doi:10.14753/SE.2013.1801

Genetikai faktorok szerepe a diabétesz fenotípus kialakításában

Doktori tézisek

DR. LUKÁCS KRISZTINA

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezetők:

DR. MADÁCSY LÁSZLÓ egyetemi tanár, az orvostudományok doktora

DR. HOSSZÚFALUSI NÓRA egyetemi docens, Ph.D.

Hivatalos bírálók:

Dr. Gerő László egyetemi tanár, az orvostudományok doktora

Dr. Halmos Tamás egyetemi tanár, az orvostudományok doktora

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Füst György egyetemi tanár, az orvostudományok doktora

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Pánczél Pál egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Fövényi József főorvos, Ph.D.

Budapest

2012

doi:10.14753/SE.2013.1801

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE **3**
ANYAG- ÉS ESZKÖZLISTA **6**
ÁBRÁK JEGYZÉKE **7**
TÁBLÁZOK JEGYZÉKE **8**
1. BEVEZETÉS **9**
1.1. Monogénes és komplex betegségek **9**
1.2. Genetikai vizsgálatok **10**
1.2.1. Kapcsoltsági vizsgálatok 11
1.2.2. Asszociációs vizsgálatok 12
1.2.3. Teljes genom asszociációs vizsgálatok 13
1.3. A XXI. század legjelentősebb komplex betegsége: a diabétesz **14**
1.3.1. Az 1-es típusú diabétesz 15
1.3.1.1. A béta-sejt specifikus autoimmunitás jellemzői 16
1.3.1.2. A béta-sejt pusztulás mechanizmusa 18
1.3.1.3. A genetikai faktorok szerepe 20
1.3.1.4. A környezeti tényezők szerepe 22
1.3.2. A felnőttkori látens autoimmun diabétesz 24
1.3.3. A 2-es típusú diabétesz 25
1.3.3.1. Az inzulinrezisztencia 26
1.3.3.2. Az inzulinszekréció zavara 27
1.3.3.3. A genetikai faktorok szerepe 30
1.3.3.4. A környezeti tényezők szerepe 31
1.3.4. A *folyamatos diabétesz spektrum* elmélete 33
1.4. Minor és major genetikai faktorok diabéteszben **35**
1.4.1. Az 1-es típusú diabétesz általam vizsgált genetikai faktorai 35
1.4.1.1. *PTPN22* gén 35
1.4.1.2. *INS* gén 37
1.4.1.3. *CTLA4* gén 40
1.4.1.4. *HLA* génrégió 42
1.4.1.5. Az 1-es típusú diabéteszre hajlamosító gének közötti kölcsönhatás 44

doi:10.14753/SE.2013.1801

1.4.2. A 2-es típusú diabétesz általam vizsgált genetikai faktorai 45
1.4.2.1. *TCF7L2* gén 45
1.4.2.2. *PPARG* gén 47
1.4.2.3. *CDKN2A/2B gén* 49
1.4.2.5. A 2-es típusú diabéteszre hajlamosító gének közötti kölcsönhatás 50
2. CÉLKITŰZÉSEK 51
2.1. Rövid összefoglalás 51
2.2. A vizsgálatok részletes ismertetése 51
3. MÓDSZEREK 54
3.1. A vizsgált populáció jellemzői 54
3.1.1. Betegek és diagnosztikai kritériumok 54
3.1.2. Kontrollok 55
3.1.3. Klinikai adatok 56
3.1.4. Vizsgálati körülmények 57
3.2. Genetikai vizsgálatok 57
3.3.1. DNS izolálás 57
3.3.2. DNS kvantitálás 58
3.3.3. Genotipizálás 59
3.3.3.1. TaqMan Assay 59
3.3.3.2. DELFIA Assay 64
3.3. Statisztikai analízis 68
4. EREDMÉNYEK 69
5. MEGBESZÉLÉS 89
6. KÖVETKEZTETÉSEK 102
7. ÖSSZEFOGLALÁS 105
8. SUMMARY 106
9. IRODALOMJEGYZÉK 107
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE 123
10.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk 123
10.2. A disszertációtól független közlemények 124
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 125

doi:10.14753/SE.2013.1801

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE:

A dolgozatban szereplő humán gének és genetikai kifejezések rövidítései	
A	adenin
***ADIPOQ* gén**	adiponektin gén (3q27)
C	citozin
***CDKLA-1* gén**	ciklin-dependens kináz like-A 1 gén (6p22.3)
***CDKN2A/2B* gén**	ciklin-dependens kináz inhibitor 2A és 2B gén (9p21)
Chr.	kromoszóma
***CLEC16A* gén**	C-típusú lektin domén 16-os család, A tag gén (16p13.13)
CpG sziget	guanin-citozin gazdag szekvencia a promóter régió környékén
***CTLA4* gén**	citotoxikus T-limfocita asszociált antigén 4 gén (2q33)
DNS	dezixiribonukleinsav
***ENPP1* gén**	ektonukleotid pirofoszfatáz 1 gén (6q22-q23)
F1/F2	első/második utódnemzedék
***FTO* gén**	zsírtömeg és obezitás asszociálta gén (16q12.2)
G	guanin
***GCK* gén**	glükokináz gén (7p15.3-p15.1)
***GLUT4* gén**	glükóztranszporter 4 gén (17p13)
GWAS	teljes genom asszociációs vizsgálatok
***HNF1A* gén**	hepatocita nukleáris faktor 1-alfa gén (12q24.2)
***HNF4A* gén**	hepatocita nukleáris faktor 4-alfa gén (20q13.12)
HWE	Hardy-Weinberg equilibrium
***IFIH1* gén**	interferon indukálta helikáz 1 gén (2q24)
***IL2RA* gén**	interleukin 2 receptor alfa gén (10p15-p14)
***IRS1* gén**	inzulin receptor szubsztrát 1 gén (2q36)
***HLA* génrégió**	humán leukocita antigén génrégió (6p21.3)
***KCNJ11* gén**	befelé egyenirányító kálium-csatorna, J alcsalád, 11-es tag (11p15.1)
LD	kapcsoltsági egyensúlytalanság
OMIM	Mendeli Öröklődés Emberben program adatbázisa, online verzió
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex
***MTNR1B* gén**	melatonin receptor 1B (11q21-q22)
p	kromoszóma rövid karja
***PPARG* gén**	peroxiszóma proliferációt aktiváló receptor gamma gén (3p25)
***PTPN2* gén**	protein tirozin-foszfatáz non-receptor 2 gén (18p11.3-p11.2)
***PTPN22* gén**	protein tirozin-foszfatáz non-receptor 22 gén (1p13.2)
q	kromoszóma hosszú karja
RNS	ribonukleinsav
SLC30A8 gén	cink transzporter 8 gén (8q24.11)
SNP	egypontos nukleotid polimorfizmus
T	timin
***TCF7L2* gén**	T-sejt specifikus transzkripciós faktor 4 (10q25.3)
VNTR	változó számú ismétlődések

