TDM szuszceptibilitási régiót azonosították [205]. A közelmúltban Yamada és munkatársai egy japán populációban vizsgálta a HIF-1 α gén variánsait. A japán munkacsoport 32 SNP-t azonosított a génben, melyek közül az egyik a 12-es exonban található és az 582-es prolin szerinre módosulását okozta (rs11549465). Ez az SNP Yamada és munkatársai asszociációanalízise alapján összefüggést mutatott a 2TDM előfordulásával [181].

7.1.2.1. A HIF1- α gén polimorfizmusa 2TDM-ben

A HIF1- α gén diabetesben játszott szerepének tanulmányozása céljából kaukázusi mintákon végeztünk eset-kontroll analízist, ugyanazt az SNP-t vizsgálva, mellyel a japán csoport szignifikáns asszociációt mutatott ki a diabetes vonatkozásában. Eredményeink alátámasztották a japán adatokat, amennyiben a ritka allélt tartalmazó genotípusok (CT+TT) és a T allél gyakoriságának statisztikailag is szignifikáns csökkenését igazolták diabeteses betegek körében (lásd 7. és 8. táblázat).

Korábban többen kiemelték a genetikai asszociációanalízisek replikációinak fontosságát, hiszen jól ismert, hogy jelentős eltérés lehet a génvariánsok megoszlása tekintetében a különböző populációk között. Vizsgálatunk 2-es típusú cukorbetegekkel foglalkozó részének eredményei egybevágóak Yamada és munkatársainak egy japán populáción végzett megfigyelésével, melyben először hozzák összefüggésbe a HIF-1 α gén 12. exonban található polimorfizmusát cukorbetegséggel [181]. Vizsgálatukban a japán nem

diabeteses populációban 7% míg a diabeteses populációban csupán 4% volt a ritka variáns gyakorisága.. Kontrollcsoportunkban a T allél előfordulási gyakorisága (13,3%) hasonló volt más európai populációkhoz [206] és majdnem kétszer olyan gyakran fordul elő a kaukázusi populációban, mint a Yamada által vizsgált japán populációban. Yamada és munkacsoportja azonban nem vizsgálta ezt a polimorfizmust az 1-es típusú diabetes vonatkozásában, ezért az erre a betegcsoportra vonatkozó eredményeink a szakirodalom szempontjából teljesen újak számítanak.

7.1.2.2. A HIF1- α gén polimorfizmusa 1TDM-ben

Külön kiemelő, hogy sem az allélfrekvenciák, sem pedig a genotípus-megoszlás tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget az 1TDM és a 2TDM csoportok között. Ugyanakkor az 1TDM és a 2TDM csoportok egyaránt statisztikailag szignifikáns különbséget mutatottak a kontrollcsoporthoz képest mind az allélfrekvencia, mind pedig a genotípusok megoszlásának tekintetében. Összességében tehát sikerült kimutatnunk a HIF1- α gén egy ritka variánsának védő hatását mind 1-es mind 2-es típusú diabétesszel szemben, egy kaukázusi populációban.

7.1.2.3. A HIF 582-es polimorfizmusának funkcionális jellege

A vizsgált polimorfizmus az 582. pozíciójú prolin szerinre történő cseréjét okozza a HIF-1 α fehérjében. A fehérjének ez a régiója közel helyezkedik el az oxigéndependens degradációjáért felelős régiójához [207]. Az 582. pozíciójú prolinról nem igazolódott, hogy a HIF-1 α fehérje hidroxilációs pontja lenne, vagy hogy szerepe lenne a VHL-el való kötődésben, továbbá in vitro vizsgálatok sem jelezték, hogy a szerin-prolin csere ebben a pozícióban megváltoztatná a VHL-HIF1- α kötődést [208].

A HIF-1 α gén e polimorfizmusának eddigi funkcionális vizsgálati eredményei ellentmondásosak. Először Yamada és munkatársai [181] mutatták ki riporter rendszerben a ritka variáns konzisztensen magasabb transzaktiváló hatását a vad típushoz képest. Tekintettel arra, hogy a mutáns variáns megnövekedett transzaktivációs kapacitása csak hypoxiás körülmények között volt kimutatható, a szerzők annak lehetőségét vetették fel, hogy a genetikai variáns úgy fejtheti ki védő hatását cukorbetegséggel szemben, hogy az egyedfejlődés során nagyobb mértékben aktiválja a hasnyálmirigy kialakulásáért felelős célgéneket, és ezáltal, egy potensebb működésre képes hasnyálmirigy fejlődik ki.

Hlatki és mtsai. nem tudták reprodukálni Yamada eredményeit [206]. Munkánk során egy luciferáz-riporterrendszer segítségével kutatócsoportunk is kísérletet tett arra, hogy

igazolja ezen HIF-1 α variáns funkcionális jelentőségét, de nem találtunk szignifikáns különbséget a HIF-1 α variánsok transzkripció aktivitásában [192]. Egy lehetséges oka ezen ellentmondásos eredményeknek az lehet, hogy a munkacsoportunk által vizsgált sejtvonalban relatíve magas volt a HIF-1 α endogén alapaktivitása.

Tekintettel arra, hogy kísérleteik során nem tudták igazolni, hogy a HIF1- α -ban bekövetkező aminosavcsere következtében létrejövő konformációs változás a HIF-1 α szerkezetében megváltoztatná a protein stabilitását, Tanimoto és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy a megváltozott fehérjeszerkezet a transzkripció kofaktorok kötődését fokozhatja. További, elsősorban az onkológia területén végzett kísérleteknek ugyanakkor a korábbiakkal ellentétben sikerült igazolnia az rs11549465 variáns fokozott transzkripció aktivitását mind normoxiás, mind pedig hypoxiás körülmények között in vitro [209, 210]. Azt is kimutatták, hogy a ritka variáns gyakoribb előfordulása összefüggnek a megnövekedett tumor-kisérdenzitással fej, nyak és prosztatárakos betegekben.

A HIF-1 fehérje funkcióját tekintve kulcsszerepet játszik a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF) expressziójában és szekréciójában[211-213]. Az is ismert, hogy a VEGF adása növeli a hasnyálmirigy szigetsejtjeinek túlélését szigetsejt-transzplantációt követően azáltal, hogy hatására stimulálódik az érújdonképződés, és javul a szigetsejt érellátása [214, 215]. Ezen felül azt is tudjuk, hogy a VEGF-et túltermelő transzgenikus egerek egyik jellemzője, hogy hasnyálmirigyükben szigetsejt-hyperplasia figyelhető meg, ami arra enged következtetni, hogy a VEGF befolyással lehet az endokrin pancreas embrionális kialakulására [216]. A közelmúltban publikált eredmények arra engednek következtetni, hogy a VEGF szigetsejt túlélést fokozó hatásából adódóan csökkentheti az 1TDM kialakulásának esélyét illetve elodázhathatja a betegség manifesztációját [217].

7.1.3. AZ 1-ES ÉS A 2-ES TÍPUSÚ DIABETES KÖZÖS GENETIKAI RIZIKÓFAKTORAI

Ahogy az már a korábbi fejezetekben bemutatásra került, mindkét diabetes forma megalapozott, széleskörűen tanulmányozott genetikai meghatározottsággal bír. Jól ismert, hogy mind az 1-es, mind pedig a 2-es típusú diabetes a szervezet igényeihez képest elégtelen inzulin elválasztás következménye, továbbá a két betegség késői komplikációi is hasonlóak. Ennek ellenére a mai tudásunk szerint kóroktanuk háttere meglehetősen különböző, ezért esetleges közös genetikai hátterük vizsgálata sokáig fel sem merült.

A közelmúltban több olyan elmélet is napvilágot látott, melyek a sokszor átfedő, és a nem egyértelmű klinikumból, valamint a diabetes kapcsán kialakuló béta-sejtes diszfunkció okából indul ki. Ezek a vizsgálatok feltételezik az 1TDM és a 2TDM kóroktanában a közös, átfedő elemeket. Talán a legismertebb a Wilkin és munkatársai által megfogalmazott „accelerator hipotézis” [218], mely szerint a két – mesterségesen kialakított – diabetesforma közös háttere a béta-sejt betegsége. A különbség csupán annyi, hogy az 1TDM-ben fennáll a folyamatot felgyorsító autoimmun tényező is. Wilkins és munkatársai hipotézisét látszanak alátámasztani azon családvizsgálatok is, melyek az 1TDM gyakoribb előfordulását mutatatták ki 2TDM-re pozitív családokban [219-221].

Ezen túlmenően ma több olyan asszociáció-analízist is ismerünk, melyek az előzetesen 2TDM-e hajlamosító genetikai rizikófaktorok hatását igazolják 1TDM-ben. Az első ilyen vizsgálat Johansen és munkatársai nevéhez fűződik, akik a korábban igazoltan 2TDM-re hajlamosító PPAR γ 2 Pro12Ala polimorfizmus hatását mutatatták ki 1TDM-ben [222, 223]. Az 1TDM és a 2TDM közös genetikai rizikófaktoraként azonosították a közelmúltban az endothelialis nitrogén oxid szintáz (eNOS) intron polimorfizmusát is [222].

Jelen vizsgálatainkban új eredménynek tekinthető az, hogy a vizsgált HIF1- α polimorfizmus minor alléljának védő hatását mind az 1-es, mind pedig a 2-es típusú diabetesben kimutattuk. Ez az eredmény nemcsak egy újabb példája az 1TDM és a 2TDM közös genetikai rizikófaktorának, de elméletileg is fontos lehet a hypoxia-indukálta faktor diabetesben betöltött szerepének megértésében. Szakirodalmi ismereteink és saját eredményeink alapján felvethető az a hipotézis, hogy a ritka génvariáns elsősorban a hasnyálmirigy kialakulása során fennálló hipoxiás körülmények között fejti ki védő hatását célgénjeinek kifejezettebb aktiválása révén.

7.2. A DIABETES ÉS A DEPRESSZIÓRA VALÓ HAJLAM KÖLCSÖNHATÁSA

Kiterjedt epidemiológiai vizsgálatok támasztják alá a depresszió fokozott előfordulását, és szűrésének létjogosultságát diabeteses betegek körében [4]. Ugyanakkor a két népbetegség komorbiditásának egyértelmű oka napjainkban még tisztázatlan.

Vizsgálataink során a Hospital Anxiety and Depression Scale-t (HADS) használtuk 2TDM betegek szorongásos és depressziós tüneteinek mérésére. A HADS önkitöltős kérdőívet az elmúlt időben sikerrel alkalmazták asszociációs vizsgálatokban [224]. Hét iteme a szorongás, hét pedig a depresszió tüneteire kérdez rá. A kérdések elsősorban a hangulati zavarok általános tüneteire vonatkoznak anélkül, hogy testi tüneteket (pl. étvágy, alvás zavarok) érintenék, melyeknek más klinikai magyarázata is lehetne. A HADS kérdőív egy megbízható és praktikus eszköz mind a klinikus, mind a kutató kezében, mely alkalmas arra, hogy segítségével mérni tudjuk a két leggyakrabban előforduló lelki rendellenesség súlyosságát [184]. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a kornak és a nemnek a HADS pontszámokra szignifikáns hatása van [225]. Vizsgálatunkban munkacsoportunk ugyancsak erős nemi hatást mutatott ki mind a szorongás mind a depresszió átlagos skálaértékében ($p < 0,001$, és $p = 0,022$), ugyanakkor a kor csak tendencia szinten befolyásolta ezeket az értékeket ($p = 0,058$, $p = 0,061$).

Munkánk során egyrészt megvizsgáltuk négy, irodalmi adatok alapján depresszióra hajlamosító kandidáns genetikai rizikófaktor hatását cukorbetegünk depresszív tüneteire. Másrészt, Lustman és munkatársai mérföldkőnek számító, a glikémiás kontrol és a depressziós tünetek összefüggéseivel foglalkozó munkáját alapul véve [156], célunk volt megvizsgálni, hogy cukorbetegünk „belső környezete” azaz szénhidrátanyagcsere-állapota befolyásolja-e ezen polimorfizmusok hatását.

7.2.1. NEM SZEROTONERG KANDIDÁNS GÉNEK VIZSGÁLATA

7.2.1.1. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met SNP-je

A BDNF egy a neurotrofinok családjába tartozó protein, mely kulcsszerepet játszik a központi idegrendszer neuronjainak differenciálódásában, növekedésében, és a különböző stresszhatásokra bekövetkező, a sejt túlélését elősegítő reakciókban [226, 227]. A közelmúltban több vizsgálat is megerősítette, hogy a BDNF-nek szerepe lehet a depresszió patogenezisében [228], így a BDNF gént a depresszió egy megalapozott kandidáns génjének tekintik. A gén leggyakrabban vizsgált polimorfizmusa a fehérje 66-os pozíciójában aminosavcserét (Val66Met) okozó SNP (rs6265), mely összefüggést mutatott egészséges emberek depresszív személyiségjegyeivel [229]. Így indokoltnak tűnt megvizsgálni, hogy kimutatható-e ez a genetikai hatás diabeteses betegek hangulati rendellenességeinek vonatkozásában. A vizsgált populációban nem találtunk szignifikáns eltérést a genotípuscsoportok HADS pontszámaiban, továbbá a jól ismert nemi hatáson kívül egyéb környezeti hatást sem tudtunk kimutatni statisztikai analízisünk során. Így a BDNF-polimorfizmussal kapcsolatos vizsgálataink negatív eredménnyel zárultak.

7.2.1.2. P2RX7 Gln460Arg SNP-ie

A P2RX7 a purinerg receptorral rendelkező kation csatornák családjába tartozik, melyek az extracelluláris ATP mediálta gyors jelátvitelben játszanak szerepet a központi idegrendszerben. Eredetileg a receptort hemopoetikus eredetű sejtek, úgy, mint mikroglia és limfociták felszínén azonosították. Fő szerepük a kationbeáramlás hatására létrejövő gyulladásos citokinválasztás révén a gyulladásos folyamatok központi idegrendszeri válasz kialakulásában van [153].

Jól ismert, hogy a gyulladásos folyamat citokinjei részt vesznek a betegségtudat részeként jelentkező lehangoltság, gyengeség kialakulásában. Ezen megfigyelések szolgálnak alapjául a depresszió citokinelméletének is, melyek a központi idegrendszerben megnövekedett mennyiségű gyulladásos citokineket teszik felelőssé a depresszió kialakulásáért [230]. A P2RX7 receptor megváltozott működése tehát feltételezhetően befolyással lehet a központi idegrendszeri citokinválasz kialakulásában, ezáltal hatással lehet a depressziós tünetek kialakulására [231]. Állatkísérletek során a P2RX7 génkiütött egerek viselkedésprofilja arra utalt, hogy ezek az állatok kevésbé hajlamosak a depresszióra és a szorongásra, valamint kisebb dózisu antidepresszánsra is jól reagáltak vad társaikhoz képest [232].

Az általunk vizsgált polimorfizmus (Gln460Arg: A/G SNP) a receptor C-terminális doménjében okoz konformációváltozást, mely létfontosságú a csatorna megfelelő működése szempontjából. A génpolimorfizmusok funkcionális hatásának tisztázása céljából elvégzett in vitro vizsgálatok során stimulált limfociták segítségével Denlinger és munkatársai igazolták, hogy a P2RX7 gén egy másik polimorfizmusa, mely az általunk vizsgált SNP-hez hasonlóan a receptor C-terminális régióját módosítja, csökkent TNF- α szekrécióval jár együtt [233]. Ugyanez a munkacsoport egy évvel később humán monocitákban igazolta a 460. pozícióban arginit hordozó variáns megnövekedett pórusaktivitását [234], mely alapján felmerül, hogy az általunk vizsgált polimorfizmus G allélje is előidézheti a csatorna fokozott működését a központi idegrendszerben.