doi:10.14753/SE.2013.1801

A dolgozatban szereplő egyéb rövidítések	
ADA	Amerikai Diabétesz Társaság
ADP	adenozin-difoszfát
Ala (A)	alanin
ANCOVA	kovariancia analízis
anti-TPO	tireoperoxidáz elleni antitest
APC	antigén prezentáló sejt
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
BMI	testtömeg-index
Ca	kálcium
CI	konfidencia intervallum
COOH	karboxilcsoport
CRP	C-reaktív protein
DCCT	Diabétesz Kontroll és Szövődmények Tanulmány (USA, Kanada, 1983-1993)
DELFIA	disszociáció erősített lanthanoid fluoro-immunoassay
DIPP	1-es típusú Diabétesz Predikciós és Prevenciós Projekt (Finnország, 1994)
ETT TUKEB	Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága
Eu	európium
EURODIAB	kutatói hálózat, mely 1988-ban alakult Európában a gyermekkori 1-es típusú diabétesz epidemiológiájának tanulmányozására
ex/em	excitációs és emissziós hullámhossz
FATP	zsírsav-transzportáló protein
FFA	szabad zsírsav
FRIP	korai inzulinválasz
FT3	szabad trijód-tironin
FT4	szabad tiroxin
GAD65	glutaminsav-dekarboxiláz 65 kDa molekulatömegű izoforma
GADA	glutaminsav-dekarboxiláz elleni antitest
Gln (Q)	glutamin
GLP-1	glükagon-szerű peptid 1
GLUT-2/4	glükóz transzporter 2/4
HbA_{1c}	glikált hemoglobin A_{1C}
IA-2A	tirozin-foszfatáz elleni antitest
IAA	inzulin elleni antitest
IAPP	sziget amiloid polipeptid (amilin)
ICA	szigetsejt elleni citoplazmatikus antitest
IDDM	inzulindependens diabétesz mellitusz
IFG	csökkent glükóztolerancia stádiuma
IGF2	inzulinszerű növekedési faktor 2
IgG/M	immunglobulin G/M
IGT	emelkedett éhomi vércukor stádiuma
IL-1/2/6/10	interleukin-1/2/6/10
INF-β/ γ	interferon béta/gamma
IPF-1	inzulin promóter faktor 1
IVGTT	intravénás glükóztolerancia-teszt
K	kálium
LADA	felnőttkori látens autoimmun diabétesz
Leu (L)	leucin
MAF	minor allél frekvencia
Met (M)	metionin

doi:10.14753/SE.2013.1801

MODY	fiataloknál jelentkező felnőtt diabétesz
n	esetszám
NH2	aminocsoport
NK-sejt	természetes ölősejt
NO	nitrogén-monoxid
OR	esélyhányados
OVSZ	Országos Vérellátó Szolgálat
p	szignifikancia
PAR	populációs járulékos kockázati hányad
PCR	polimeráz láncreakció
Pro (P)	prolin
RF	reumatoid faktor
rpm	fordulatszám/perc (revolution per minute, r/min)
RR	relatív rizikó
SD	standard deviáció
siRNS	kis interferáló RNS
Sm	szamárium
T1DM	1-es típusú diabétesz
T2DM	2-es típusú diabétesz
Tb	terbium
TCR	T-sejt receptor
TG	tireoglobulin
TNF-α	tumor nekrózis faktor alfa
TRAb	TSH-receptor elleni antitest
TRF	időfelbontott fluoreszcenciás mérés
Trp (W)	triptofán
TSH	tireoidea stimuláló hormon
Tyr (Y)	tirozin
UCP	szétkapcsoló fehérje
Val (V)	valin
We	vörösvértest-süllyedés
WHO	Egészségügyi Világszervezet
ZnT8	cinktranszporter elleni antitest

doi:10.14753/SE.2013.1801

ANYAG- ÉS ESZKÖZLISTA

JEL	ANYAG/ESZKÖZ	GYÁRTÓ/FOGALMAZÓ
1	**ROTANTA 460R centrifuga**	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Németország
2	**BIOFUGEPICO cetrifuga**	Heraeus, Wehrheim, Németország
3	**DRI BLOCK DB3 száraz inkubátor**	Techne, Princeton, USA
4	**Haemosol solution**	Haeo-Sol Inc., Baltimore, USA
5	**Proteinase-K**	Sigma-Aldrich, USA (Prod.No. 124568-01000)
6	**Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit**	Molecular Probes, Invitrogen USA
7	**DELFIA PLATESHAKE**	PerkinElmer Life Sciences, Wallac Oy, Turku, Finnország (Prod.No. 1296-003/004)
8	**CHAMELEON MULTILABEL DETECTION PLATFORM PLATEREADER**	Hidex, Turku, Finnország
9	**ThermoFast® 96 skirted plate**	ABgene, Epsom, UK (Prod.No. AB-0800/K, black)
10	**Microseal-A film**	Biorad, Hercules, CA, USA (Prod.No. MSA5001)
11	**DNA ENGINE DYAD® DELIER THERMAL CYCLER**	BioRad, Hercules, CA, USA
12	**Taq polimeráz**	HyTest Ltd., Turku, Finnország (Prod.No. 7T1)
13	**Assay Buffer**	HyTest Ltd., Turku, Finnország (Prod.No. 1244-111)
14	**dNTP mix**	Fermentas Inc., Helsingborg, Svédország (Prod.No. R0182)
15	**DQB1 primerek**	ThermoElectron GmbH, Ulm, Németország
16	**DELFIA Streptavidin Microtitration Stripts**	PerkinElmer Life Sciences, Wallac Oy,Turku, Finnország (Prod.No. 4009-0010)
17	**Hybridization Buffer**	PerkinElmer Life Sciences, Wallac Oy, Turku, Finnország (Prod.No. 4006-0010)
18	**DELFIA PLATEWASH**	PerkinElmer Life Sciences, Wallac Oy, Turku, Finnország (Prod.No. 1296-026)
19	**Lanthanoid alapú oligonukleotid próbák**	ThermoElectron GmbH, Ulm, Németország
20	**DELFIA Enhancement Solution**	PerkinElmer Life Sciences, Wallac Oy, Turku, Finnország (Prod.No. 1244-105)
21	**DELFIA Enhancer**	PerkinElmer Life Sciences, Wallac Oy, Turku, Finnország (Prod.No. C500-100)
22	**TaqMan® SNP Genotyping Assay**	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
23	**SPSS for Windows® 17.0 verzió**	SPSS Inc., Chicago, IL, USA

doi:10.14753/SE.2013.1801

ÁBRÁK JEGYZÉKE

ÁBRA	OLDAL	FORRÁS
1. ábra	15. oldal	*Diabetes care*, 2012. 35 Suppl 1: p. S64-71.
2. ábra	17. oldal	ImagesMD, www.lib.sote.hu
3. ábra	18. oldal	ImagesMD, www.lib.sote.hu
4. ábra	19. oldal	ImagesMD, www.lib.sote.hu
5. ábra	20. oldal	www.t1dbase.org
6. ábra	28. oldal	www.medicinexplained.blogspot.com
7. ábra	31. oldal	McCarthy, M.I. (2010) *The New England journal of medicine*, 363(24): p. 2339-50.
8. ábra	36. oldal	-
9. ábra	36. oldal	-
10. ábra	37. oldal	Vang, T. et al. (2007) *Autoimmunity*, 40(6): 453–461
11. ábra	38. oldal	Mehra, NK. et al. (2007) *Indian J Med Res*, 125(3): 321-44
12. ábra	41. oldal	Rudd, CE. (2008) *Nature Reviews Immunology*, (8), 153-160
13. ábra	42. oldal	ImagesMD, www.lib.sote.hu
14. ábra	44. oldal	ImagesMD, www.lib.sote.hu
15. ábra	46. oldal	Gloyn, A.L. et al. (2009) *Diabetes*, 58(4): p. 800-2.
16. ábra	48. oldal	Stumvoll, M. and H. Haring (2002) *Diabetes*, 51(8): p. 2341-7.
17. ábra	50. oldal	McCarthy, M.I. (2010) *The New England journal of medicine*, 363(24): p. 2339-50.
18. ábra	59. oldal	-
19. ábra	60. oldal	www.servicexs.com
20. ábra	63. oldal	-
21. ábra	64. oldal	www.perkinelmer.com
22. ábra	72. oldal	Lukacs, K. et al (2012) *Diabetologia*, 55(3):689-93.
23. ábra	72. oldal	-
24. ábra	73. oldal	-
25. ábra	75. oldal	-
26. ábra	77. oldal	-
27. ábra	78. oldal	-
28. ábra	79. oldal	-
29. ábra	80. oldal	Lukacs, K. et al (2012) *Diabetologia Hungarica*, 20(3): 207-215
30. ábra	82. oldal	Lukacs, K. et al (2012) *Diabetologia Hungarica*, 20(3): 207-215
31. ábra	84. oldal	-
32. ábra	85. oldal	-

doi:10.14753/SE.2013.1801

TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

TÁBLÁZAT	OLDAL	CÍM
1. táblázat	21. oldal	Az 1-es típusú diabétesz családi halmozódása
2. táblázat	43. oldal	T1DM kialakulását befolyásoló *HLA* haplotípusok
3. táblázat	55. oldal	A vizsgálatokba bevont beteg- és kontrollpopulációk
4. táblázat	58. oldal	A DNS izolálás során használt oldatok összetétele
5. táblázat	61. oldal	A különböző térfogatú PCR reakció elegyek összetétele
6. a táblázat	62. oldal	A PCR reakciók körülményei az 1-es típusú diabétesz-asszociált gének esetén
6. b táblázat	62. oldal	A PCR reakciók körülményei a 2-es típusú diabétesz-asszociált gének esetén
7. a táblázat	64. oldal	Az alkalmazott primerek
7. b táblázat	65. oldal	A *HLA DQB1* PCR reakcióelegy
8. a táblázat	66. oldal	A hibridizáció során használt oldatok összetétele
8. b táblázat	66. oldal	A hibridizáló oldatok
8. c táblázat	66. oldal	Az alkalmazott lanthanoid alapú oligonukleotid próbák jellemzői
9. táblázat	67. oldal	A lanthanoidák fluoreszcens jellemzői
10. táblázat	69. oldal	A magyar beteg- és kontrollcsoportok jellemzői
11. táblázat	70. oldal	A 2-es típusú diabéteszre hajlamosító génlókuszok kapcsolata a felnőttkori látens autoimmun diabétesszel a magyar populációban
12. táblázat	71. oldal	A metaanalízisben szereplő beteg- és kontrollcsoportok jellemzői
13. táblázat	74. oldal	A *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmus és testtömeg-index közötti kapcsolat a felnőttkori látens autoimmun és az 1-es típusú diabéteszes betegekben, a magyar populációban
14. táblázat	75. oldal	A magyar beteg- és kontrollcsoport jellemzői
15. táblázat	76. oldal	A *TCF7L2*, a *CDKN2A/2B* és a *PPARG* gének kapcsolata a 2-es típusú cukorbetegséggel a magyar populációban
16. táblázat	78. oldal	A *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmus és testtömeg-index közötti kapcsolat 2-es típusú diabéteszes betegekben, a magyar populációban
17. táblázat	80. oldal	A metaanalízisben szereplő beteg- és kontrollcsoportok jellemzői
18. táblázat	83. oldal	A *PTPN22* gén C1858T polimorfizmus és az 1-es típusú diabétesz kapcsolata a magyar populációban
19. a táblázat	84. oldal	A *PTPN22* C1858T genotípusok és klinikai adatok kapcsolata
19. b táblázat	85. oldal	A *PTPN22* C1858T genotípusok és klinikai adatok kapcsolata
20. táblázat	86. oldal	Az *INS* gén -23HphI polimorfizmus és az 1-es típusú diabétesz kapcsolata a magyar populációban
21. táblázat	86. oldal	Az *INS* -23HphI genotípusok és klinikai adatok kapcsolata
22. táblázat	87. oldal	Az autoimmun betegségek diagnózisát megalapozó klinikai vizsgálatok eredményei

doi:10.14753/SE.2013.1801

1. BEVEZETÉS

1.1. MONOGÉNES ÉS KOMPLEX BETEGSÉGEK

A humán betegségeket genetikai hátterük alapján csoportosítva **monogénes** és **poligénes kórképeket** különíthetünk el.

A **monogénes betegségeket** egy gén defektusa és általában egy fehérje hibája okozza, az öröklődési mintázatuk a hagyományos mendeli főszabályokat követi, azaz

- az *uniformitás (hasonlóság) szabálya* szerint az első hibridnemzedék (F1) valamennyi egyede fenotípusában és genotípusában is egyforma. A fenotípust a domináns-recesszív öröklésmenetben a domináns, az intermedier öröklésmenetben az intermedier tulajdonság határozza meg.
- a *szegregáció (hasadás) szabálya* szerint, ha eltérő genotípusú homozigóta szülőket keresztezünk, az első utódnemzedékben a szülői tulajdonságok nem olvadnak össze, hanem ezt a nemzedéket (F1) továbbkeresztezve változatlanul megjelennek a második utódnemzedékben (F2).