A vizsgálatunkban szereplő P2RX7 génpolimorfizmus hangulatzavarokkal való összefüggését korábban három független vizsgálat is megerősítette. Először Barden és munkatársai a G allél halmozott előfordulását mutatták ki bipoláris zavarban szenvedő betegek körében [235], majd a közelmúltban ezt az asszociációt egy 3500 fő feletti esetszámú eset-kontroll vizsgálat is alátámasztotta [236]. Ezzel párhuzamosan Lucae és munkatársai eset-kontroll vizsgálatuk során a major depresszió és a G allél előfordulása között tudtak összefüggést kimutatni.

Munkánk során egy diabeteses betegekből álló populációban mutattuk ki a G-allél és a depressziós tünetek közti összefüggést. Azon diabeteses betegek, akik homo- vagy heterozigóta formában hordozták a G allélt, szignifikánsan magasabb HADS pontszámokat értek el, azaz kifejezettebb depressziós tüneteket jeleztek a homozigóta A genotípusú betegekhez képest. Héjjas és munkatársai hozzánk hasonlóan kimutatták a polimorfizmus hatását depressziós és bipoláris zavarban szenvedő betegekben is [237].

Habár a P2RX7 receptor pontos szerepe a depresszió kialakulásában még tisztázásra vár, vizsgálatunk alátámasztja, hogy a gén vizsgált polimorfizmusa feltehetően a glutamáterg neurotranszmisszió befolyásolása révén hatva potenciális kandidáns génje a depressziónak.

7.2.2. A SZEROTONERG RENDSZER POLIMORFIZMUSAI

A depresszió monoamin-elmélete szerint a depresszió patofiziológiájában kulcsszerepet játszik a központi idegrendszeri szerotonin-metabolizmus zavara [238, 239]. Nem meglepő tehát, hogy a depresszióval foglalkozó molekuláris genetikai vizsgálatok azon fehérjék génjeire fókuszálnak elsősorban, melyek részt vesznek a szerotonin szintézisében, a

szerootonin jelpályában, illetve a molekula lebontásában. Munkánk során hasonló megfontolásból két szerotonerg gén, a szerotonin-transzporter és a TPH2 variánsainak lehetséges hatását vizsgáltuk diabeteses betegeink depressziós és szorongásos tüneteknek vonatkozásában.

7.2.2.1. A szerotonin-transzporter gén 5-HTTLPR polimorfizmusa

A klinikumban leggyakrabban sikerrel alkalmazott antidepresszáns gyógyszerek (az SSRI-k) célpontja a szerotonin-transzporter fehérje, mely kulcsszerepet játszik a szerotonin preszinaptikus visszavételében, ezáltal meghatározó szerepe van a szinaptikus rés szerotonin-koncentrációjának szabályozásában. Az 5-HTTLPR a szerotonin-transzporter gén leggyakrabban vizsgált polimorfizmusa, mely a gén promóter régiójában helyezkedik el. A polimorf régió egy 44 bázispár hosszú inzerció/deléción áll, így megkülönböztetjük a gén egy rövid és egy hosszú variánsát. 1996-ban Lesh és munkatársai in vitro vizsgálataik során igazolták, hogy különbség van a két génvariáns működésében. Vizsgálataik alapján a rövid allél a gén csökkent transzkripciós aktivitását okozza [121]. Az 5HTTLPR rövid alléljával foglalkozó tanulmányok sokszor adtak ellentmondásos eredményeket, de e munkák összesítése során létrejött metaanalízisek a polimorfizmus gyenge, de egyértelmű asszociációját jelezték affektív zavarokkal és depresszióra hajlamosító személyiségjegyekkel [240, 241].

Eredményeink szerint azok a cukorbeteg, akik a szerotonin-transzporter gén 5-HTTLPR rövid allélját hordozták, magasabb pontszámot értek el mind a HADS-szorongás mind a HADS-depresszió skálán, de ez a különbség statisztikailag nem bizonyult eltérőnek.

A 5HTTLPR-el kapcsolatos asszociációanalízisek sok esetben vezettek ellentmondásos eredményre [242-244]. Elképzelhető, hogy a jelen vizsgálatunkban részvevő, krónikus betegségben szenvedő cukorbeteg affektív tüneteit egyéb, általunk nem vizsgált környezeti tényezők is befolyásolták, ami ahhoz vezetett, hogy a viszonylag kis genetikai hatást nem tudtuk kimutatni.

7.2.2.2. A triptofán-hidroxiláz 2 (TPH2) -703G/T SNP-je

A TPH2 enzim a szerotonin központi idegrendszeri szintéziséért felelős, megfelelő működése kulcsfontosságú a prefrontális kéreg és a hippocampus szerotonintermelésében (Walther et al.,

2003). A TPH2 gén promóterrégiójában a -703-as pozícióban található egy G/T SNP (rs4570625), melynek funkcionális hatására Lin és munkatársai hívták fel először a figyelmet. Munkájuk során a promóterrégióban elhelyezkedő két SNP (-703 G/T, és a -473 A/T) génátírássra kifejtett hatását elemezték. In vitro vizsgálataik során bemutatták, hogy a GA haplotípus szignifikánsan csökkenti a promóter aktivitását [142] mind a három, T allélt tartalmazó haplotípusokhoz képest. Chen és munkatársai a TPH2 gén promóterrégiójának három variánsát (-703 G/T, -473 A/T és a 90 A/G) vizsgálták. Munkájuk révén megerősítést nyert a -703-as variáns funkcionális jelentősége a promóter aktivációjában [143]. E két egybehangzó vizsgálati eredménnyel szemben egy harmadik vizsgálat negatív eredménnyel zárult [144], így a TPH2 gén promóter-polimorfizmusainak funkcionális hatása még nem teljesen tisztázott.

Vizsgálatunk során a TPH2 gén -703 G/T polimorfizmusának lehetséges hatását vizsgáltuk a HADS kérdőívvel mért szorongásos és depressziós tünetekre diabeteses betegekben.

Eredményeink szerint a magyar kaukázusi populáció, allélfrekvencia és a genotípusok tekintetében hasonló megoszlást mutat, mint a más, európai és ázsiai populációk [245-247]: a ritka T allélt homozigóta formában a résztvevők csupán 4,1%-a hordozta. Ezért a korábbi vizsgálokhoz hasonlóan a polimorfizmus hatásának elemzéséhez létrehoztunk egy T allélt hordozó, összevont genotípus kategóriát (TT+GT) és egy T allélt nem tartalmazó GG homozigóta csoportot. Elemzésünk során szignifikáns asszociációt találtunk a TPH2 gén variánsai és a diabeteses betegek szorongásos és depressziós tünetei között. A G/G homozigóta betegek szignifikánsan magasabb HADS pontszámokat értek el, mint a G/T heterozigóták, vagy az összevont G/T+T/T csoport [195].

Humán vizsgálatokban a -703-as pozíciójú G allél hordozását összefüggésbe hozták számos pszichiátriai zavarral, mint például a depresszióra hajlamosító személyiségjegyekkel [145], depressziós betegek fokozott öngyilkossági hajlamával [248] és pánikbetegséggel [249]. Ezen kívül funkcionális agyi képalkotó vizsgálatok csökkent amygdala aktivitást írtak le GG homozigóta egyéneken, amely alátámasztja a T allél funkcionális szerepét is in vivo körülmények között [146, 250]. Megfigyelésünk megerősíteni látszik a TPH2 génvariánsok szerepét a depresszió kialakulásában.

Több állatkísérlet és egy 1TDM-ben szenvedő betegeken végzett vizsgálat is igazolja, hogy a nem megfelelő szénhidrát-anyagcsere csökkent központi idegrendszeri 5-HT koncentrációval jár, mely részben a TPH2 hosszantartó csökkent működésével magyarázható [171, 173, 174]. Ezek alapján elképzelhető, hogy cukorbetegünkben a nem megfelelő

szénhidrát-anyagcsere, mint egy belső környezeti rizikófaktor a TPH2 gén aktivitásának csökkentése révén szorongásra és depresszióra hajlamosíthatja azon cukorbetegünket, akik arra genetikailag hajlamosak, azaz akik a TPH2 -703 polimorfizmus G allélját hordozzák. Ezt az elképzelést látszanak megerősíteni Lustman és munkatársainak megfigyelései is, akik összefüggést találtak diabeteses betegek magas vércukorértékei [251] és a kifejezettebb depressziós tüneteik között [156].

Munkánk során mi is megvizsgáltuk, hogy kimutatható-e egy „gén környezet” kölcsönhatás a TPH2 gén -703-as polimorfizmusa és a betegek anyagcsereállapota között. Szignifikáns gén HbA_{1C} interakciót kaptunk a TPH2 gén -703-as polimorfizmusa vonatkozásában. A T allél jelenléte csökkentette a szorongásos tüneteket a jó szénhidrát anyagcseréjű csoportban; ez a hatás a depressziós pontszámokra is kimutatható volt tendencia jelleggel.

Caspi és munkatársai voltak az elsők, akik bemutatták, hogy egy genetikai rizikófaktor hatása kifejezettebben érvényesül, ha a rizikót hordozó személyek egyúttal környezeti rizikótényezők is ki vannak téve (Caspi et al., 2003). Tanulmányukban a korai stresszes életesemények, mint környezeti tényező és az 5HTTLPR-polimorfizmus, mint depresszióra hajlamosító genetikai rizikófaktor interakcióját vizsgálták. Bemutatták, hogy azon betegek, akik fiatalon átestek valamilyen megterhelő eseményen és a depresszió szempontjából a rizikó allélt hordozzák, kifejezettebb depressziós tüneteket produkálnak, mint a polimorfizmust nem hordozó társaik. Jelen munkában bemutatott eredményeink hasonló jellegű gén környezet interakcióra utalnak. Megfigyeltük, hogy a depresszió szempontjából feltehetően védő hatású TPH2 -703 T allél csak azon cukorbetegünkben tudta védő hatását kifejteni, akik szénhidrát-anyagcseréje rendezett volt. Eredményeink azt is felvetik, hogy a cukorbeteg nem megfelelő szénhidrát-anyagcseréje egy belső környezeti rizikófaktor lehet a szorongás és a depresszió kialakulásának, mely a genetikai faktorokkal interakcióban fejti ki a hatását.

8. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A Kv1.3 (KCNA3) gén -1645CT polimorfizmusának gyakorisága nem különbözik egészséges kontroll, 1-es és 2-es típusú cukorbetegekben

2. A HIF1- α gén Pro582Ser C/T polimorfizmusa esetében a CC genotípus szignifikánsan gyakrabban fordul elő kaukázusi 2-es típusú diabetes betegekben az egészséges kaukázusi populációhoz képest. A ritka T allél hordozása védő hatású 2-es típusú cukorbetegség kialakulásával szemben.

3. A HIF1- α gén Pro582Ser C/T polimorfizmusa esetében a CC genotípus szignifikánsan gyakrabban fordul elő a kaukázusi 1-es típusú diabeteses betegekben az egészséges populációhoz képest. A T allél jelenléte ebben az esetben is védő hatású.

4. A P2RX7 gén Gln460Arg A/G polimorfizmusa vonatkozásában, azon diabeteses betegek, akik homo- vagy heterozigóta formában hordozták a G allélt, szignifikánsan több depressziós tünetet jelentő, magasabb HADS pontszámot érnek el a homozigóta A genotípusú cukorbeteghez képest.

5. A BDNF Val66Met C/T polimorfizmusa esetében nincs különbség a különböző genotípus csoportok depresszív pontszámai tekintetében és szignifikáns interakciót sem volt a genetikai hatás és a betegek anyagcsereállapota között.

6. A TPH2 -703 G/T polimorfizmusa esetében a T allél hordozása szignifikánsan alacsonyabb depressziós tüneteket jelző HADS pontszámokkal jár együtt. A genetikai hatás mellett szignifikáns interakció van a polimorfizmus és a betegek anyagcsereállapota között a depresszió mértékének vonatkozásában. A T allél jelenléte csak a jó szénhidrát-anyagcseréjű betegekben csökkenti a HADS hangulati kérdőívvel mért pontértékeket.

7. A szerotonin-transzporter 5HTTLPR hosszúság-polimorfizmusa esetében cukorbetegben nincs különbség a különböző genotípus csoportok depresszív pontszámai tekintetében és szignifikáns interakciót sem volt a genetikai hatás és a betegek anyagcsere állapota között.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

Jelen munkánkban a diabetes mellitus és a komorbid depresszió feltételezett genetikai háttértényezőit vizsgáltuk a két betegség pathomechanizmusának jobb megértése céljából.

A Kv1.3 (KCNA3) gén promóter régiójában elhelyezkedő, a -1645-ös pozíciójú SNP (rs2821557) előfordulásában nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a kontroll és a betegcsoportok között sem az allél, sem a genotípus gyakoriságban.

A HIF-1 fehérje α alegységét kódoló gén (HIF-1 α) 12-es exonjában található, aminosavcserét (Pro582Ser) okozó SNP (rs11549465) eset-kontroll analízise során szignifikáns összefüggést találtunk a CC genotípus és a 2-es típusú diabetes előfordulása között. Ezzel egybehangzóan a ritka T allél védő hatásúnak tűnik a betegség kialakulásával szemben. Ezek az eredmények elsőként erősítik meg az előzetes japán vizsgálatot kaukázusi populációban.

Kimutattuk, hogy a HIF-1 α gén vizsgált polimorfizmusa nemcsak a 2-es, de az 1-es típusú diabetes előfordulásával is szignifikáns asszociációt mutat, a T allél jelenléte itt is védő hatású. Ez az eredmény nemcsak egy újabb példája az 1TDM és a 2TDM közös genetikai rizikófaktorának, de elméletileg is fontos lehet a hypoxia indukált faktor diabetesben betöltött szerepének megértésében. Elképzelhető ugyanis, hogy a ritka génvariáns a hasnyálmirigy kialakulása során fennálló hypoxiás körülmények között fejti ki védő hatását célgénjeinek kifejezettebb aktiválása révén.

Munkánk második fázisában hangulatkérdőívek segítségével kívántuk felmérni a komorbid depresszió előfordulását diabeteses betegcsoportunkban.

A depresszió nem szerotonerg génjeit vizsgálva szignifikáns genetikai hatást kaptunk a P2RX7 vizsgált polimorfizmusa és a HADS kérdőívvel mért depressziós szint között cukorbeteg körében. Ugyanakkor nem kaptunk szignifikáns interakciót a genetikai hatás és a beteg anyagcsere állapota között. A BDNF vonatkozásában nem találtunk sem szignifikáns genetikai hatást, sem interakciót.

A depresszió szerotonerg kandidáns génjei közül a TPH2 esetében a szignifikáns genetikai hatás mellett szignifikáns interakciót kaptunk a mért polimorfizmus és a betegek anyagcsereállapota között a depresszió mértékének vonatkozásában. A T allél jelenléte csak a jó szénhidrát-anyagcseréjű betegekben csökkentette HADS hangulati kérdőívvel mért pontértékeket. A szerotonin-transzporter 5HTTLPR polimorfizmusa esetében nem kaptunk hasonló jellegű változásokat.

10.SUMMARY

In the present study our goal was to analyze potential genetic risk factors of diabetes and co-morbid depression to gain a better understanding of the underlying mechanisms of these conditions.

In the first part of our project we performed genetic case-control association analyses of candidate gene polymorphisms in diabetics and healthy individuals.

There was no difference between the diabetic and healthy individuals in allele frequencies or genotype distribution of the gene variant (rs2821557) in position -1645 of the promoter region of the Kv1.3 gene (KCNA3).

In the case-control analysis of the genetic variant (rs11549465) found in exon 12 of the gene encoding the α subunit of the HIF1 protein, we found significant association between the CC genotype and type 2 diabetes. The T allele seems to be a protective factor against the development of type 2 diabetes. Our results first to confirmed the protective effect of the rare genetic variant of HIF1- α gene against type 2 diabetes in a Caucasian sample.

In our study the same HIF1- α polymorphism has so been shown to be significantly associated not only with type 1 but also with type 2 diabetes. The presence of the T allele also proved to be a protective factor against the onset of type 1 diabetes. These results not only imply a potential common genetic background of type 1 and type 2 diabetes but also point out that understanding the role of HIF-1 α in diabetes is highly relevant. To our current knowledge it is possible that the studied genetic variant of the HIF-1 α by could be a protective factor against both type 1 and type 2 diabetes, enhancing the transcriptional activity of target genes during pancreatic development.

In the second part of the study, self report questionnaires were used to assess depressive symptoms in diabetic patients.

Regarding the non-serotonergic genes, a significant association has been detected between the P2RX7 G-allele and depressive symptoms: those with at least one G-allele had higher depressive scores compared to the AA homozygotes.

The serotonergic TPH2 gene polymorphism was not only shown to be associated with depressive scores in diabetic patients, but also a gene glycemic control interaction has been demonstrated in our study. The T-allele decreased HADS questionnaire scores in patients with good glycemic control. Similar associations were not seen during the evaluation of the 5HTTLPR variants.

11.KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Harmadéves orvostanhallgató koromban **Prof. Dr. Somogyi Anikó** a Semmelweis Egyetem II-es számú Belgyógyászati Klinika Professzor Asszonya kutató diákjául választott. Témavezetőm tíz éve irányítja a tudományos munkámat, segíti lépéseimet a klinikumban és a hétköznapi életben egyaránt. Köszönöm, hogy PhD munkámnak korszerű és érdekes témát választott. Különösen hálás vagyok, hogy kérdéseim mindig fontosak voltak számára, válaszaival formálta tudományos látásmódomat és emberi viselkedésemet. Köszönöm, hogy Ő és a vezetése alatt működő **Anyagcsere Munkacsoport** tanulmányaim során inspiráló környezetet biztosított számomra.

Doktoranduszi kutatómunkát kollaborációban végeztem **Prof. Dr. Sasvári-Székely Mária**, a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézetének professzora és munkacsoportjának aktív közreműködésével. Köszönöm Professzor Asszonynak a sok törődést, tanítást, amelyben részesültem, melynek során nemcsak megértettem, hanem meg is kedveltem témám genetikai vonatkozásait. Munkámmal kapcsolatos hasznos tanácsaival és segítségével a PhD értekezésem nagyon sokat gazdagodott.

Köszönöm **Dr. Nemoda Zsófiának**, **Dr. Kovács-Nagy Rékának** és **Dr. Rónai Zsoltnak**, a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézetének Molekuláris Genetikai Munkacsoportja tagjainak, hogy kiemelkedő hozzáértésükkkel, precizitásukkal és odaadó munkájukkal megalapozták közös munkáink sikerét.

Köszönet illeti **Dr. Veres-Székely Annát**, az ELTE Pedagógiai és Pszichológiai Kar, Pszichológiai Intézetének adjunktusát, akinek a statisztikai elemzésekben nyújtott pótolhatatlan segítségéért vagyok hálás.

A PhD-s éveim alatt **Dr. Varga Tímea**, PhD-társammal osztottuk meg közös dolgozósobánkat. Szeretném megköszönni neki, hogy személye megkönnyítette a mindennapok kihívásait, fel nem sorolható számú javaslataival és tanácsaival segítette munkámat.

Dr. Máthé Attila és **Dr. Szémán Barbara** TDK-s hallgatóim fáradhatatlan munkájukkal hozzájárultak a vizsgálatokban részvevő betegek fenotípusos adatainak rögzítésével és a minták gyűjtésével segítették a munkámat.

Köszönöm **Prof. Dr. Tulassay Zsoltnak** és **Prof. Dr. Rácz Károlynak**, hogy PhD-hallgatói éveim alatt a II-es számú Belgyógyászati Klinika és a Doktori Iskola vezetőiként, klinikai és kutatómunkámat mindvégig támogatták.

12. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

A tézisek alapjául szolgáló közlemények:

Angol nyelvű publikációk:

1. Nagy G, Rónai Z, Somogyi A, Sasvári-Székely M, Rahman AO, Máté A, Varga T, Nemoda Z: P2RX7Gln460Arg polymorphismis associated with depression among diabetic patients. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry. 32 (8), 1884-1888, 2008.
2. Nagy G, Kovács-Nagy R, Keresztúri E, Somogyi A, Székely A, Németh N, Hosszúfalusi N, Pánczél P, Rónai Z, Sasvári-Székely M: Association of hypoxia inducible factor-1 alpha gene polymorphism with both type 1 and type 2 diabetes in a Caucasian (Hungarian) sample. BMC Med Genet. 10(1):79, 2009.

Magyar nyelvű publikációk:

1. Nagy G, Rosta K, Ruzicska É, Somogyi A, Sasvári-Székely M: Újabb eredmények a 2-es típusú diabetes mellitus genetikai tényezőiről. Magyar Belorvosi Archívum. 62: 115-122, 2007.
2. Nagy G, Nagy R, Székely A, Sasvári-Székely M, Somogyi A: A KCNA3 gén T1645C polimorfizmusának vizsgálata diabetesben. Magyar Belorvosi Archívum. 61: 129-133. 2008.

A dolgozat témájához szorosan nem kapcsolódó közlemények:

Angol nyelvű publikációk:

1. Somogyi A, Rosta K, Pusztai P, Tulassay Zs, Nagy G: Antioxidant measurements. Physiological Measurements; 28: R41-R55. 2007.
2. Somogyi A, Ruzicska E, Varga T, Rác K, Nagy G.: Development of silent gastric carcinoid in a type 1 diabetic patient with primer hypothyreosis. Orvosi Hetilap 148(35):1667-71 2007.

Magyar nyelvű publikációk:

1. Somogyi A, Nagy G: Zsírsanyagcsere zavarok, diagnózis és terápia. Medicus Anonymus 6: 29-36 2005.
2. Somogyi A, Herold M, Kocsis I, Nagy G, Somfai G, Studinger P: Az E-vitamin-pótlás hatása fiatal férfiak és nők lipoproteinjének vitamintartalmára. Orvosi Hetilap 35: 1813-1818 2005.
3. Somogyi A, Nagy G, Rosta K, Pusztai P: Inszulinkezelés 2-es típusú diabetes mellitusban Granum 2: 39-42 2006.
4. Somogyi A, Nagy G, Rosta K: Az oxidatív stressz szerepe a diabétesz microvascularis szövődményeinek kialakulásában. Diabetologia Hungarica 3: 27-32 2006.

13. IRODALOMJEGYZÉK

1. Jermendy, G., *A diabetes mellitus kórismézése és gondozása a felnőttkorban. A Magyar Diabetes Társaság módszertani levele (szakmai protokoll)*, 2005: p. 3.
2. Murray, C.J. and A.D. Lopez, *Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study*. Science, 1996. **274**(5288): p. 740-3.
3. Susánszky, É., A. Székely, G. Szabó, Z. Szántó, A. Klinger, B. Konkoly Thege, and M. Kopp, *A Hungarostudy Egészség Panel (HEP) felmérés módszertani leírása. Mentálhigiéné és Pszichoszomatika*, 2007. **8**(4): p. 259-276.
4. Anderson, R.J., K.E. Freedland, R.E. Clouse, and P.J. Lustman, *The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis*. Diabetes care, 2001. **24**(6): p. 1069-78.
5. Lander, E.S., L.M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M.C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczky, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J.P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J.C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R.H. Waterston, R.K. Wilson, L.W. Hillier, J.D. McPherson, M.A. Marra, E.R. Mardis, L.A. Fulton, A.T. Chinwalla, K.H. Pepin, W.R. Gish, S.L. Chisoe, M.C. Wendl, K.D. Delehaunty, T.L. Miner, A. Delehaunty, J.B. Kramer, L.L. Cook, R.S. Fulton, D.L. Johnson, P.J. Minx, S.W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J.F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, R.A. Gibbs, D.M. Muzny, S.E. Scherer, J.B. Bouck, E.J. Sodergren, K.C. Worley, C.M. Rives, J.H.

Gorrell, M.L. Metzker, S.L. Naylor, R.S. Kucherlapati, D.L. Nelson, G.M. Weinstock, Y. Sakaki, A. Fujiyama, M. Hattori, T. Yada, A. Toyoda, T. Itoh, C. Kawagoe, H. Watanabe, Y. Totoki, T. Taylor, J. Weissenbach, R. Heilig, W. Saurin, F. Artiguenave, P. Brottier, T. Bruls, E. Pelletier, C. Robert, P. Wincker, D.R. Smith, L. Doucette-Stamm, M. Rubenfield, K. Weinstock, H.M. Lee, J. Dubois, A. Rosenthal, M. Platzer, G. Nyakatura, S. Taudien, A. Rump, H. Yang, J. Yu, J. Wang, G. Huang, J. Gu, L. Hood, L. Rowen, A. Madan, S. Qin, R.W. Davis, N.A. Federspiel, A.P. Abola, M.J. Proctor, R.M. Myers, J. Schmutz, M. Dickson, J. Grimwood, D.R. Cox, M.V. Olson, R. Kaul, N. Shimizu, K. Kawasaki, S. Minoshima, G.A. Evans, M. Athanasiou, R. Schultz, B.A. Roe, F. Chen, H. Pan, J. Ramser, H. Lehrach, R. Reinhardt, W.R. McCombie, M. de la Bastide, N. Dedhia, H. Blocker, K. Hornischer, G. Nordsiek, R. Agarwala, L. Aravind, J.A. Bailey, A. Bateman, S. Batzoglou, E. Birney, P. Bork, D.G. Brown, C.B. Burge, L. Cerutti, H.C. Chen, D. Church, M. Clamp, R.R. Copley, T. Doerks, S.R. Eddy, E.E. Eichler, T.S. Furey, J. Galagan, J.G. Gilbert, C. Harmon, Y. Hayashizaki, D. Haussler, H. Hermjakob, K. Hokamp, W. Jang, L.S. Johnson, T.A. Jones, S. Kasif, A. Kasprzyk, S. Kennedy, W.J. Kent, P. Kitts, E.V. Koonin, I. Korf, D. Kulp, D. Lancet, T.M. Lowe, A. McLysaght, T. Mikkelsen, J.V. Moran, N. Mulder, V.J. Pollara, C.P. Ponting, G. Schuler, J. Schultz, G. Slater, A.F. Smit, E. Stupka, J. Szustakowski, D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, L. Wagner, J. Wallis, R. Wheeler, A. Williams, Y.I. Wolf, K.H. Wolfe, S.P. Yang, R.F. Yeh, F. Collins, M.S. Guyer, J. Peterson, A. Felsenfeld, K.A. Wetterstrand, A. Patrinos, M.J. Morgan, P. de Jong, J.J. Catanese, K. Osoegawa, H. Shizuya, S. Choi and Y.J. Chen, *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.

6. Venter, J.C., M.D. Adams, E.W. Myers, P.W. Li, R.J. Mural, G.G. Sutton, H.O. Smith, M. Yandell, C.A. Evans, R.A. Holt, J.D. Gocayne, P. Amanatides, R.M. Ballew, D.H. Huson, J.R. Wortman, Q. Zhang, C.D. Kodira, X.H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P.D. Thomas, J. Zhang, G.L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A.G. Clark, J. Nadeau, V.A. McKusick, N. Zinder, A.J. Levine, R.J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A.E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge,

F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T.J. Heiman, M.E. Higgins, R.R. Ji, Z. Ke, K.A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G.V. Merkulov, N. Milshina, H.M. Moore, A.K. Naik, V.A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D.B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, A. Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Zhang, H. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, S. Zhu, S. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, A. Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. An, A. Awe, D. Baldwin, H. Baden, M. Barnstead, I. Barrow, K. Beeson, D. Busam, A. Carver, A. Center, M.L. Cheng, L. Curry, S. Danaher, L. Davenport, R. Desilets, S. Dietz, K. Dodson, L. Doup, S. Ferriera, N. Garg, A. Gluecksmann, B. Hart, J. Haynes, C. Haynes, C. Heiner, S. Hladun, D. Hostin, J. Houck, T. Howland, C. Ibegwam, J. Johnson, F. Kalush, L. Kline, S. Koduru, A. Love, F. Mann, D. May, S. McCawley, T. McIntosh, I. McMullen, M. Moy, L. Moy, B. Murphy, K. Nelson, C. Pfannkoch, E. Pratts, V. Puri, H. Qureshi, M. Reardon, R. Rodriguez, Y.H. Rogers, D. Romblad, B. Ruhfel, R. Scott, C. Sitter, M. Smallwood, E. Stewart, R. Strong, E. Suh, R. Thomas, N.N. Tint, S. Tse, C. Vech, G. Wang, J. Wetter, S. Williams, M. Williams, S. Windsor, E. Winn-Deen, K. Wolfe, J. Zaveri, K. Zaveri, J.F. Abril, R. Guigo, M.J. Campbell, K.V. Sjolander, B. Karlak, A. Kejariwal, H. Mi, B. Lazareva, T. Hatton, A. Narechania, K. Diemer, A. Muruganujan, N. Guo, S. Sato, V. Bafna, S. Istrail, R. Lippert, R. Schwartz, B. Walenz, S. Yooseph, D. Allen, A. Basu, J. Baxendale, L. Blick, M. Caminha, J. Carnes-Stine, P. Caulk, Y.H. Chiang, M. Coyne, C. Dahlke, A. Mays, M. Dombroski, M. Donnelly, D. Ely, S. Esparham, C. Fosler, H. Gire, S. Glanowski, K. Glasser, A. Glodek, M. Gorokhov, K. Graham, B. Gropman, M. Harris, J. Heil, S. Henderson, J. Hoover, D. Jennings, C. Jordan, J. Jordan, J. Kasha, L. Kagan, C. Kraft, A. Levitsky, M. Lewis, X. Liu, J. Lopez, D. Ma, W. Majoros, J. McDaniel, S. Murphy, M. Newman, T. Nguyen, N. Nguyen, M. Nodell, S. Pan, J. Peck, M. Peterson, W. Rowe, R. Sanders, J. Scott, M. Simpson, T. Smith, A. Sprague, T. Stockwell, R. Turner, E. Venter, M. Wang, M. Wen, D. Wu, M. Wu, A. Xia, A. Zandieh and X. Zhu, *The sequence of the human genome*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1304-51.

7. Collins, F.S., M. Morgan, and A. Patrinos, *The Human Genome Project: lessons from large-scale biology*. Science, 2003. **300**(5617): p. 286-90.