A monogénes betegségek esetén a genetikai variáns adta egyéni rizikó nagyon nagy, ám a variáns ritkaságából adódóan a teljes populációs hatás minimális. Ezen betegségek esetén, bár gyakoriak a fenotípusos expresszióban a variációk, az oki genetikai variáns és a kórállapot közötti kapcsolat jól meghatározott [1].

Az 1800-as évek közepe óta a kutatók számos, a mendeli szabályokat nem követő öröklési folyamatot fedeztek fel (pl. csökkent penetrancia, változó expresszivitás, poligénes tulajdonságok, gén-gén kölcsönhatások, gén-környezet interakciók) és kiderült, hogy az egyszerű mendeli mintákat követő dominánsan vagy recesszíven öröklődő betegségek csak igen ritkán fordulnak elő [2]. A humán betegségek döntő többsége a poligénes módon öröklődő **komplex vagy multifaktoriális kórképek** közé tartozik. A komplex betegségek több gén hajlamosító allélvariánsának, környezeti faktoroknak és véletlenszerű események kombinációjának eredményeként jönnek létre. Bár vitatott, hogy a poligénes betegségek kialakulásában az alacsony penetranciájú, általános vagy a ritka, nagy penetranciájú alléleknek van-e elsődleges szerepük, az

biztos, hogy az öröklött betegségre hajlamosító génvariánsok csupán a kockázat egy részét képezik a betegség-fenotípus kialakításában. A komplex betegségek esetén a genetikai hajlam azt jelenti, hogy az egyén a populációs átlagot meghaladó kockázattal bír az adott betegség kialakulása szempontjából, de ez nem eredményezi automatikusan az adott betegség-fenotípus kialakulását, hiszen azt alapvetően befolyásolja az egyén életmódja és a környezeti tényezők is. A környezeti és életmódbeli faktorok közül leggyakrabban a táplálkozást, a stresszt, a fertőzéseket és a dohányzást jelölik meg kiváltó tényezőként, és bár ezek tényleges patogenetikai szerepe sokszor kevéssé bizonyított, tapasztalati tény, hogy az életmód és a környezet megváltozatása megelőzheti vagy késleltetheti egy betegség kialakulását [2, 3].

1.2. GENETIKAI VIZSGÁLATOK

A komplex betegségek genetikai hátterének vizsgálata azért kiemelkedően fontos, mert a molekuláris patomechanizmus megismerése révén segíthet kiszűrni a betegségre genetikailag hajlamos embereket és új gyógyszercélpontok azonosítására is lehetőség nyílhat. Ugyanakkor a multifaktoriális betegségek genetikai vizsgálatát számos tényező nehezíti:

- a fenokópia: kizárólag környezeti hatások ugyanazt a klinikai képet eredményezik, mint a genetikai tényezők;
- a pleiotrópia: ugyanaz a mutáció a környezet hatására eltérő fenotípust okoz;
- az allél heterogenitás: különböző allélkombinációk hasonló klinikai képet eredményeznek;
- a lókusz heterogenitás: különböző lókuszon található mutációk ugyanazt a betegséget okozzák;
- az inkomplett penetrancia: a mutáns gén hordozójánál nem alakul ki a betegség.

A genomika megújult eszköztárának felhasználásával világszerte intenzív kutatómunka indult ezen komplex mechanizmusok megértésére, melynek célja az emberi szervezet genetikai kódjának minél teljesebb megismerése. A **Humán Genom**

doi:10.14753/SE.2013.1801

Projekt (1993-2006) főbb eredményei:

- A **humán genom** igen polimorf, 3,2 milliárd ($3{,}2 \times 10^9$) bázispárból [adenin (A), citozin (C), timin (T) és guanin (G)] áll, ugyanakkor a „hasznos információ”, azaz a fehérjéket kódoló 25 000-30 000 gén a genom kevesebb mint 1-2%-át foglalja el. A gének átlagosan 3000 bázispárból állnak és véletlenszerűen koncentrálódnak a nagykiterjedésű nem kódoló DNS szakaszok között.
- Két nem rokon ember genetikai állománya 99,9%-ban azonos, ez 3 millió bázispárnyi különbséget jelent, melyet mutációk és polimorfizmusok képviselnek. A **mutációk** olyan ritka, 1%-nál kisebb gyakoriságú allélváltozatok, melyek általában monogénes öröklődésű betegségeket okoznak. A **genetikai polimorfizmusok** 1%-nál gyakoribb génváltozatok, két fő típusuk az *egypontos nukleotid variációk* [single nucleotide polymorphism (SNP)] és a *változó számú ismétlődések* [variable number of tandem repeats (VNTR)], melyek a poligénes betegségek kialakulásában játszhatnak szerepet. Közel 10 millió olyan SNP van a humán genomban, melyek minor allél frekvenciája nagyobb mint 1%, és ezek képviselik a genetikai variációk 90%-át [4].

1.2.1. KAPCSOLTSÁGI VIZSGÁLATOK (LINKAGE ANALYSES)

A komplex betegségek genetikai hátterének tanulmányozása során alkalmazott első megközelítést a **klasszikus kapcsolatsági vizsgálatok** jelentették. A kapcsoltsági vizsgálatban azt nézik, van-e bizonyíték a betegségre hajlamosító elméleti kromoszómális hely (*lókusz*) és a jelölőhely (*marker*) alléljeinek együttes (kapcsolt) öröklődésére. Olyan családokat vizsgálnak, melyekben legalább két, adott betegségben szenvedő gyermek van. Véletlenszerű öröklődés esetén a testvérek genotípusa egy gén négy (két apai és két anyai) allélja tekintetében 25%-ban mindkét változat azonos, 50%-ban az egyik allél közös, 25%-ban mindkét allél más. Ha a betegséggel sújtott testvérek a betegséggel összefüggésbe hozott marker alléleket ennél nagyobb arányban közösen hordozzák az arra utal, hogy a marker allél és a betegséget okozó lókusz között

kapcsolat lehet. Az adott allél protektív, ha beteg testvérekben a véletlenszerűen vártnál ritkábban fordul elő [5]. Ennek a genomszintű megközelítésnek az az előnye, hogy lehetővé teszi új gének felfedezését, anélkül hogy ismernénk azok funkcióját. Ugyanakkor a módszer hátránya, hogy leginkább akkor eredményes, ha az adott családban több beteg egyén előfordul, ha a genetikai variánsok penetranciája nagy, illetve ha egy gén hibája okozza a betegséget (ez alól kivétel az 1-es típusú diabétesz, mely bár poligénes öröklődésű, a kapcsoltsági vizsgálatok révén több hajlamosító variánst azonosítottak). A kapcsoltsági vizsgálatokat még a sikeres esetekben is - amikor a kapcsolt génrégió megfelelően nagy és sok lehetséges okozati génvariánst tartalmaz - szekvencia analízisnek kell követni [6].