8. Wheeler, D.A., M. Srinivasan, M. Egholm, Y. Shen, L. Chen, A. McGuire, W. He, Y.J. Chen, V. Makhijani, G.T. Roth, X. Gomes, K. Tartaro, F. Niazi, C.L. Turcotte, G.P. Irzyk, J.R. Lupski, C. Chinault, X.Z. Song, Y. Liu, Y. Yuan, L. Nazareth, X. Qin, D.M. Muzny, M. Margulies, G.M. Weinstock, R.A. Gibbs, and J.M. Rothberg, *The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing*. Nature, 2008. **452**(7189): p. 872-6.
9. Levy, S., G. Sutton, P.C. Ng, L. Feuk, A.L. Halpern, B.P. Walenz, N. Axelrod, J. Huang, E.F. Kirkness, G. Denisov, Y. Lin, J.R. MacDonald, A.W. Pang, M. Shago, T.B. Stockwell, A. Tsiamouri, V. Bafna, V. Bansal, S.A. Kravitz, D.A. Busam, K.Y. Beeson, T.C. McIntosh, K.A. Remington, J.F. Abril, J. Gill, J. Borman, Y.H. Rogers, M.E. Frazier, S.W. Scherer, R.L. Strausberg, and J.C. Venter, *The diploid genome sequence of an individual human*. PLoS Biol, 2007. **5**(10): p. e254.
10. Wang, J., W. Wang, R. Li, Y. Li, G. Tian, L. Goodman, W. Fan, J. Zhang, J. Li, Y. Guo, B. Feng, H. Li, Y. Lu, X. Fang, H. Liang, Z. Du, D. Li, Y. Zhao, Y. Hu, Z. Yang, H. Zheng, I. Hellmann, M. Inouye, J. Pool, X. Yi, J. Zhao, J. Duan, Y. Zhou, J. Qin, L. Ma, G. Li, G. Zhang, B. Yang, C. Yu, F. Liang, W. Li, S. Li, P. Ni, J. Ruan, Q. Li, H. Zhu, D. Liu, Z. Lu, N. Li, G. Guo, J. Ye, L. Fang, Q. Hao, Q. Chen, Y. Liang, Y. Su, A. San, C. Ping, S. Yang, F. Chen, L. Li, K. Zhou, Y. Ren, L. Yang, Y. Gao, G. Yang, Z. Li, X. Feng, K. Kristiansen, G.K. Wong, R. Nielsen, R. Durbin, L. Bolund, X. Zhang, and H. Yang, *The diploid genome sequence of an Asian individual*. Nature, 2008. **456**(7218): p. 60-5.
11. Bentley, D.R., S. Balasubramanian, H.P. Swerdlow, G.P. Smith, J. Milton, C.G. Brown, K.P. Hall, D.J. Evers, C.L. Barnes, H.R. Bignell, J.M. Boutell, J. Bryant, R.J. Carter, R. Keira Cheetham, A.J. Cox, D.J. Ellis, M.R. Flatbush, N.A. Gormley, S.J. Humphray, L.J. Irving, M.S. Karbelashvili, S.M. Kirk, H. Li, X. Liu, K.S. Maisinger, L.J. Murray, B. Obradovic, T. Ost, M.L. Parkinson, M.R. Pratt, I.M. Rasolonjatovo, M.T. Reed, R. Rigatti, C. Rodighiero, M.T. Ross, A. Sabot, S.V. Sankar, A. Scally, G.P. Schroth, M.E. Smith, V.P. Smith, A. Spiridou, P.E. Torrance, S.S. Tzonev, E.H. Vermaas, K. Walter, X. Wu, L. Zhang, M.D. Alam, C. Anastasi, I.C. Aniebo, D.M. Bailey, I.R. Bancarz, S. Banerjee, S.G. Barbour, P.A. Baybayan, V.A. Benoit, K.F. Benson, C. Bevis, P.J. Black, A. Boodhun, J.S. Brennan, J.A. Bridgham, R.C. Brown,

- A.A. Brown, D.H. Buermann, A.A. Bundu, J.C. Burrows, N.P. Carter, N. Castillo, E.C.M. Chiara, S. Chang, R. Neil Cooley, N.R. Crake, O.O. Dada, K.D. Diakoumakos, B. Dominguez-Fernandez, D.J. Earnshaw, U.C. Egbujor, D.W. Elmore, S.S. Etchin, M.R. Ewan, M. Fedurco, L.J. Fraser, K.V. Fuentes Fajardo, W. Scott Furey, D. George, K.J. Gietzen, C.P. Goddard, G.S. Golda, P.A. Granieri, D.E. Green, D.L. Gustafson, N.F. Hansen, K. Harnish, C.D. Haudenschild, N.I. Heyer, M.M. Hims, J.T. Ho, A.M. Horgan, K. Hoschler, S. Hurwitz, D.V. Ivanov, M.Q. Johnson, T. James, T.A. Huw Jones, G.D. Kang, T.H. Kerelska, A.D. Kersey, I. Khrebtukova, A.P. Kindwall, Z. Kingsbury, P.I. Kokko-Gonzales, A. Kumar, M.A. Laurent, C.T. Lawley, S.E. Lee, X. Lee, A.K. Liao, J.A. Loch, M. Lok, S. Luo, R.M. Mammen, J.W. Martin, P.G. McCauley, P. McNitt, P. Mehta, K.W. Moon, J.W. Mullens, T. Newington, Z. Ning, B. Ling Ng, S.M. Novo, M.J. O'Neill, M.A. Osborne, A. Osnowski, O. Ostadan, L.L. Paraschos, L. Pickering, A.C. Pike, D. Chris Pinkard, D.P. Pliskin, J. Podhasky, V.J. Quijano, C. Raczy, V.H. Rae, S.R. Rawlings, A. Chiva Rodriguez, P.M. Roe, J. Rogers, M.C. Rogert Bacigalupo, N. Romanov, A. Romieu, R.K. Roth, N.J. Rourke, S.T. Ruediger, E. Rusman, R.M. Sanches-Kuiper, M.R. Schenker, J.M. Seoane, R.J. Shaw, M.K. Shiver, S.W. Short, N.L. Sizto, J.P. Sluis, M.A. Smith, J. Ernest Sohna, E.J. Spence, K. Stevens, N. Sutton, L. Szajkowski, C.L. Tregidgo, G. Turcatti, S. Vandevondele, Y. Verhovsky, S.M. Virk, S. Wakelin, G.C. Walcott, J. Wang, G.J. Worsley, J. Yan, L. Yau, M. Zuerlein, J.C. Mullikin, M.E. Hurles, N.J. McCooke, J.S. West, F.L. Oaks, P.L. Lundberg, D. Klenerman, R. Durbin and A.J. Smith, *Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry*. *Nature*, 2008. **456**(7218): p. 53-9.
12. Taylor, J.G., E.H. Choi, C.B. Foster, and S.J. Chanock, *Using genetic variation to study human disease*. *Trends Mol Med*, 2001. **7**(11): p. 507-12.
 13. Fekete, G., A. Varadi, E. Pipiras, K. Nemeth, L.A. Rethy, K. Holics, and R. Ujhelyi, *[Detection of delta F508 mutation in cystic fibrosis]*. *Orv Hetil*, 1992. **133**(38): p. 2423-4, 2427-30.
 14. Ferenczi, A., M. Garami, E. Kiss, M. Pek, M. Sasvari-Szekely, C. Barta, M. Staub, J. Solyom, and G. Fekete, *Screening for mutations of 21-hydroxylase gene in Hungarian*

- patients with congenital adrenal hyperplasia*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(7): p. 2369-72.
15. Patocs, A., M. Toth, C. Barta, M. Sasvari-Szekely, I. Varga, N. Szucs, C. Jakab, E. Glaz, and K. Racz, *Hormonal evaluation and mutation screening for steroid 21-hydroxylase deficiency in patients with unilateral and bilateral adrenal incidentalomas*. Eur J Endocrinol, 2002. **147**(3): p. 349-55.
 16. Theodoropoulou, M., C. Barta, M. Szoke, A. Guttman, M. Staub, T. Niederland, J. Solyom, G. Fekete, and M. Sasvari-Szekely, *Prenatal diagnosis of steroid 21-hydroxylase deficiency by allele-specific amplification*. Fetal Diagn Ther, 2001. **16**(4): p. 237-40.
 17. Wright, A.F. and N.D. Hastie, *Complex genetic diseases: controversy over the Croesus code*. Genome Biol, 2001. **2**(8): p. COMMENT2007.
 18. Manolio, T.A. and F.S. Collins, *The HapMap and genome-wide association studies in diagnosis and therapy*. Annu Rev Med, 2009. **60**: p. 443-56.
 19. Zeggini, E., L.J. Scott, R. Saxena, B.F. Voight, J.L. Marchini, T. Hu, P.I. de Bakker, G.R. Abecasis, P. Almgren, G. Andersen, K. Ardlie, K.B. Bostrom, R.N. Bergman, L.L. Bonnycastle, K. Borch-Johnsen, N.P. Burt, H. Chen, P.S. Chines, M.J. Daly, P. Deodhar, C.J. Ding, A.S. Doney, W.L. Duren, K.S. Elliott, M.R. Erdos, T.M. Frayling, R.M. Freathy, L. Gianniny, H. Grallert, N. Grarup, C.J. Groves, C. Guiducci, T. Hansen, C. Herder, G.A. Hitman, T.E. Hughes, B. Isomaa, A.U. Jackson, T. Jorgensen, A. Kong, K. Kubalanza, F.G. Kuruvilla, J. Kuusisto, C. Langenberg, H. Lango, T. Lauritzen, Y. Li, C.M. Lindgren, V. Lyssenko, A.F. Marvelle, C. Meisinger, K. Midthjell, K.L. Mohlke, M.A. Morken, A.D. Morris, N. Narisu, P. Nilsson, K.R. Owen, C.N. Palmer, F. Payne, J.R. Perry, E. Pettersen, C. Platou, I. Prokopenko, L. Qi, L. Qin, N.W. Rayner, M. Rees, J.J. Roix, A. Sandbaek, B. Shields, M. Sjogren, V. Steinthorsdottir, H.M. Stringham, A.J. Swift, G. Thorleifsson, U. Thorsteinsdottir, N.J. Timpson, T. Tuomi, J. Tuomilehto, M. Walker, R.M. Watanabe, M.N. Weedon, C.J. Willer, T. Illig, K. Hveem, F.B. Hu, M. Laakso, K. Stefansson, O. Pedersen, N.J. Wareham, I. Barroso, A.T. Hattersley, F.S. Collins, L. Groop, M.I. McCarthy, M.

- Boehnke, and D. Altshuler, *Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes*. Nat Genet, 2008. **40**(5): p. 638-45.
20. Ronai, Z., A. Guttman, Z. Nemoda, M. Staub, H. Kalasz, and M. Sasvari-Szekely, *Rapid and sensitive genotyping of dopamine D4 receptor tandem repeats by automated ultrathin-layer gel electrophoresis*. Electrophoresis, 2000. **21**(10): p. 2058-61.
 21. Ronai, Z., C. Barta, A. Guttman, K. Lakatos, J. Gervai, M. Staub, and M. Sasvari-Szekely, *Genotyping the -521C/T functional polymorphism in the promoter region of dopamine D4 receptor (DRD4) gene*. Electrophoresis, 2001. **22**(6): p. 1102-5.
 22. Shen, G.Q., K.G. Abdullah, and Q.K. Wang, *The TaqMan method for SNP genotyping*. Methods Mol Biol, 2009. **578**: p. 293-306.
 23. Fajans, S. and J. Conn, *Prediabetes, subclinical diabetes and latent clinical diabetes: interpretation, diagnosis and treatment*. On the Nature and Treatment of Diabetes 1965: p. 641–656.
 24. Yamagata, K., H. Furuta, N. Oda, P.J. Kaisaki, S. Menzel, N.J. Cox, S.S. Fajans, S. Signorini, M. Stoffel, and G.I. Bell, *Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1)*. Nature, 1996. **384**(6608): p. 458-60.
 25. Stoffers, D.A., J. Ferrer, W.L. Clarke, and J.F. Habener, *Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1*. Nat Genet, 1997. **17**(2): p. 138-9.
 26. Gaál, Z., I. Kántor, A. Somogyi, K. Farkas, G. Jermendy, F. Dicső, and B. Valenta, *A MODY (maturity-onset diabetes of the young) klinikai jellemzői és genetikai heterogenitása*. Diabetológia Hungarica 2003. **11**: p. 259-265.

27. Hattersley, A.T., F. Beards, E. Ballantyne, M. Appleton, R. Harvey, and S. Ellard, *Mutations in the glucokinase gene of the fetus result in reduced birth weight*. Nat Genet, 1998. **19**(3): p. 268-70.
28. Matschinsky, F.M., B. Glaser, and M.A. Magnuson, *Pancreatic beta-cell glucokinase: closing the gap between theoretical concepts and experimental realities*. Diabetes, 1998. **47**(3): p. 307-15.
29. Velho, G., M. Vaxillaire, V. Boccio, G. Charpentier, and P. Froguel, *Diabetes complications in NIDDM kindreds linked to the MODY3 locus on chromosome 12q*. Diabetes Care, 1996. **19**(9): p. 915-9.
30. Clocquet, A.R., J.M. Egan, D.A. Stoffers, D.C. Muller, L. Wideman, G.A. Chin, W.L. Clarke, J.B. Hanks, J.F. Habener, and D. Elahi, *Impaired insulin secretion and increased insulin sensitivity in familial maturity-onset diabetes of the young 4 (insulin promoter factor 1 gene)*. Diabetes, 2000. **49**(11): p. 1856-64.
31. St-Onge, L., R. Wehr, and P. Gruss, *Pancreas development and diabetes*. Curr Opin Genet Dev, 1999. **9**(3): p. 295-300.
32. Horikawa, Y., N. Iwasaki, M. Hara, H. Furuta, Y. Hinokio, B.N. Cockburn, T. Lindner, K. Yamagata, M. Ogata, O. Tomonaga, H. Kuroki, T. Kasahara, Y. Iwamoto, and G.I. Bell, *Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY*. Nat Genet, 1997. **17**(4): p. 384-5.
33. Malecki, M.T., U.S. Jhala, A. Antonellis, L. Fields, A. Doria, T. Orban, M. Saad, J.H. Warram, M. Montminy, and A.S. Krolewski, *Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus*. Nat Genet, 1999. **23**(3): p. 323-8.
34. Vionnet, N., P. Passa, and P. Froguel, *Prevalence of mitochondrial gene mutations in families with diabetes mellitus*. Lancet, 1993. **342**(8884): p. 1429-30.

35. Cao, H. and R.A. Hegele, *Nuclear lamin A/C R482Q mutation in canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(1): p. 109-12.
36. Goto, Y., I. Nonaka, and S. Horai, *A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies*. Nature, 1990. **348**(6302): p. 651-3.
37. Maassen, J.A. and T. Kadowaki, *Maternally inherited diabetes and deafness: a new diabetes subtype*. Diabetologia, 1996. **39**(4): p. 375-82.
38. Nagy, G., K. Rosta, É. Ruzicska, A. Somogyi, and M. Sasvári-Székely, *Újabb eredmények a 2-es típusú diabEtes mellitus genetikai tényezőiről*. Magyar Belorvosi Archivum, 2007. **62**(2): p. 9-15.
39. Frayling, T.M., *Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(9): p. 657-62.
40. Thomson, G., W.P. Robinson, M.K. Kuhner, S. Joe, M.J. MacDonald, J.L. Gottschall, J. Barbosa, S.S. Rich, J. Bertrams, M.P. Baur, and et al., *Genetic heterogeneity, modes of inheritance, and risk estimates for a joint study of Caucasians with insulin-dependent diabetes mellitus*. Am J Hum Genet, 1988. **43**(6): p. 799-816.
41. Risch, N., *Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease*. Am J Hum Genet, 1987. **40**(1): p. 1-14.
42. Olmos, P., R. A'Hern, D.A. Heaton, B.A. Millward, D. Risley, D.A. Pyke, and R.D. Leslie, *The significance of the concordance rate for type 1 (insulin-dependent) diabetes in identical twins*. Diabetologia, 1988. **31**(10): p. 747-50.
43. Redondo, M.J., L. Yu, M. Hawa, T. Mackenzie, D.A. Pyke, G.S. Eisenbarth, and R.D. Leslie, *Heterogeneity of type I diabetes: analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States*. Diabetologia, 2001. **44**(3): p. 354-62.

44. Cavender, D.E., D.K. Wagener, B.S. Rabin, D.J. Becker, T.J. Orchard, M.S. Eberhardt, R.E. LaPorte, A.L. Drash, and L.H. Kuller, *The Pittsburgh Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (IDDM) study. HLA antigens and haplotypes as risk factors for the development of IDDM in IDDM patients and their siblings*. J Chronic Dis, 1984. **37**(7): p. 555-68.
45. Tarn, A.C., J.M. Thomas, B.M. Dean, D. Ingram, G. Schwarz, G.F. Bottazzo, and E.A. Gale, *Predicting insulin-dependent diabetes*. Lancet, 1988. **1**(8590): p. 845-50.
46. *Diabetes mellitus in twins: a cooperative study in Japan. Committee on Diabetic Twins, Japan Diabetes Society*. Diabetes Res Clin Pract, 1988. **5**(4): p. 271-80.
47. Kaprio, J., J. Tuomilehto, M. Koskenvuo, K. Romanov, A. Reunanen, J. Eriksson, J. Stengard, and Y.A. Kesaniemi, *Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland*. Diabetologia, 1992. **35**(11): p. 1060-7.
48. Newman, B., J.V. Selby, M.C. King, C. Slemenda, R. Fabsitz, and G.D. Friedman, *Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins*. Diabetologia, 1987. **30**(10): p. 763-8.
49. Florez, J.C., *Clinical review: the genetics of type 2 diabetes: a realistic appraisal in 2008*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(12): p. 4633-42.
50. Bell, G.I., S. Horita, and J.H. Karam, *A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus*. Diabetes, 1984. **33**(2): p. 176-83.
51. Bennett, S.T., A.M. Lucassen, S.C. Gough, E.E. Powell, D.E. Undlien, L.E. Pritchard, M.E. Merriman, Y. Kawaguchi, M.J. Dronsfield, F. Pociot, and et al., *Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus*. Nat Genet, 1995. **9**(3): p. 284-92.

52. Barratt, B.J., F. Payne, C.E. Lowe, R. Hermann, B.C. Healy, D. Harold, P. Concannon, N. Gharani, M.I. McCarthy, M.G. Olavesen, R. McCormack, C. Guja, C. Ionescu-Tirgoviste, D.E. Undlien, K.S. Ronningen, K.M. Gillespie, E. Tuomilehto-Wolf, J. Tuomilehto, S.T. Bennett, D.G. Clayton, H.J. Cordell, and J.A. Todd, *Remapping the insulin gene/IDDM2 locus in type 1 diabetes*. Diabetes, 2004. **53**(7): p. 1884-9.
53. Vafiadis, P., S.T. Bennett, J.A. Todd, J. Nadeau, R. Grabs, C.G. Goodyer, S. Wickramasinghe, E. Colle, and C. Polychronakos, *Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus*. Nat Genet, 1997. **15**(3): p. 289-92.
54. Kristiansen, O.P., Z.M. Larsen, and F. Pociot, *CTLA-4 in autoimmune diseases--a general susceptibility gene to autoimmunity?* Genes Immun, 2000. **1**(3): p. 170-84.
55. Ueda, H., J.M. Howson, L. Esposito, J. Heward, H. Snook, G. Chamberlain, D.B. Rainbow, K.M. Hunter, A.N. Smith, G. Di Genova, M.H. Herr, I. Dahlman, F. Payne, D. Smyth, C. Lowe, R.C. Twells, S. Howlett, B. Healy, S. Nutland, H.E. Rance, V. Everett, L.J. Smink, A.C. Lam, H.J. Cordell, N.M. Walker, C. Bordin, J. Hulme, C. Motzo, F. Cucca, J.F. Hess, M.L. Metzker, J. Rogers, S. Gregory, A. Allahabadia, R. Nithiyananthan, E. Tuomilehto-Wolf, J. Tuomilehto, P. Bingley, K.M. Gillespie, D.E. Undlien, K.S. Ronningen, C. Guja, C. Ionescu-Tirgoviste, D.A. Savage, A.P. Maxwell, D.J. Carson, C.C. Patterson, J.A. Franklyn, D.G. Clayton, L.B. Peterson, L.S. Wicker, J.A. Todd, and S.C. Gough, *Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease*. Nature, 2003. **423**(6939): p. 506-11.
56. Nistico, L., R. Buzzetti, L.E. Pritchard, B. Van der Auwera, C. Giovannini, E. Bosi, M.T. Larrad, M.S. Rios, C.C. Chow, C.S. Cockram, K. Jacobs, C. Mijovic, S.C. Bain, A.H. Barnett, C.L. Vandewalle, F. Schuit, F.K. Gorus, R. Tosi, P. Pozzilli, and J.A. Todd, *The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(7): p. 1075-80.

57. Bottini, N., L. Musumeci, A. Alonso, S. Rahmouni, K. Nika, M. Rostamkhani, J. MacMurray, G.F. Meloni, P. Lucarelli, M. Pellecchia, G.S. Eisenbarth, D. Comings, and T. Mustelin, *A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type 1 diabetes*. Nat Genet, 2004. **36**(4): p. 337-8.
58. Smyth, D., J.D. Cooper, J.E. Collins, J.M. Heward, J.A. Franklyn, J.M. Howson, A. Vella, S. Nutland, H.E. Rance, L. Maier, B.J. Barratt, C. Guja, C. Ionescu-Tirgoviste, D.A. Savage, D.B. Dunger, B. Widmer, D.P. Strachan, S.M. Ring, N. Walker, D.G. Clayton, R.C. Twells, S.C. Gough, and J.A. Todd, *Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus*. Diabetes, 2004. **53**(11): p. 3020-3.
59. Vella, A., J.D. Cooper, C.E. Lowe, N. Walker, S. Nutland, B. Widmer, R. Jones, S.M. Ring, W. McArdle, M.E. Pembrey, D.P. Strachan, D.B. Dunger, R.C. Twells, D.G. Clayton, and J.A. Todd, *Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms*. Am J Hum Genet, 2005. **76**(5): p. 773-9.
60. Qu, H.Q., A. Montpetit, B. Ge, T.J. Hudson, and C. Polychronakos, *Toward further mapping of the association between the IL2RA locus and type 1 diabetes*. Diabetes, 2007. **56**(4): p. 1174-6.
61. Lowe, C.E., J.D. Cooper, T. Brusko, N.M. Walker, D.J. Smyth, R. Bailey, K. Bourget, V. Plagnol, S. Field, M. Atkinson, D.G. Clayton, L.S. Wicker, and J.A. Todd, *Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes*. Nat Genet, 2007. **39**(9): p. 1074-82.
62. Smyth, D.J., J.D. Cooper, R. Bailey, S. Field, O. Burren, L.J. Smink, C. Guja, C. Ionescu-Tirgoviste, B. Widmer, D.B. Dunger, D.A. Savage, N.M. Walker, D.G. Clayton, J.A. Todd, D.J. Smyth, J.D. Cooper, R. Bailey, S. Field, O. Burren, L.J. Smink, C. Guja, C. Ionescu-Tirgoviste, B. Widmer, D.B. Dunger, D.A. Savage, N.M. Walker, D.G. Clayton, and J.A. Todd, *A genome-wide association study of*

- nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region*. *Nature Genetics*, 2006. **38**(6): p. 617-9.
63. Knip, M., R. Veijola, S.M. Virtanen, H. Hyoty, O. Vaarala, and H.K. Akerblom, *Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes*. *Diabetes*, 2005. **54 Suppl 2**: p. S125-36.
 64. Cambi, A. and C.G. Figdor, *Levels of complexity in pathogen recognition by C-type lectins*. *Curr Opin Immunol*, 2005. **17**(4): p. 345-51.
 65. Wellcome Trust Case Control, C., *Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls*. *Nature*, 2007. **447**(7145): p. 661-78.
 66. Grant, S.F., H.Q. Qu, J.P. Bradfield, L. Marchand, C.E. Kim, J.T. Glessner, R. Grabs, S.P. Taback, E.C. Frackelton, A.W. Eckert, K. Annaiah, M.L. Lawson, F.G. Otieno, E. Santa, J.L. Shaner, R.M. Smith, R. Skraban, M. Imielinski, R.M. Chiavacci, R.W. Grundmeier, C.A. Stanley, S.E. Kirsch, D. Waggott, A.D. Paterson, D.S. Monos, C. Polychronakos, and H. Hakonarson, *Follow-up analysis of genome-wide association data identifies novel loci for type 1 diabetes*. *Diabetes*, 2009. **58**(1): p. 290-5.
 67. Hakonarson, H., S.F. Grant, J.P. Bradfield, L. Marchand, C.E. Kim, J.T. Glessner, R. Grabs, T. Casalunovo, S.P. Taback, E.C. Frackelton, M.L. Lawson, L.J. Robinson, R. Skraban, Y. Lu, R.M. Chiavacci, C.A. Stanley, S.E. Kirsch, E.F. Rappaport, J.S. Orange, D.S. Monos, M. Devoto, H.Q. Qu, C. Polychronakos, H. Hakonarson, S.F.A. Grant, J.P. Bradfield, L. Marchand, C.E. Kim, J.T. Glessner, R. Grabs, T. Casalunovo, S.P. Taback, E.C. Frackelton, M.L. Lawson, L.J. Robinson, R. Skraban, Y. Lu, R.M. Chiavacci, C.A. Stanley, S.E. Kirsch, E.F. Rappaport, J.S. Orange, D.S. Monos, M. Devoto, H.-Q. Qu, and C. Polychronakos, *A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene*. *Nature*, 2007. **448**(7153): p. 591-4.
 68. Alizadeh, B.Z. and B.P. Koeleman, *Genetic polymorphisms in susceptibility to Type 1 Diabetes*. *Clin Chim Acta*, 2008. **387**(1-2): p. 9-17.

69. Correa-Giannella, M.L. and S.M. Vieira, [*Genetic susceptibility to microangiopathy development in Type 1 diabetes mellitus*]. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2008. **52**(2): p. 375-86.
70. Pociot, F. and M.F. McDermott, *Genetics of type 1 diabetes mellitus*. Genes Immun, 2002. **3**(5): p. 235-49.
71. Winckler, W., M.N. Weedon, R.R. Graham, S.A. McCarroll, S. Purcell, P. Almgren, T. Tuomi, D. Gaudet, K.B. Bostrom, M. Walker, G. Hitman, A.T. Hattersley, M.I. McCarthy, K.G. Ardlie, J.N. Hirschhorn, M.J. Daly, T.M. Frayling, L. Groop, and D. Altshuler, *Evaluation of common variants in the six known maturity-onset diabetes of the young (MODY) genes for association with type 2 diabetes*. Diabetes, 2007. **56**(3): p. 685-93.
72. Holmkvist, J., P. Almgren, V. Lyssenko, C.M. Lindgren, K.F. Eriksson, B. Isomaa, T. Tuomi, P. Nilsson, and L. Groop, *Common variants in maturity-onset diabetes of the young genes and future risk of type 2 diabetes*. Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1738-44.
73. Gudmundsson, J., P. Sulem, V. Steinthorsdottir, J.T. Bergthorsson, G. Thorleifsson, A. Manolescu, T. Rafnar, D. Gudbjartsson, B.A. Agnarsson, A. Baker, A. Sigurdsson, K.R. Benediktsdottir, M. Jakobsdottir, T. Blondal, S.N. Stacey, A. Helgason, S. Gunnarsdottir, A. Olafsdottir, K.T. Kristinsson, B. Birgisdottir, S. Ghosh, S. Thorlacius, D. Magnusdottir, G. Stefansdottir, K. Kristjansson, Y. Bagger, R.L. Wilensky, M.P. Reilly, A.D. Morris, C.H. Kimber, A. Adeyemo, Y. Chen, J. Zhou, W.Y. So, P.C. Tong, M.C. Ng, T. Hansen, G. Andersen, K. Borch-Johnsen, T. Jorgensen, A. Tres, F. Fuertes, M. Ruiz-Echarri, L. Asin, B. Saez, E. van Boven, S. Klaver, D.W. Swinkels, K.K. Aben, T. Graif, J. Cashy, B.K. Suarez, O. van Vierssen Trip, M.L. Frigge, C. Ober, M.H. Hofker, C. Wijmenga, C. Christiansen, D.J. Rader, C.N. Palmer, C. Rotimi, J.C. Chan, O. Pedersen, G. Sigurdsson, R. Benediktsson, E. Jonsson, G.V. Einarsson, J.I. Mayordomo, W.J. Catalona, L.A. Kiemeny, R.B. Barkardottir, J.R. Gulcher, U. Thorsteinsdottir, A. Kong, and K. Stefansson, *Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes*. Nat Genet, 2007. **39**(8): p. 977-83.

74. Inoue, H., Y. Tanizawa, J. Wasson, P. Behn, K. Kalidas, E. Bernal-Mizrachi, M. Mueckler, H. Marshall, H. Donis-Keller, P. Crock, D. Rogers, M. Mikuni, H. Kumashiro, K. Higashi, G. Sobue, Y. Oka, and M.A. Permutt, *A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome)*. Nat Genet, 1998. **20**(2): p. 143-8.
75. Sandhu, M.S., M.N. Weedon, K.A. Fawcett, J. Wasson, S.L. Debenham, A. Daly, H. Lango, T.M. Frayling, R.J. Neumann, R. Sherva, I. Blech, P.D. Pharoah, C.N. Palmer, C. Kimber, R. Tavendale, A.D. Morris, M.I. McCarthy, M. Walker, G. Hitman, B. Glaser, M.A. Permutt, A.T. Hattersley, N.J. Wareham, and I. Barroso, *Common variants in WFS1 confer risk of type 2 diabetes*. Nat Genet, 2007. **39**(8): p. 951-3.
76. Franks, P.W., O. Rolandsson, S.L. Debenham, K.A. Fawcett, F. Payne, C. Dina, P. Froguel, K.L. Mohlke, C. Willer, T. Olsson, N.J. Wareham, G. Hallmans, I. Barroso, and M.S. Sandhu, *Replication of the association between variants in WFS1 and risk of type 2 diabetes in European populations*. Diabetologia, 2008. **51**(3): p. 458-63.
77. Florez, J.C., K.A. Jablonski, J. McAteer, M.S. Sandhu, N.J. Wareham, I. Barroso, P.W. Franks, D. Altshuler, and W.C. Knowler, *Testing of diabetes-associated WFS1 polymorphisms in the Diabetes Prevention Program*. Diabetologia, 2008. **51**(3): p. 451-7.
78. Sparso, T., G. Andersen, A. Albrechtsen, T. Jorgensen, K. Borch-Johnsen, A. Sandbaek, T. Lauritzen, J. Wasson, M.A. Permutt, B. Glaser, S. Madsbad, O. Pedersen, and T. Hansen, *Impact of polymorphisms in WFS1 on prediabetic phenotypes in a population-based sample of middle-aged people with normal and abnormal glucose regulation*. Diabetologia, 2008. **51**(9): p. 1646-52.
79. Yen, C.J., B.A. Beamer, C. Negri, K. Silver, K.A. Brown, D.P. Yarnall, D.K. Burns, J. Roth, and A.R. Shuldiner, *Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **241**(2): p. 270-4.

80. Altshuler, D., J.N. Hirschhorn, M. Klannemark, C.M. Lindgren, M.C. Vohl, J. Nemesh, C.R. Lane, S.F. Schaffner, S. Bolk, C. Brewer, T. Tuomi, D. Gaudet, T.J. Hudson, M. Daly, L. Groop, and E.S. Lander, *The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes*. Nat Genet, 2000. **26**(1): p. 76-80.
81. Deeb, S.S., L. Fajas, M. Nemoto, J. Pihlajamaki, L. Mykkanen, J. Kuusisto, M. Laakso, W. Fujimoto, and J. Auwerx, *A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity*. Nat Genet, 1998. **20**(3): p. 284-7.
82. Gloyn, A.L., M.N. Weedon, K.R. Owen, M.J. Turner, B.A. Knight, G. Hitman, M. Walker, J.C. Levy, M. Sampson, S. Halford, M.I. McCarthy, A.T. Hattersley, and T.M. Frayling, *Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes*. Diabetes, 2003. **52**(2): p. 568-72.
83. Hani, E.H., P. Boutin, E. Durand, H. Inoue, M.A. Permutt, G. Velho, and P. Froguel, *Missense mutations in the pancreatic islet beta cell inwardly rectifying K⁺ channel gene (KIR6.2/BIR): a meta-analysis suggests a role in the polygenic basis of Type II diabetes mellitus in Caucasians*. Diabetologia, 1998. **41**(12): p. 1511-5.
84. Nielsen, E.M., L. Hansen, B. Carstensen, S.M. Echwald, T. Drivsholm, C. Glumer, B. Thorsteinsson, K. Borch-Johnsen, T. Hansen, and O. Pedersen, *The E23K variant of Kir6.2 associates with impaired post-OGTT serum insulin response and increased risk of type 2 diabetes*. Diabetes, 2003. **52**(2): p. 573-7.
85. Florez, J.C., N. Burt, P.I. de Bakker, P. Almgren, T. Tuomi, J. Holmkvist, D. Gaudet, T.J. Hudson, S.F. Schaffner, M.J. Daly, J.N. Hirschhorn, L. Groop, and D. Altshuler, *Haplotype structure and genotype-phenotype correlations of the sulfonylurea receptor and the islet ATP-sensitive potassium channel gene region*. Diabetes, 2004. **53**(5): p. 1360-8.