1.2.2. ASSZOCIÁCIÓS VIZSGÁLATOK (ASSOCIATION ANALYSES)

Az **asszociációs analízis** során azt vizsgálják, hogy egy adott *marker lókusz* a betegcsoportban gyakrabban vagy ritkábban fordul-e elő, mint az adott betegségre negatív, nem rokon népességben. Az asszociáció erőssége a *relatív rizikóval* (RR) fejezhető ki: ha az RR>1, akkor hajlamosító, ha az RR<1, védő allélról van szó. Pozitív esetben feltételezhető, hogy a marker és a betegséget okozó lókusz egymással *kapcsoltsági kiegyensúlyozatlanságban* [linkage disequilibrium (LD)] van, azaz a két pozícióban levő allélkombinációk gyakorisága eltér az egyes allélek gyakoriságának szorzatától. Amikor az egyik helyen mutációként kialakul egy allélvariáns, a másik helyen egy meghatározott allél van, így ez a kombináció rögződik, mivel a két lókusz egymáshoz közel helyezkedik el a kromoszómán, köztük a rekombináció valószínűsége alacsony.

Ez a megközelítés már több sikert hozott a komplex betegségek genetikai etiológiájának meghatározásában. Ugyanakkor fő korlátja, hogy előre ki kell választani a vizsgálni kívánt marker lókuszokat, azaz hipotézis-vezérelt a megközelítés [6].

A komplex betegségek genetikai asszociációs vizsgálata során két fő kihívással kell szembenézni: az **igazi és a hamis kapcsolatok megkülönböztetése**, illetve az **oksági viszony bizonyítása**. Az első problémát az allélek alacsony penetranciája okozza, azaz

a legtöbb ilyen allél csak mérsékelten emeli a betegségek kialakulásának kockázatát. A betegségre hajlamosító gének felismerését jelentősen befolyásolja, hogy mekkora az adott allél jelentette betegségrizikó illetve az allél átlagpopulációban észlelt frekvenciája. Az allél gyenge hatása nagyobb mintaméretet követel az asszociációs szignál felismeréséhez, nem ritka, hogy több ezres nagyságrendű esetszám szükséges az asszociációs vizsgálatban a jel háttérzajtól való elkülönítéséhez [1]. A *replikációs vizsgálatok* a kapcsoltsági vizsgálatban tesztelt genetikai variánsok oksági viszonyának igazolására szolgálnak. A komplex betegséggel kapcsolatba hozható variánsok azonosításához nem szükséges mind a tízmillió SNP-t tipizálni, hiszen a genom speciális, nagy sűrűségű területeit és a teljes genom-szűrések eredményeit elemezve világossá vált, hogy az SNP-k alléljei mintákat (ún. *haplotípusokat*) alakítanak ki. A közeli SNP-k alléljei szoros kapcsolatban állnak, ezt a kapcsoltsági kiegyensúlyozatlanságot azonban megtörik a haplotípus-blokkokon belüli *rekombinációs események*. Ezek a rekombinációk azonban nem véletlenszerűen, hanem elsősorban ún. *forrópontokon* fordulnak elő a humán genomban. A haplotípus-szerkezet ismerete lehetővé teszi olyan SNP-halmazok kiválasztását, amelyek hatékonyan informálnak a variációk közös mintázatáról, és ez ráirányíthatja a figyelmet azon jelölt génekre és genomikus régiókra, melyekkel a továbbiakban érdemes asszociációs vizsgálatokat végezni [1].

1.2.3. TELJES GENOM ASSZOCIÁCIÓS VIZSGÁLATOK (GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDIES, GWAS)

Az 1990-es években a genetikai technológia fejlődése lehetővé tette a genetikai markerek mikroszatellita és SNP szintű részletes feltérképezését a teljes humán genom területén [7]. Így napjainkban a komplex betegségek genetikai hátterének tanulmányozásához a **teljes genom asszociációs vizsgálatok** a legmodernebb eszközök.

A GWA vizsgálatok során alkalmazott *DNS-chip* vagy *microarray* technológia lényege, hogy egy üveg- vagy műanyag hordozóra ismert oligonukleotid szekvenciákat aplikálnak és erre viszik rá a betegmintákból származó, feldarabolt és jelzett nukleinsavdarabokat. A lemezhez kötődött, jelzett nukleotidok nagy felbontású

leolvasása után a jelek intenzitásából becsülhető, hogy az adott szekvencia a beteg mintájában előfordult-e vagy sem [3]. Az elmúlt években genotípus platformok jöttek létre, ezek lehetővé teszik a teljes genom területén SNP-k százezreinek egyidejű genotipizálását egyetlen chipen. Ezáltal az összes ismert SNP társulása tesztelhető a vizsgált betegséggel kapcsolatban. Fontos felismerés, hogy ezek az SNP-k gyakran nem a tényleges ok-okozati genetikai variánsok, hanem azt a régiót jelölő lókuszok, ahol a valódi ok-okozati variáns elhelyezkedik [3]. A GWA vizsgálatok fő hátránya, hogy a tesztelt variánsok sokasága miatt szigorú statisztikai küszöbértéket kell meghúzni, hogy a kiszűrt genetikai variánsok pozitív eredményt adjanak a hipotézisvizsgálatok tesztelése során is. A statisztikai értékelés során szigorú szignifikancia küszöbértéket alkalmaznak ($p<5x10^{-8}$). Ahhoz, hogy elérjék ezt a szignifikancia szintet - különösen kis hatáserősségű genetikai variánsok esetén - igen nagyszámú vizsgálati alanyra van szükség [6].

1.3. A XXI. SZÁZAD LEGJELENTŐSEBB KOMPLEX BETEGSÉGE: A DIABÉTESZ

A cukorbetegség (diabétesz mellitusz) a XXI. század egyik legjelentősebb komplex betegsége, mely az Egészségügyi Világszervezet (WHO) becslése szerint 2030-ra 366 millió embert érint majd a Földön.

Az i.e. 1550 körülre tehető első leírását követően évszázadokon át egységesnek tartották a kórképet, annak ellenére, hogy a klinikai megfigyelések hamar nyilvánvalóvá tették a diabétesz kettősségét, hiszen egyértelmű volt a különbség a fiatal, vékony, inzulinfüggő betegek és az idősebb, túlsúlyos, gyakran magasvérnyomásban és más artériás betegségben is szenvedő, inzulinpótlás nélkül is életképes betegek között. *Himsworth* 1936-ban kísérletében bizonyította az inzulinérzékeny és az inzulinérzéketlen cukorbetegség típus létezését [8], mégis csak 1951-ben javasolták először az 1-es és a 2-es típusú diabétesz elnevezést. Végül 1976-ban - az autoimmunitás fogalmának felszínre kerülése, a β-sejt elleni antitestek azonosítása, és a fiatalkori cukorbetegség humán leukocita antigénekkel való kapcsolatának felismerése után - fogadták el a *diabétesz heterogenitásának elméletét* [9]. A jelenleg érvényes klasszifikációs szisztéma a WHO által 1998-ban kiadott [10] és az Amerikai Diabétesz

doi:10.14753/SE.2013.1801

Társaság [11] által évente megújított etiológiai besoroláson alapul és négy fő csoportba sorolja a cukorbetegséget: 1-es típusú, 2-es típusú, gesztációs és egyéb speciális diabétesz (1. ábra).