86. Grant, S.F., G. Thorleifsson, I. Reynisdottir, R. Benediktsson, A. Manolescu, J. Sainz, A. Helgason, H. Stefansson, V. Emilsson, A. Helgadottir, U. Styrkarsdottir, K.P. Magnusson, G.B. Walters, E. Palsdottir, T. Jonsdottir, T. Gudmundsdottir, A. Gylfason, J. Saemundsdottir, R.L. Wilensky, M.P. Reilly, D.J. Rader, Y. Bagger, C. Christiansen, V. Gudnason, G. Sigurdsson, U. Thorsteinsdottir, J.R. Gulcher, A. Kong, and K. Stefansson, *Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes*. Nat Genet, 2006. **38**(3): p. 320-3.

87. Lyssenko, V., R. Lupi, P. Marchetti, S. Del Guerra, M. Orho-Melandar, P. Almgren, M. Sjogren, C. Ling, K.F. Eriksson, A.L. Lethagen, R. Mancarella, G. Berglund, T. Tuomi, P. Nilsson, S. Del Prato, and L. Groop, *Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes*. J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2155-63.

88. McCarthy, M.I., *Growing evidence for diabetes susceptibility genes from genome scan data*. Curr Diab Rep, 2003. **3**(2): p. 159-67.

89. Guan, W., A. Pluzhnikov, N.J. Cox, and M. Boehnke, *Meta-analysis of 23 type 2 diabetes linkage studies from the International Type 2 Diabetes Linkage Analysis Consortium*. Hum Hered, 2008. **66**(1): p. 35-49.

90. Saxena, R., B.F. Voight, V. Lyssenko, N.P. Burt, P.I. de Bakker, H. Chen, J.J. Roix, S. Kathiresan, J.N. Hirschhorn, M.J. Daly, T.E. Hughes, L. Groop, D. Altshuler, P. Almgren, J.C. Florez, J. Meyer, K. Ardlie, K. Bengtsson Bostrom, B. Isomaa, G. Lettre, U. Lindblad, H.N. Lyon, O. Melander, C. Newton-Cheh, P. Nilsson, M. Orho-Melandar, L. Rastam, E.K. Speliotes, M.R. Taskinen, T. Tuomi, C. Guiducci, A. Berglund, J. Carlson, L. Gianniny, R. Hackett, L. Hall, J. Holmkvist, E. Laurila, M. Sjogren, M. Sterner, A. Surti, M. Svensson, R. Tewhey, B. Blumenstiel, M. Parkin, M. Defelice, R. Barry, W. Brodeur, J. Camarata, N. Chia, M. Fava, J. Gibbons, B. Handsaker, C. Healy, K. Nguyen, C. Gates, C. Sougnez, D. Gage, M. Nizzari, S.B. Gabriel, G.W. Chirn, Q. Ma, H. Parikh, D. Richardson, D. Ricke, and S. Purcell, *Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels*. Science, 2007. **316**(5829): p. 1331-6.

91. Scott, L.J., K.L. Mohlke, L.L. Bonnycastle, C.J. Willer, Y. Li, W.L. Duren, M.R. Erdos, H.M. Stringham, P.S. Chines, A.U. Jackson, L. Prokunina-Olsson, C.J. Ding, A.J. Swift, N. Narisu, T. Hu, R. Pruim, R. Xiao, X.Y. Li, K.N. Conneely, N.L. Riebow, A.G. Sprau, M. Tong, P.P. White, K.N. Hetrick, M.W. Barnhart, C.W. Bark, J.L. Goldstein, L. Watkins, F. Xiang, J. Saramies, T.A. Buchanan, R.M. Watanabe, T.T. Valle, L. Kinnunen, G.R. Abecasis, E.W. Pugh, K.F. Doheny, R.N. Bergman, J. Tuomilehto, F.S. Collins, and M. Boehnke, *A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants*. Science, 2007. **316**(5829): p. 1341-5.
92. Zeggini, E., M.N. Weedon, C.M. Lindgren, T.M. Frayling, K.S. Elliott, H. Lango, N.J. Timpson, J.R. Perry, N.W. Rayner, R.M. Freathy, J.C. Barrett, B. Shields, A.P. Morris, S. Ellard, C.J. Groves, L.W. Harries, J.L. Marchini, K.R. Owen, B. Knight, L.R. Cardon, M. Walker, G.A. Hitman, A.D. Morris, A.S. Doney, M.I. McCarthy, and A.T. Hattersley, *Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes*. Science, 2007. **316**(5829): p. 1336-41.
93. Sladek, R., G. Rocheleau, J. Rung, C. Dina, L. Shen, D. Serre, P. Boutin, D. Vincent, A. Belisle, S. Hadjadj, B. Balkau, B. Heude, G. Charpentier, T.J. Hudson, A. Montpetit, A.V. Pshezhetsky, M. Prentki, B.I. Posner, D.J. Balding, D. Meyre, C. Polychronakos, and P. Froguel, *A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 881-5.
94. Salonen, J.T., P. Uimari, J.M. Aalto, M. Pirskanen, J. Kaikkonen, B. Todorova, J. Hypponen, V.P. Korhonen, J. Asikainen, C. Devine, T.P. Tuomainen, J. Luedemann, M. Nauck, W. Kerner, R.H. Stephens, J.P. New, W.E. Ollier, J.M. Gibson, A. Payton, M.A. Horan, N. Pendleton, W. Mahoney, D. Meyre, J. Delplanque, P. Froguel, O. Luzzatto, B. Yakir, and A. Darvasi, *Type 2 diabetes whole-genome association study in four populations: the DiaGen consortium*. Am J Hum Genet, 2007. **81**(2): p. 338-45.
95. Steinthorsdottir, V., G. Thorleifsson, I. Reynisdottir, R. Benediktsson, T. Jonsdottir, G.B. Walters, U. Styrkarsdottir, S. Gretarsdottir, V. Emilsson, S. Ghosh, A. Baker, S. Snorraddottir, H. Bjarnason, M.C. Ng, T. Hansen, Y. Bagger, R.L. Wilensky, M.P.

- Reilly, A. Adeyemo, Y. Chen, J. Zhou, V. Gudnason, G. Chen, H. Huang, K. Lashley, A. Doumatey, W.Y. So, R.C. Ma, G. Andersen, K. Borch-Johnsen, T. Jorgensen, J.V. van Vliet-Ostaptchouk, M.H. Hofker, C. Wijmenga, C. Christiansen, D.J. Rader, C. Rotimi, M. Gurney, J.C. Chan, O. Pedersen, G. Sigurdsson, J.R. Gulcher, U. Thorsteinsdottir, A. Kong, and K. Stefansson, *A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes*. Nat Genet, 2007. **39**(6): p. 770-5.
96. Unoki, H., A. Takahashi, T. Kawaguchi, K. Hara, M. Horikoshi, G. Andersen, J. Holmkvist, K. Borch-Johnsen, T. Jørgensen, A. Sandbæk, T. Lauritzen, T. Hansen, S. Nurbaya, T. Tsunoda, M. Kubo, T. Babazono, H. Hirose, M. Hayashi, Y. Iwamoto, A. Kashiwagi, K. Kaku, R. Kawamori, E.S. Tai, O. Pedersen, N. Kamatani, T. Kadowaki, R. Kikkawa, Y. Nakamura, and S. Maeda, *SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations*. Nature Genetics, 2008. **40**: p. 1098–1102.
97. Yasuda, K., K. Miyake, Y. Horikawa, K. Hara, H. Osawa, H. Furuta, Y. Hirota, H. Mori, A. Jonsson, Y. Sato, K. Yamagata, Y. Hinokio, H.Y. Wang, T. Tanahashi, N. Nakamura, Y. Oka, N. Iwasaki, Y. Iwamoto, Y. Yamada, Y. Seino, H. Maegawa, A. Kashiwagi, J. Takeda, E. Maeda, H.D. Shin, Y.M. Cho, K.S. Park, H.K. Lee, M.C. Ng, R.C. Ma, W.Y. So, J.C. Chan, V. Lyssenko, T. Tuomi, P. Nilsson, L. Groop, N. Kamatani, A. Sekine, Y. Nakamura, K. Yamamoto, T. Yoshida, K. Tokunaga, M. Itakura, H. Makino, K. Nanjo, T. Kadowaki, and M. Kasuga, *Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus*. Nat Genet, 2008. **40**(9): p. 1092-7.
98. Hirschfeld, R.M., *History and evolution of the monoamine hypothesis of depression*. J Clin Psychiatry, 2000. **61 Suppl 6**: p. 4-6.
99. Lustman, P.J., R.E. Clouse, and K.E. Freedland, *Management of Major Depression in Adults With Diabetes: Implications of Recent Clinical Trials*. Semin Clin Neuropsychiatry, 1998. **3**(2): p. 102-114.
100. Zigmond, A.S. and R.P. Snaith, *The hospital anxiety and depression scale*. Acta Psychiatr Scand, 1983. **67**(6): p. 361-70.

101. Jacobson, A.M., M. de Groot, and J.A. Samson, *The effects of psychiatric disorders and symptoms on quality of life in patients with type I and type II diabetes mellitus*. Qual Life Res, 1997. **6**(1): p. 11-20.
102. Tipton, K.F., S. Boyce, J. O'Sullivan, G.P. Davey, and J. Healy, *Monoamine oxidases: certainties and uncertainties*. Curr Med Chem, 2004. **11**(15): p. 1965-82.
103. Youdim, M.B., D. Edmondson, and K.F. Tipton, *The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(4): p. 295-309.
104. Shih, J.C. and K. Chen, *MAO-A and -B gene knock-out mice exhibit distinctly different behavior*. Neurobiology (Bp), 1999. **7**(2): p. 235-46.
105. Whitaker-Azmitia, P.M., R. Murphy, and E.C. Azmitia, *Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology*. Brain Res, 1990. **528**(1): p. 155-8.
106. Wender, P.H., S.S. Kety, D. Rosenthal, F. Schulsinger, J. Ortmann, and I. Lunde, *Psychiatric disorders in the biological and adoptive families of adopted individuals with affective disorders*. Arch Gen Psychiatry, 1986. **43**(10): p. 923-9.
107. Cadoret, R.J., *Evidence for genetic inheritance of primary affective disorder in adoptees*. Am J Psychiatry, 1978. **135**(4): p. 463-6.
108. Mendlewicz, J. and J.D. Rainer, *Adoption study supporting genetic transmission in manic--depressive illness*. Nature, 1977. **268**(5618): p. 327-9.
109. Kendler, K.S., *Twin studies of psychiatric illness: an update*. Arch Gen Psychiatry, 2001. **58**(11): p. 1005-14.
110. Sullivan, P.F., M.C. Neale, and K.S. Kendler, *Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis*. American Journal of Psychiatry, 2000. **157**(10): p. 1552-62.

111. Plotsky, P.M., M.J. Owens, and C.B. Nemeroff, *Psychoneuroendocrinology of depression. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis*. Psychiatr Clin North Am, 1998. **21**(2): p. 293-307.
112. Blazer, D.G., R.C. Kessler, K.A. McGonagle, and M.S. Swartz, *The prevalence and distribution of major depression in a national community sample: the National Comorbidity Survey*. Am J Psychiatry, 1994. **151**(7): p. 979-86.
113. Kessler, R.C., K.A. McGonagle, C.B. Nelson, M. Hughes, M. Swartz, and D.G. Blazer, *Sex and depression in the National Comorbidity Survey. II: Cohort effects*. J Affect Disord, 1994. **30**(1): p. 15-26.
114. Kessler, R.C., *The effects of stressful life events on depression*. Annu Rev Psychol, 1997. **48**: p. 191-214.
115. Kessler, R.C., S. Zhao, D.G. Blazer, and M. Swartz, *Prevalence, correlates, and course of minor depression and major depression in the National Comorbidity Survey*. J Affect Disord, 1997. **45**(1-2): p. 19-30.
116. Fava, M. and K.S. Kendler, *Major depressive disorder*. Neuron, 2000. **28**(2): p. 335-41.
117. Charney, D.S., *Psychobiological mechanisms of resilience and vulnerability: implications for successful adaptation to extreme stress*. Am J Psychiatry, 2004. **161**(2): p. 195-216.
118. Torres, G.E., R.R. Gainetdinov, and M.G. Caron, *Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(1): p. 13-25.
119. Rudnick, G. and J. Clark, *From synapse to vesicle: the reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1144**(3): p. 249-63.

120. Malison, R.T., L.H. Price, R. Berman, C.H. van Dyck, G.H. Pelton, L. Carpenter, G. Sanacora, M.J. Owens, C.B. Nemeroff, N. Rajeevan, R.M. Baldwin, J.P. Seibyl, R.B. Innis, and D.S. Charney, *Reduced brain serotonin transporter availability in major depression as measured by [123I]-2 beta-carbomethoxy-3 beta-(4-iodophenyl)tropane and single photon emission computed tomography*. Biol Psychiatry, 1998. **44**(11): p. 1090-8.
121. Lesch, K.P., D. Bengel, A. Heils, S.Z. Sabol, B.D. Greenberg, S. Petri, J. Benjamin, C.R. Muller, D.H. Hamer, and D.L. Murphy, *Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region*. Science, 1996. **274**(5292): p. 1527-1531.
122. Jorm, A.F., A.S. Henderson, P.A. Jacomb, H. Christensen, A.E. Korten, B. Rodgers, X. Tan, and S. Easteal, *An association study of a functional polymorphism of the serotonin transporter gene with personality and psychiatric symptoms*. Mol Psychiatry, 1998. **3**(5): p. 449-51.
123. Heinz, A., D. Goldman, D.W. Jones, R. Palmour, D. Hommer, J.G. Gorey, K.S. Lee, M. Linnoila, and D.R. Weinberger, *Genotype influences in vivo dopamine transporter availability in human striatum*. Neuropsychopharmacology, 2000. **22**(2): p. 133-9.
124. Fiskerstrand, C.E., E.A. Lovejoy, and J.P. Quinn, *An intronic polymorphic domain often associated with susceptibility to affective disorders has allele dependent differential enhancer activity in embryonic stem cells*. FEBS Lett, 1999. **458**(2): p. 171-4.
125. Sen, S., S. Villafuerte, R. Nesse, S.F. Stoltenberg, J. Hopcian, L. Gleiberman, A. Weder, and M. Burmeister, *Serotonin transporter and GABAA alpha 6 receptor variants are associated with neuroticism*. Biol Psychiatry, 2004. **55**(3): p. 244-9.
126. Munafo, M.R., T.G. Clark, L.R. Moore, E. Payne, R. Walton, and J. Flint, *Genetic polymorphisms and personality in healthy adults: a systematic review and meta-analysis*. Mol Psychiatry, 2003. **8**(5): p. 471-84.

127. Gustavsson, J.P., M.M. Nothen, E.G. Jonsson, H. Neidt, K. Forslund, G. Rylander, M. Mattila-Evenden, G.C. Sedvall, P. Propping, and M. Asberg, *No association between serotonin transporter gene polymorphisms and personality traits*. Am J Med Genet, 1999. **88**(4): p. 430-6.
128. Gelernter, J., J.F. Cubells, J.R. Kidd, A.J. Pakstis, and K.K. Kidd, *Population studies of polymorphisms of the serotonin transporter protein gene*. Am J Med Genet, 1999. **88**(1): p. 61-6.
129. Schinka, J.A., R.M. Busch, and N. Robichaux-Keene, *A meta-analysis of the association between the serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR) and trait anxiety*. Mol Psychiatry, 2004. **9**(2): p. 197-202.
130. Gonda, X., Z. Rihmer, T. Zsombok, G. Bagdy, K.K. Akiskal, and H.S. Akiskal, *The 5HTTLPR polymorphism of the serotonin transporter gene is associated with affective temperaments as measured by TEMPS-A*. J Affect Disord, 2006. **91**(2-3): p. 125-31.
131. Lasky-Su, J.A., S.V. Faraone, S.J. Glatt, and M.T. Tsuang, *Meta-analysis of the association between two polymorphisms in the serotonin transporter gene and affective disorders*. American Journal of Medical Genetics Part B Neuropsychiatric Genetics, 2005. **133**(1): p. 110-115.
132. Anguelova, M., C. Benkelfat, and G. Turecki, *A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: II. Suicidal behavior*. Mol Psychiatry, 2003. **8**(7): p. 646-53.
133. Caspi, A., K. Sugden, T.E. Moffitt, A. Taylor, I.W. Craig, H. Harrington, J. McClay, J. Mill, J. Martin, A. Braithwaite, and R. Poulton, *Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene*. Science, 2003. **301**(5631): p. 386-9.
134. Walther, D.J., J.U. Peter, S. Bashammakh, H. Hortnagl, M. Voits, H. Fink, and M. Bader, *Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform*. Science, 2003. **299**(5603): p. 76-76.