I. Az 1-es típusú diabétesz
A: autoimmun mechanizmusú
B: idiopáthiás
II. A 2-es típusú diabétesz
III. Egyéb speciális diabétesz típusok
A. A béta-sejt-működés genetikai zavarai
1. 12-es kromoszóma, HNF-1a (MODY3)
2. 7-es kromoszóma, glukokinase (MODY2)
3. 20-as kromoszóma, HNF-4a (MODY1)
4. 13-as kromoszóma, insulin promoter factor-1 (IPF-1; MODY4)
5. 17-es kromoszóma, HNF-1b (MODY5)
6. 2-es kromoszóma, NeuroD1 (MODY6)
7. mitokondriális DNS
8. egyéb
B. Az inzulinhatás genetikai zavarai
1. A-típusú inzulin rezisztencia
2. leprechaunismus
3. Rabson-Mendenhall szindróma
4. lipoatrophicus diabétesz
5. egyéb
C. A hasnyálmirigy exokrin részének megbetegedéseihez társuló formák
1. pancreatitis
2. trauma/pancreatectomia
3. neoplasma
4. cysticus fibrosis
5. hemochromatosis
6. fibrocalculous pancreatopathia
7. egyéb
D. Endokrinopátiák
1. acromegalia
2. Cushing szindróma
3. glucagonoma
4. pheochromocytoma
5. hyperthyreosis
6. somatostatinoma
7. aldosteronoma
8. egyéb
IV. Gesztációs diabétesz

E. Gyógyszerek vagy kémiai anyagok kiváltotta típusok
1. vacor (N-3-pyridylmethyl-N'-p-nitrophenyl urea)
2. pentamidine
3. nicotinsav acid
4. glucocorticoidok
5. thyroid hormonok
6. diazoxide
7. béta-adreneg agonisták
8. thiazidok
9. dilantin
10. γ-Interferon
11. egyéb
F. Infekciókhoz társuló diabétesz
1. kongenitális rubeola
2. cytomegalovírus
3. egyéb
G. Az immungenezisű diabétesz szokatlan formái
1. "Stiff-man" szindróma
2. anti-inzulin receptor antitestek
3. egyéb
H. Más, esetenként diabétesszel társuló genetikai szindrómák
1. Down szindróma
2. Klinefelter szindróma
3. Turner szindróma
4. Wolfram szindróma
5. Friedreich ataxia
6. Huntington chorea
7. Laurence-Moon-Biedl szindróma
8. dystrophia myotonica
9. porphyria
10. Prader-Willi szindróma
11. egyéb

1. ábra: A diabétesz etiológiai klasszifikációja (ADA, 2012)

(A továbbiakban csak a kutatásaimban szereplő fő diabétesz típusokkal foglalkozok.)

1.3.1. AZ 1-ES TÍPUSÚ DIABÉTESZ (T1DM)

Az 1-es típusú diabétesz az összes cukorbeteg eset 5-10%-át adja, korábban inzulindependens vagy fiatalkori cukorbetegségnek is nevezték, de mára igazolódott, hogy bármely életkorban kialakulhat. Az etiológiai osztályozás szerint az 1-es típusú

diabétesz két alcsoportra osztható: az autoimmun mechanizmussal kialakuló 1A és az idiopátiás 1B formára. Az **autoimmun mechanizmusú formában** a β-sejtek destrukcióját a genetikailag fogékony egyénekben környezeti faktorok hatására elinduló T-sejt mediált immunfolyamat idézi elő [12]. Az 1-es típusú diabétesz kis hányadát kitevő, eddig döntően afrikai vagy ázsiai származásúaknál leírt **„idiopátiás" formában** nincs immunológiai bizonyíték a β-sejt specifikus autoimmunitásra, és egyéb etiológiai kórok sem igazolható [11].

(A továbbiakban 1-es típusú diabétesz alatt mindig az 1A típusú autoimmun diabétesz formát értem.)

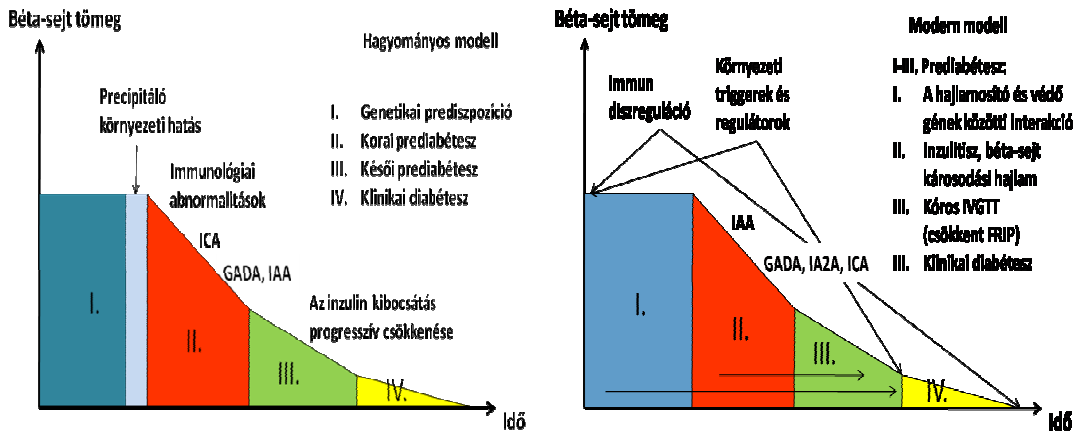
1.3.1.1. A BÉTA-SEJT SPECIFIKUS AUTOIMMUNITÁS JELLEMZŐI

Az 1-es típusú diabétesz kialakulásának **Eisenbarth-féle hagyományos modellje** szerint a patogenezis során négy stádiumot különböztethetünk meg: 1. genetikai prediszpozíció, 2. korai prediabétesz: külső környezeti hatásra az autoimmunitás elindult, immunológiai abnormalitások észlelhetők (inzulitisz, autoantitest pozitivitás), 3. késői prediabétesz: az immunológiai abnormalitásokhoz metabolikus eltérések (pl. csökkent korai inzulinszekréció) társulnak, 4. a cukorbetegség manifesztálódása: a β-sejtek 80-90%-a elpusztult (2. ábra) [13].

A **modern elmélet** kiegészíti és árnyaltabbá teszi a hagyományos modellt a genetikai, immunológia és környezeti faktorok 1-es típusú diabétesz természetes lefolyásában betöltött szerepéről megszerzett újabb ismeretekkel. Eszerint az 1. stádiumra a hajlamosító és védő genetikai faktorok (*HLA* és *nem-HLA*) együttes hatása és ép β-sejttömeg jellemző. A 2. szakaszban – mely bizonyos esetekben már az élet első néhány hónapjában bekövetkezik – a genetikai háttér, az immun-diszreguláció és a környezeti faktorok kölcsönhatásának eredményeként ismételten inzulitisz alakul ki, a genetikai prediszpozíció miatt hibásan szabályozott immunválasz következtében elindul a β-sejt destrukció. Az autoimmunitás jeleként - *a genetikai faktorok által befolyásolt sorrendben* - antitestek jelennek meg a szigetsejt antigénekkel szemben, de a β-sejt diszfunkció klinikailag még nem érzékelhető. A 3. stádiumban a β-sejt tömeg fokozatos csökkenése észlelhető, a progresszió sebessége igen változó, néhány hónaptól évekig

doi:10.14753/SE.2013.1801

terjedhet. A β-sejt diszfunkció első érzékelhető jele az intravénás glükóztolerancia-teszt (IVGTT) kóros eredménye. A 4. szakaszban a kiterjedt β-sejt károsodás jeleként minimális C-peptid koncentráció mérhető, emelkedett vércukorszint és exogén inzulinfüggőség alakul ki. Végül a teljes β-sejt állomány megsemmisül, a C-peptid szint mérhetetlenné válik és a kiégett autoimmun folyamat jeleként az autoantitestek is eltűnnek (2. ábra) [14].



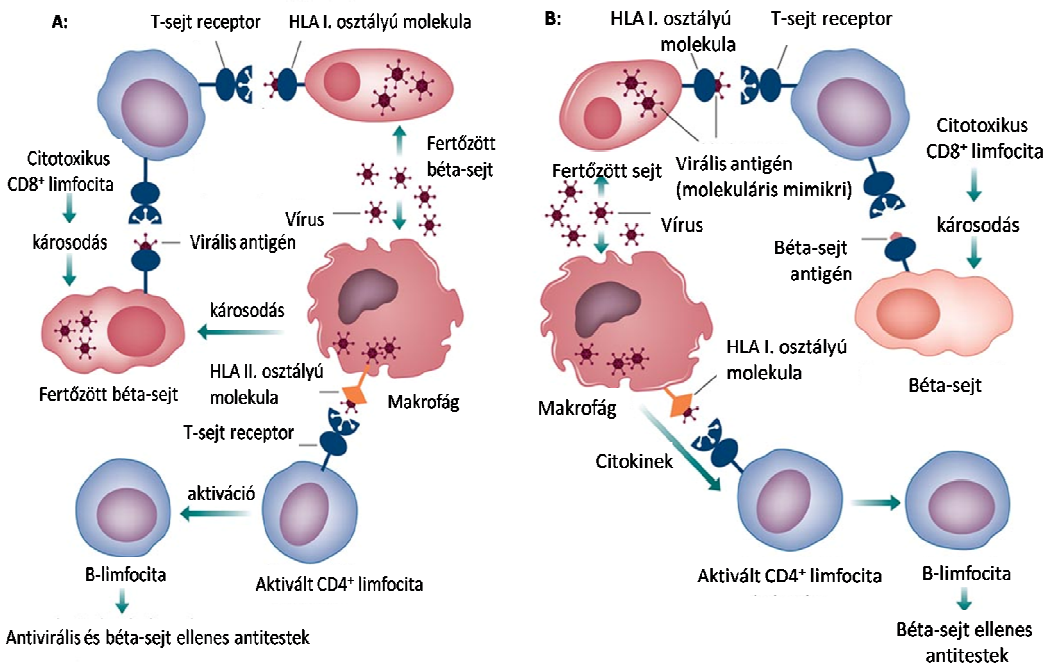
2. ábra: Az 1-es típusú diabétesz patomechanizmusának hagyományos és modern modellje

A patomechanizmus döntően *celluláris* immunfolyamatokra épül, már a prediabéteszes stádiumban kimutatható a perifériás vér limfocitáiban – a T-helper 1 túlsúlyt jelző – INF-γ termelésének dominanciája. A folyamat előrehaladása során a *humorális* immunválasz aktiválódása nyomán – valószínűleg másodlagosan – a hasnyálmirigy β-sejtek antigénjei ellen aktivált B-limfociták termelte autoantitestek jelennek meg a betegek szérumában. A Langerhans-szigetek β-sejtjeinek közvetlen pusztulását valószínűleg aktivált $CD8^+$, citotoxikus T-limfociták okozzák. Bár ez az elmélet állatmodellek alapján született, az emberi T1DM patomechanizmusa valószínűleg nagyon hasonló [15].

doi:10.14753/SE.2013.1801

1.3.1.2. A BÉTA-SEJT PUSZTULÁS MECHANIZMUSA

A T1DM patogenezisének **infektív modellje** szerint az autoimmun folyamat első lépéseként közvetlenül a β-sejteket éri vírusfertőzés, míg a **molekuláris mimikri modell** szerint egy a β-sejt fehérjékhez hasonló aminosav-szekvenciával rendelkező vírussal fertőzött sejt (de nem a β-sejt) ellen indul el a primer immunválasz. A primeren fertőzött vagy vírust fagocitált makrofágok HLA II. osztályú molekuláik révén virális peptideket prezentálnak a $CD4^+$ T-limfociták számára. A $CD4^+$ helper T-sejtek egyrészt elősegítik a $CD8^+$ T-limfociták citotoxikus effektor sejtté válását, másrészt aktiválják a B-sejteket, amelyek autoantitesteket termelnek. A fertőzött sejt felszínén HLA I. osztályú molekulával komplexben virális antigének jelennek meg, melyeket a $CD8^+$ T-limfociták felismernek (3. ábra).