135. Walther, D.J. and M. Bader, *A unique central tryptophan hydroxylase isoform*. *Biochem Pharmacol*, 2003. **66**(9): p. 1673-80.
136. Zhang, X., R.R. Gainetdinov, J.M. Beaulieu, T.D. Sotnikova, L.H. Burch, R.B. Williams, D.A. Schwartz, K.R. Krishnan, and M.G. Caron, *Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression*. *Neuron*, 2005. **45**(1): p. 11-6.
137. Zill, P., T.C. Baghai, P. Zwanzger, C. Schule, D. Eser, R. Rupprecht, H.J. Moller, B. Bondy, and M. Ackenheil, *SNP and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene provide evidence for association with major depression*. *Mol Psychiatry*, 2004. **9**(11): p. 1030-6.
138. Van Den Bogaert, A., S. De Zutter, L. Heyrman, J. Mendlewicz, R. Adolfsson, C. Van Broeckhoven, and J. Del-Favero, *Response to Zhang et al (2005): loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major Depression*. *Neuron* 45, 11-16. *Neuron*, 2005. **48**(5): p. 704; author reply 705-6.
139. Zhou, Z., E.J. Peters, S.P. Hamilton, F. McMahon, C. Thomas, P.J. McGrath, J. Rush, M.H. Trivedi, D.S. Charney, A. Roy, S. Wisniewski, R. Lipsky, and D. Goldman, *Response to Zhang et al. : loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression*. *Neuron*, 2005. **48**(5): p. 702-706.
140. Glatt, C.E., E. Carlson, T.R. Taylor, N. Risch, V.I. Reus, and C.A. Schaefer, *Response to Zhang et al. (2005): loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression*. *Neuron* 45, 11-16. *Neuron*, 2005. **48**(5): p. 704-5; author reply 705-6.
141. Zhou, Z., A. Roy, R. Lipsky, K. Kuchipudi, G. Zhu, J. Taubman, M.A. Enoch, M. Virkkunen, and D. Goldman, *Haplotype-based linkage of tryptophan hydroxylase 2 to suicide attempt, major depression, and cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid in 4 populations*. *Arch Gen Psychiatry*, 2005. **62**(10): p. 1109-18.

142. Lin, Y.M., S.C. Chao, T.M. Chen, T.J. Lai, J.S. Chen, and H.S. Sun, *Association of functional polymorphisms of the human tryptophan hydroxylase 2 gene with risk for bipolar disorder in Han Chinese*. Arch Gen Psychiatry, 2007. **64**(9): p. 1015-24.
143. Chen, G.L., E.J. Vallender, and G.M. Miller, *Functional characterization of the human TPH2 5' regulatory region: untranslated region and polymorphisms modulate gene expression in vitro*. Hum Genet, 2008. **122**(6): p. 645-57.
144. Scheuch, K., M. Lautenschlager, M. Grohmann, S. Stahlberg, J. Kirchheiner, P. Zill, A. Heinz, D.J. Walther, and J. Priller, *Characterization of a functional promoter polymorphism of the human tryptophan hydroxylase 2 gene in serotonergic raphe neurons*. Biol Psychiatry, 2007. **62**(11): p. 1288-94.
145. Gutknecht, L., C. Jacob, A. Strobel, C. Kriegebaum, J. Muller, Y. Zeng, C. Markert, A. Escher, J. Wendland, A. Reif, R. Mossner, C. Gross, B. Brocke, and K.P. Lesch, *Tryptophan hydroxylase-2 gene variation influences personality traits and disorders related to emotional dysregulation*. Int J Neuropsychopharmacol, 2007. **10**(3): p. 309-20.
146. Brown, S.M., E. Peet, S.B. Manuck, D.E. Williamson, R.E. Dahl, R.E. Ferrell, and A.R. Hariri, *A regulatory variant of the human tryptophan hydroxylase-2 gene biases amygdala reactivity*. Mol Psychiatry, 2005. **10**(9): p. 884-888.
147. Grimsby, J., K. Chen, L.J. Wang, N.C. Lan, and J.C. Shih, *Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(9): p. 3637-41.
148. Almási, J. and Z. Rihmer, *Az antidepresszívumok áttekintése a TCA-któl a harmadik generációs szerekig*, in *Neuropsychopharmacologia Hungarica*. 2004. p. 185-194.
149. Egan, M.F., M. Kojima, J.H. Callicott, T.E. Goldberg, B.S. Kolachana, A. Bertolino, E. Zaitsev, B. Gold, D. Goldman, M. Dean, B. Lu, and D.R. Weinberger, *The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function*. [see comment]. Cell, 2003. **112**(2): p. 257-69.

150. Post, R., *Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: Clinical and theoretical implications*. Journal of Psychiatr. Res, 2007. **17**((Epub) ahead of print).
151. Barden, N., M. Harvey, B. Gagne, E. Shink, M. Tremblay, C. Raymond, M. Labbe, A. Villeneuve, D. Rochette, L. Bordeleau, H. Stadler, F. Holsboer, and B. Muller-Myhsok, *Analysis of single nucleotide polymorphisms in genes in the chromosome 12Q24.31 region points to P2RX7 as a susceptibility gene to bipolar affective disorder*. American Journal of Medical Genetics.Part B, Neuropsychiatric Genetics: the Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics, 2006. **141**(4): p. 374.
152. Lucae, S., D. Salyakina, N. Barden, M. Harvey, B. Gagne, M. Labbe, E.B. Binder, M. Uhr, M. Paez-Pereda, I. Sillaber, M. Ising, T. Bruckl, R. Lieb, F. Holsboer, and B. Muller-Myhsok, *P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder*. Human molecular genetics, 2006. **15**(16): p. 2438.
153. Sperlagh, B., E.S. Vizi, K. Wirkner, and P. Illes, *P2X7 receptors in the nervous system*. Progress in Neurobiology, 2006. **78**(6): p. 327-46.
154. Denlinger, L.C., P.L. Fisette, J.A. Sommer, J.J. Watters, U. Prabhu, G.R. Dubyak, R.A. Proctor, and P.J. Bertics, *Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide*. Journal of Immunology, 2001. **167**(4): p. 1871-6.
155. Talbot, F. and A. Nouwen, *A review of the relationship between depression and diabetes in adults: is there a link?* Diabetes Care, 2000. **23**(10): p. 1556-62.
156. Lustman, P.J., R.J. Anderson, K.E. Freedland, M. de Groot, R.M. Carney, and R.E. Clouse, *Depression and poor glycemic control: a meta-analytic review of the literature*. Diabetes care, 2000. **23**(7): p. 934-942

157. Rosenthal, M.J., M. Fajardo, S. Gilmore, J.E. Morley, and B.D. Naliboff, *Hospitalization and mortality of diabetes in older adults. A 3-year prospective study*. Diabetes Care, 1998. **21**(2): p. 231-5.
158. Ciechanowski, P.S., W.J. Katon, and J.E. Russo, *Depression and diabetes: impact of depressive symptoms on adherence, function, and costs*. Archives of Internal Medicine, 2000. **160**(21): p. 3278-85.
159. Egede, L.E., D. Zheng, and K. Simpson, *Comorbid depression is associated with increased health care use and expenditures in individuals with diabetes*. Diabetes care, 2002. **25**(3): p. 464-470.
160. Lustman, P.J., L.S. Griffith, and R.E. Clouse, *Depression in adults with diabetes. Results of 5-yr follow-up study*. Diabetes Care, 1988. **11**(8): p. 605-12.
161. Black, S.A., K.S. Markides, and L.A. Ray, *Depression predicts increased incidence of adverse health outcomes in older Mexican Americans with type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2003. **26**(10): p. 2822-8.
162. Zhang, X., S.L. Norris, E.W. Gregg, Y.J. Cheng, G. Beckles, and H.S. Kahn, *Depressive symptoms and mortality among persons with and without diabetes*. Am J Epidemiol, 2005. **161**(7): p. 652-60.
163. Egede, L.E., P.J. Nietert, and D. Zheng, *Depression and all-cause and coronary heart disease mortality among adults with and without diabetes*. Diabetes Care, 2005. **28**(6): p. 1339-45.
164. Katon, W.J., C. Rutter, G. Simon, E.H. Lin, E. Ludman, P. Ciechanowski, L. Kinder, B. Young, and M. Von Korff, *The association of comorbid depression with mortality in patients with type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2005. **28**(11): p. 2668-72.
165. Lustman, P.J. and R.E. Clouse, *Treatment of depression in diabetes: impact on mood and medical outcome*. Journal of Psychosomatic Research, 2002. **53**(4): p. 917-924.

166. Lustman, P.J., L.S. Griffith, R.E. Clouse, K.E. Freedland, S.A. Eisen, E.H. Rubin, R.M. Carney, and J.B. McGill, *Effects of nortriptyline on depression and glycemic control in diabetes: results of a double-blind, placebo-controlled trial*. Psychosomatic Medicine, 1997. **59**(3): p. 241-250
167. Lustman, P.J., L.S. Griffith, K.E. Freedland, S.S. Kissel, and R.E. Clouse, *Cognitive behavior therapy for depression in type 2 diabetes mellitus. A randomized, controlled trial*. Annals of Internal Medicine, 1998. **129**(8): p. 613-621
168. de Groot, M., R. Anderson, K.E. Freedland, R.E. Clouse, and P.J. Lustman, *Association of depression and diabetes complications: a meta-analysis*. Psychosom Med, 2001. **63**(4): p. 619-30.
169. Eaton, W.W., H. Armenian, J. Gallo, L. Pratt, and D.E. Ford, *Depression and risk for onset of type II diabetes. A prospective population-based study*. Diabetes Care, 1996. **19**(10): p. 1097-102.
170. Ramasubbu, R., *Insulin resistance: a metabolic link between depressive disorder and atherosclerotic vascular diseases*. Med Hypotheses, 2002. **59**(5): p. 537-51.
171. Herrera, R., G. Manjarrez, and J. Hernandez, *Inhibition and kinetic changes of brain tryptophan-5-hydroxylase during insulin-dependent diabetes mellitus in the rat*. Nutr Neurosci, 2005. **8**(1): p. 57-62.
172. Williams, M., R. Clouse, and P. Lustman, *Treating Depression to Prevent Diabetes and Its Complications: Understanding Depression as a Medical Risk Factor* Clinical Diabetes, 2006. **24**(2): p. 79-86
173. Manjarrez, G., R. Herrera, M. Leon, and R.J. Hernandez, *A low brain serotonergic neurotransmission in children with type 1 diabetes detected through the intensity dependence of auditory-evoked potentials*. Diabetes Care, 2006. **29**(1): p. 73-7.
174. Trulson, M.E., J.H. Jacoby, and R.G. MacKenzie, *Streptozotocin-induced diabetes reduces brain serotonin synthesis in rats*. J Neurochem, 1986. **46**(4): p. 1068-72.

175. Musselman, D.L., E. Betan, H. Larsen, and L.S. Phillips, *Relationship of depression to diabetes types 1 and 2: epidemiology, biology, and treatment*. Biol Psychiatry, 2003. **54**(3): p. 317-29.
176. Ketterer, C., O. Tschritter, H. Preissl, M. Heni, H.U. Haring, and A. Fritsche, *Insulin sensitivity of the human brain*. Diabetes Res Clin Pract, 2011. **93 Suppl 1**: p. S47-51.
177. Margolis, R.U. and N. Altszuler, *Insulin in the cerebrospinal fluid*. Nature, 1967. **215**(5108): p. 1375-6.
178. Kroner, Z., *The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes?* Altern Med Rev, 2009. **14**(4): p. 373-9.
179. Havrankova, J., J. Roth, and M. Brownstein, *Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat*. Nature, 1978. **272**(5656): p. 827-9.
180. Kovács-Nagy, R., G. Nagy, A. Somogyi, Z. Rónai, A. Székely, and M. Sasvári-Székely, *A 2-es típusú diabetes mellitus lehetséges új genetikai rizikófaktora*. Magyar Belorvosi Archivum, 2010. **63**: p. 91-98. .
181. Yamada, N., Y. Horikawa, N. Oda, K. Iizuka, N. Shihara, S. Kishi, and J. Takeda, *Genetic variation in the hypoxia-inducible factor-1alpha gene is associated with type 2 diabetes in Japanese*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(10): p. 5841-7.
182. Halmai, Z., E. Domotor, G. Balogh, A. Sarosi, G. Faludi, and A. Szekely, *[Validation of a new mood questionnaire on healthy sample]*. Neuropsychopharmacol Hung, 2008. **10**(3): p. 151-7.
183. Bjelland, I., A.A. Dahl, T.T. Haug, and D. Neckelmann, *The validity of the Hospital Anxiety and Depression Scale. An updated literature review*. J Psychosom Res, 2002. **52**(2): p. 69-77.

184. Ingvar, B., A.D. Alv, H. Tone Tangen, and N. Dag, *The validity of the Hospital Anxiety and Depression Scale: An updated literature review*. Journal of Psychosomatic Research, 2002. **52**(2): p. 69-77.
185. Snaith, R.P., *The Hospital Anxiety And Depression Scale*. Health Qual Life Outcomes, 2003. **1**(1): p. 29.
186. Muszbek, K., A. Szekely, E.M. Balogh, M. Molnar, M. Rohanszky, A. Ruzsa, K. Varga, M. Szollosi, and P. Vadasz, *Validation of the Hungarian translation of Hospital Anxiety and Depression Scale*. Qual Life Res, 2006. **15**(4): p. 761-6.
187. Boor, K., Z. Ronai, Z. Nemoda, P. Gaszner, M. Sasvari-Szekely, A. Guttman, and H. Kalasz, *Noninvasive genotyping of dopamine receptor D4 (DRD4) using nanograms of DNA from substance-dependent patients*. Curr Med Chem, 2002. **9**(8): p. 793-7.
188. Nemoda, Z., Z. Ronai, A. Szekely, E. Kovacs, S. Shandrick, A. Guttman, and M. Sasvari-Szekely, *High-throughput genotyping of repeat polymorphism in the regulatory region of serotonin transporter gene by gel microchip electrophoresis*. Electrophoresis, 2001. **22**(18): p. 4008-11.
189. Wendland, J.R., B.J. Martin, M.R. Kruse, K.P. Lesch, and D.L. Murphy, *Simultaneous genotyping of four functional loci of human SLC6A4, with a reappraisal of 5-HTTLPR and rs25531*. Mol Psychiatry, 2006. **11**(3): p. 224-6.
190. Benjamini, Y. and Y. Hochberg, *Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing*. J. R. Statist. Soc. , 1995. **B 57**: p. 289-300.
191. Nagy, G., R. Nagy, A. Székely, M. Sasvári-Székely, and A. Somogyi, *A KCNA3 gén T1645C polimorfizmusának vizsgálata diabetesben*. Magyar Belorvosi Archivum, 2008. **61**: p. 129-133.
192. Nagy, G., R. Nagy, A. Székely, N. Németh, M. Sasvári-Székely, and A. Somogyi, *Protective role of the rare genetic variant of the Hypoxia inducible factor-1 alpha*

(HIF1a) in type 2 and type 1 diabetes, in *The European Association for the Study of Diabetes Abstract Volume 44th Annual Meeting*. 2008: Rome. p. p: S126.

193. Gale, E.A. and K.M. Gillespie, *Diabetes and gender*. Diabetologia, 2001. **44**(1): p. 3-15.
194. Blaak, E., *Sex differences in the control of glucose homeostasis*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2008. **11**(4): p. 500-4.
195. Nagy, G., Z. Ronai, A. Somogyi, M. Sasvari-Szekely, O.A. Rahman, A. Mate, T. Varga, and Z. Nemoda, *P2RX7 Gln460Arg polymorphism is associated with depression among diabetic patients*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2008. **32**(8): p. 1884-8.
196. Freeman, H. and R.D. Cox, *Type-2 diabetes: a cocktail of genetic discovery*. Hum Mol Genet, 2006. **15 Spec No 2**: p. R202-9.
197. Redondo, M.J., P.R. Fain, and G.S. Eisenbarth, *Genetics of type 1A diabetes*. Recent Prog Horm Res, 2001. **56**: p. 69-89.
198. Hamer, D. and L. Sirota, *Beware the chopsticks gene*. Mol Psychiatry, 2000. **5**(1): p. 11-3.
199. Grande, M., E. Suarez, R. Vicente, C. Canto, M. Coma, M.M. Tamkun, A. Zorzano, A. Guma, and A. Felipe, *Voltage-dependent K⁺ channel beta subunits in muscle: differential regulation during postnatal development and myogenesis*. J Cell Physiol, 2003. **195**(2): p. 187-93.
200. Xu, J., P.A. Koni, P. Wang, G. Li, L. Kaczmarek, Y. Wu, Y. Li, R.A. Flavell, and G.V. Desir, *The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates energy homeostasis and body weight*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(5): p. 551-9.

201. Xu, J., P. Wang, Y. Li, G. Li, L.K. Kaczmarek, Y. Wu, P.A. Koni, R.A. Flavell, and G.V. Desir, *The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates peripheral insulin sensitivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 3112-7.
202. Tschritter, O., F. Machicao, N. Stefan, S. Schafer, C. Weigert, H. Staiger, C. Spieth, H.U. Haring, and A. Fritsche, *A new variant in the human Kv1.3 gene is associated with low insulin sensitivity and impaired glucose tolerance*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(2): p. 654-8.
203. Wang, G.L. and G.L. Semenza, *General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(9): p. 4304-8.
204. Wang, G.L., B.H. Jiang, E.A. Rue, and G.L. Semenza, *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
205. Silander, K., L.J. Scott, T.T. Valle, K.L. Mohlke, H.M. Stringham, K.R. Wiles, W.L. Duren, K.F. Doheny, E.W. Pugh, P. Chines, N. Narisu, P.P. White, T.E. Fingerlin, A.U. Jackson, C. Li, S. Ghosh, V.L. Magnuson, K. Colby, M.R. Erdos, J.E. Hill, P. Hollstein, K.M. Humphreys, R.A. Kasad, J. Lambert, K.N. Lazaridis, G. Lin, A. Morales-Mena, K. Patzkowski, C. Pfahl, R. Porter, D. Rha, L. Segal, Y.D. Suh, J. Tovar, A. Unni, C. Welch, J.A. Douglas, M.P. Epstein, E.R. Hauser, W. Hagopian, T.A. Buchanan, R.M. Watanabe, R.N. Bergman, J. Tuomilehto, F.S. Collins, and M. Boehnke, *A large set of Finnish affected sibling pair families with type 2 diabetes suggests susceptibility loci on chromosomes 6, 11, and 14*. Diabetes, 2004. **53**(3): p. 821-9.
206. Hlatky, M.A., T. Quertermous, D.B. Boothroyd, J.R. Priest, A.J. Glassford, R.M. Myers, S.P. Fortmann, C. Iribarren, H.K. Tabor, T.L. Assimes, R.J. Tibshirani, and A.S. Go, *Polymorphisms in hypoxia inducible factor 1 and the initial clinical presentation of coronary disease*. Am Heart J, 2007. **154**(6): p. 1035-42.

207. Clifford, S.C., D. Astuti, L. Hooper, P.H. Maxwell, P.J. Ratcliffe, and E.R. Maher, *The pVHL-associated SCF ubiquitin ligase complex: molecular genetic analysis of elongin B and C, Rbx1 and HIF-1alpha in renal cell carcinoma*. *Oncogene*, 2001. **20**(36): p. 5067-74.
208. Percy, M.J., S.M. Mooney, M.F. McMullin, A. Flores, T.R. Lappin, and F.S. Lee, *A common polymorphism in the oxygen-dependent degradation (ODD) domain of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) does not impair Pro-564 hydroxylation*. *Mol Cancer*, 2003. **2**: p. 31.
209. Tanimoto, K., K. Yoshiga, H. Eguchi, M. Kaneyasu, K. Ukon, T. Kumazaki, N. Oue, W. Yasui, K. Imai, K. Nakachi, L. Poellinger, and M. Nishiyama, *Hypoxia-inducible factor-1alpha polymorphisms associated with enhanced transactivation capacity, implying clinical significance*. *Carcinogenesis*, 2003. **24**(11): p. 1779-83.
210. Fu, X.S., E. Choi, G.J. Bubley, and S.P. Balk, *Identification of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) polymorphism as a mutation in prostate cancer that prevents normoxia-induced degradation*. *Prostate*, 2005. **63**(3): p. 215-21.
211. Liu, Y., S.R. Cox, T. Morita, and S. Kourembanas, *Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer*. *Circ Res*, 1995. **77**(3): p. 638-43.
212. Forsythe, J.A., B.H. Jiang, N.V. Iyer, F. Agani, S.W. Leung, R.D. Koos, and G.L. Semenza, *Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(9): p. 4604-13.
213. Pages, G. and J. Pouyssegur, *Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene--a concert of activating factors*. *Cardiovasc Res*, 2005. **65**(3): p. 564-73.
214. Stagner, J., S. Mokshagundam, K. Wyler, E. Samols, H. Rilo, M. Stagner, L. Parthasarathy, and R. Parthasarathy, *Beta-cell sparing in transplanted islets by vascular endothelial growth factor*. *Transplant Proc*, 2004. **36**(4): p. 1178-80.

215. Zhang, N., A. Richter, J. Suriawinata, S. Harbaran, J. Altomonte, L. Cong, H. Zhang, K. Song, M. Meseck, J. Bromberg, and H. Dong, *Elevated vascular endothelial growth factor production in islets improves islet graft vascularization*. Diabetes, 2004. **53**(4): p. 963-70.
216. Lammert, E., O. Cleaver, and D. Melton, *Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels*. Science, 2001. **294**(5542): p. 564-7.
217. Del Bo, R., M. Scarlato, S. Ghezzi, A. Maestroni, L. Sjolind, C. Forsblom, M. Wessman, P.H. Groop, G.P. Comi, N. Bresolin, L. Luzi, and G. Zerbini, *VEGF gene variability and type 1 diabetes: evidence for a protective role*. Immunogenetics, 2006. **58**(2-3): p. 107-12.
218. Wilkin, T.J., *The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between Type I and Type II diabetes*. Diabetologia, 2001. **44**(7): p. 914-22.
219. Atkinson, M.A. and G.S. Eisenbarth, *Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment*. Lancet, 2001. **358**(9277): p. 221-9.
220. Dahlquist, G., L. Blom, T. Tuvemo, L. Nystrom, A. Sandstrom, and S. Wall, *The Swedish childhood diabetes study--results from a nine year case register and a one year case-referent study indicating that type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus is associated with both type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and autoimmune disorders*. Diabetologia, 1989. **32**(1): p. 2-6.
221. Li, H., E. Lindholm, P. Almgren, A. Gustafsson, C. Forsblom, L. Groop, and T. Tuomi, *Possible human leukocyte antigen-mediated genetic interaction between type 1 and type 2 Diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(2): p. 574-82.
222. Galanakis, E., D. Kofteridis, K. Stratigi, E. Petraki, V. Vazgiourakis, E. Fragouli, D. Mamoulakis, D.T. Boumpas, and G.N. Goulielmos, *Intron 4 a/b polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with both type 1 and type 2*

- diabetes in a genetically homogeneous population.* Hum Immunol, 2008. **69**(4-5): p. 279-83.
223. Johansen, A., D.P. Jensen, R. Bergholdt, H.B. Mortensen, F. Pociot, J. Nerup, T. Hansen, and O. Pedersen, *IRS1, KCNJ11, PPARGgamma2 and HNF-1alpha: do amino acid polymorphisms in these candidate genes support a shared aetiology between type 1 and type 2 diabetes?* Diabetes Obes Metab, 2006. **8**(1): p. 75-82.
 224. Kraus, M.R., O. Al-Taie, A. Schafer, M. Pfersdorff, K.-P. Lesch, and M. Scheurlen, *Serotonin-1A receptor gene HTR1A variation predicts interferon-induced depression in chronic hepatitis C.* Gastroenterology, 2007. **132**(4): p. 1279-86.
 225. Herrmann, C., *International experiences with the Hospital Anxiety and Depression Scale-A review of validation data and clinical results.* Journal of Psychosomatic Research, 1997. **42**(1): p. 17-41.
 226. Binder, D.K. and H.E. Scharfman, *Brain-derived neurotrophic factor.* Growth Factors, 2004. **22**(3): p. 123-31.
 227. Acheson, A., J.C. Conover, J.P. Fandl, T.M. DeChiara, M. Russell, A. Thadani, S.P. Squinto, G.D. Yancopoulos, and R.M. Lindsay, *A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death.* Nature, 1995. **374**(6521): p. 450-3.
 228. Warner-Schmidt, J.L. and R.S. Duman, *Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment.* Hippocampus, 2006. **16**(3): p. 239-49.
 229. Gratacos, M., J.R. Gonzalez, J.M. Mercader, R. de Cid, M. Urretavizcaya, and X. Estivill, *Brain-derived neurotrophic factor Val66Met and psychiatric disorders: meta-analysis of case-control studies confirm association to substance-related disorders, eating disorders, and schizophrenia.* Biol Psychiatry, 2007. **61**(7): p. 911-22.
 230. Schiepers, O.J., M.C. Wichers, and M. Maes, *Cytokines and major depression.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2005. **29**(2): p. 201-17.

231. Skaper, S.D., P. Debetto, and P. Giusti, *The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders*. FASEB J. **24**(2): p. 337-45.
232. Basso, A.M., N.A. Bratcher, R.R. Harris, M.F. Jarvis, M.W. Decker, and L.E. Rueter, *Behavioral profile of P2X7 receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: relevance for neuropsychiatric disorders*. Behav Brain Res, 2009. **198**(1): p. 83-90.
233. Denlinger, L.C., G. Angelini, K. Schell, D.N. Green, A.G. Guadarrama, U. Prabhu, D.B. Coursin, P.J. Bertics, and K. Hogan, *Detection of human P2X7 nucleotide receptor polymorphisms by a novel monocyte pore assay predictive of alterations in lipopolysaccharide-induced cytokine production*. J Immunol, 2005. **174**(7): p. 4424-31.
234. Denlinger, L.C., D.B. Coursin, K. Schell, G. Angelini, D.N. Green, A.G. Guadarrama, J. Halsey, U. Prabhu, K.J. Hogan, and P.J. Bertics, *Human P2X7 pore function predicts allele linkage disequilibrium*. Clin Chem, 2006. **52**(6): p. 995-1004.
235. Barden, N., M. Harvey, B. Gagne, E. Shink, M. Tremblay, C. Raymond, M. Labbe, A. Villeneuve, D. Rochette, L. Bordeleau, H. Stadler, F. Holsboer, and B. Muller-Myhsok, *Analysis of single nucleotide polymorphisms in genes in the chromosome 12Q24.31 region points to P2RX7 as a susceptibility gene to bipolar affective disorder*. American Journal of Medical Genetics Part B, Neuropsychiatric Genetics, 2006. **141**(4): p. 374-382.
236. McQuillin, A., N.J. Bass, K. Choudhury, V. Puri, M. Kosmin, J. Lawrence, D. Curtis, and H.M. Gurling, *Case-control studies show that a non-conservative amino-acid change from a glutamine to arginine in the P2RX7 purinergic receptor protein is associated with both bipolar- and unipolar-affective disorders*. Mol Psychiatry, 2009. **14**(6): p. 614-20.
237. Hejjas, K., A. Szekely, E. Domotor, and a. Et, *Association between depression and the Gln460Arg polymorphism of P2RX7 gene: a dimensional approach*. Submitted to Am J Med Genet B, 2008.

238. Risch, S.C. and C.B. Nemeroff, *Neurochemical alterations of serotonergic neuronal systems in depression*. J Clin Psychiatry, 1992. **53 Suppl**: p. 3-7.
239. Jans, L.A., W.J. Riedel, C.R. Markus, and A. Blokland, *Serotonergic vulnerability and depression: assumptions, experimental evidence and implications*. Mol Psychiatry, 2007. **12**(6): p. 522-43.
240. Lotrich, F.E. and B.G. Pollock, *Meta-analysis of serotonin transporter polymorphisms and affective disorders*. Psychiatric Genetics, 2004. **14**(3): p. 121-129.
241. Levinson, D.F., *The genetics of depression: a review*. Biological Psychiatry, 2006. **60**(2): p. 84-92.
242. Gillespie, N.A., J.B. Whitfield, B. Williams, A.C. Heath, and N.G. Martin, *The relationship between stressful life events, the serotonin transporter (5-HTTLPR) genotype and major depression*. Psychol Med, 2005. **35**(1): p. 101-11.
243. Willis-Owen, S.A., M.G. Turri, M.R. Munafo, P.G. Surtees, N.W. Wainwright, R.D. Brixey, and J. Flint, *The serotonin transporter length polymorphism, neuroticism, and depression: a comprehensive assessment of association*. Biol Psychiatry, 2005. **58**(6): p. 451-6.
244. Surtees, P.G., N.W. Wainwright, S.A. Willis-Owen, R. Luben, N.E. Day, and J. Flint, *Social adversity, the serotonin transporter (5-HTTLPR) polymorphism and major depressive disorder*. Biol Psychiatry, 2006. **59**(3): p. 224-9.
245. Armbruster, D., A. Mueller, A. Strobel, C. Kirschbaum, K.P. Lesch, and B. Brocke, *Influence of functional tryptophan hydroxylase 2 gene variation and sex on the startle response in children, young adults, and older adults*. Biol Psychol, 2009. **83**(3): p. 214-21.

246. Inoue, H., H. Yamasue, M. Tochigi, K. Takei, M. Suga, O. Abe, H. Yamada, M.A. Rogers, S. Aoki, T. Sasaki, and K. Kasai, *Effect of tryptophan hydroxylase-2 gene variants on amygdalar and hippocampal volumes*. Brain Res, 2010. **1331**: p. 51-7.
247. Reuter, M., Y. Kuepper, and J. Hennig, *Association between a polymorphism in the promoter region of the TPH2 gene and the personality trait of harm avoidance*. Int J Neuropsychopharmacol, 2007. **10**(3): p. 401-4.
248. Yoon, H.K. and Y.K. Kim, *TPH2 -703G/T SNP may have important effect on susceptibility to suicidal behavior in major depression*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2009. **33**(3): p. 403-9.
249. Kim, Y.K., H.J. Lee, J.C. Yang, J.A. Hwang, and H.K. Yoon, *A tryptophan hydroxylase 2 gene polymorphism is associated with panic disorder*. Behav Genet, 2009. **39**(2): p. 170-5.
250. Canli, T., E. Congdon, L. Gutknecht, R.T. Constable, and K.P. Lesch, *Amygdala responsiveness is modulated by tryptophan hydroxylase-2 gene variation*. J Neural Transm, 2005. **112**(11): p. 1479-85.
251. Lustman, P., R. Carney, and H. Amado, *Acute stress and metabolism in diabetes*. Diabetes care, 1981. **4**(6): p. 658-659