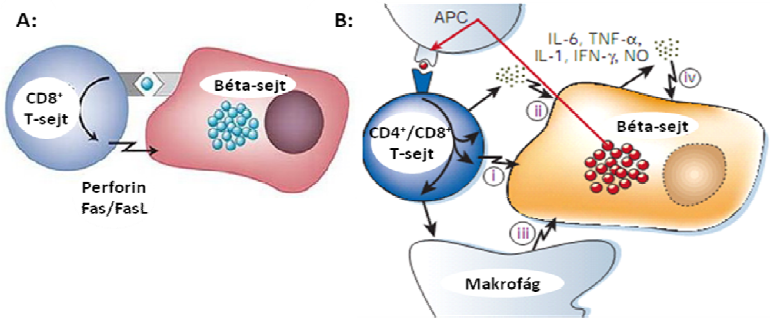


3. ábra: Az 1-es típusú diabétesz patogenezise;
A: infekciós modell és B: molekuláris mimikri modell

A β-sejtek pusztulásának két feltételezett mechanizmusa, a direkt és az indirekt (bystander) killing útvonal. A **direkt β-sejt pusztulás** során az antigén-specifikus $CD8^+$ citotoxikus T-limfociták felismerik a β-sejtek felszínén HLA I. osztályú molekulával

doi:10.14753/SE.2013.1801

komplexben kötött, a virális aminosav szekvenciával rokon autoantigéneket, melynek eredménye bizonyos kostimulátor molekulák (pl. Fas/FasL) felszaporodása. A szignál transzdukciós kaszkád végén bekövetkezik a β-sejtek apoptózis általi pusztulása (4. A ábra). Az **indirekt útvonal** szerint az antigénprezentáló sejtek (makrofágok, dendritikus sejtek) felszínén HLA II. osztályú molekulával komplexben autoantigének prezentálódnak, amiket antigén-specifikus $CD4^+$ helper T-limfociták ismernek fel. Ezt követően a sejtfelszíni receptorok (pl. Fas/FasL) aktiválódnak (4. B ábra I.), a T-sejtekből szolubilis mediátorok (pl. INF-γ, TNF-α, NO) szabadulnak fel (4. B ábra II.), a makrofágok aktiválódása következtében (4. B ábra III.), vagy autokrin hatásra a környező β-sejtek elpusztulnak (4. B ábra IV.) [16].



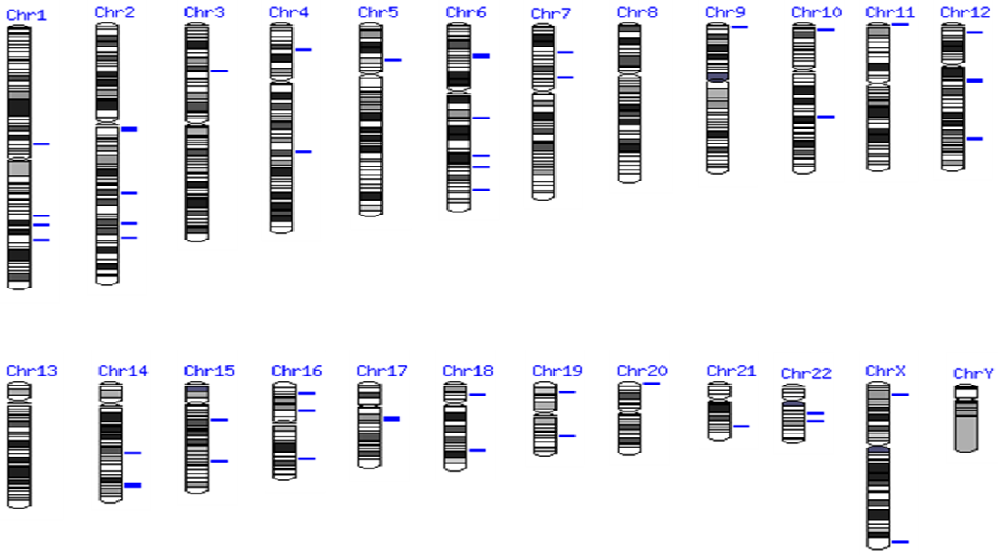
4. ábra: A β-sejt pusztulás feltételezett mechanizmusa
A: direkt, B: indirekt útvonal

Mivel nincs egyértelmű celluláris immunmarker (citokin, T- vagy B-sejt felszíni marker), mely segítené a fenti folyamat korai felismerését, monitorizálását, ezért a jól reprodukálható humorális immunmarkereket, az autoantitesteket használjuk a T1DM kialakulásának megjóslására [17]. Jelenlegi ismereteink szerint a legfontosabb autoantitestek a szigetsejt elleni citoplazmatikus antitest (ICA), a glutaminsav-dekarboxiláz elleni antitest (GADA), az inzulin elleni antitest (IAA), a tirozin-foszfatáz elleni antitest (IA-2A) és a cink transzporter elleni antitest (ZnT8). A magasabb autoantitesttiter és a többszörös autoantitest-pozitivitás nagyobb kockázatot jelent az 1-es típusú diabétesz kialakulására. Továbbra sem tisztázott azonban, hogy az autoantitestek megjelenése másodlagos folyamat, és pusztán a β-sejt destrukció következménye, vagy közvetlenül elősegíti a T-sejt mediált β-sejt pusztulást.

doi:10.14753/SE.2013.1801

1.3.1.3. A GENETIKAI FAKTOROK SZEREPE

Az utóbbi években a teljes genom SNP tipizálási technikák nagy mintaszetten való alkalmazásával a *HLA* mint fő genetikai determináns mellett számos járulékos T1DM-asszociált lókuszt fedeztek fel. Ezzel a teljes genom vizsgálatok és a meta-analízisek eredménye nyomán napjainkra negyvennél is több lókuszról vált bizonyítottá, hogy befolyásolja az 1-es típusú diabétesz iránti hajlamot (5. ábra) [18].



5. ábra: Az 1-es típusú diabétesz hajlamosító genetikai lókuszai

Az eddig azonosított genetikai faktorok mind a sporadikus, mind a familiáris T1DM esetekben szerepet játszanak. Ez a betegségre hajlamosító génvariánsok alacsony penetranciájával függ össze, azaz a hajlamosító allélt hordozóknak csak néhány százalékában alakul ki diabétesz. A major és minor lókuszok együttes hatása adja meg az 1-es típusú diabétesz kialakulására vonatkozó teljes egyéni rizikót, mely az átlagpopulációban alacsony, mindössze 0,05-0,2%, a betegség családi halmozódása esetén azonban két nagyságrenddel nagyobb (1. táblázat) [19].

A genetikai háttér komplexitását felmérve bizonyosnak látszik az is, hogy az immunmediált T1DM patomechanizmusa is heterogén, azaz egyes betegekben alternatív molekuláris útvonalak felelősek a β-sejtek pusztulásáért. Ezért a T1DM

patomechanizmusának megértéséhez alapvető fontosságú felderíteni a *genetikai faktorok* és a *β-sejt specifikus autoimmunitás* megjelenése közötti összefüggést.

1. táblázat: Az 1-es típusú diabétesz családi halmozódása

Családi anamnézis	Az utód T1DM rizikója (%)
T1DM-es apa	5-6
T1DM-es anya	2-3
T1DM-es testvér	2-4
▪ egypetéjű iker	20-50
▪ HLA-identikus	18
▪ HLA-haploidentikus	5-9
▪ HLA-nem-identikus	0,05-0,2

Az 1970-es években több kutatócsoport vizsgálta a *HLA* gének és az 1-es típusú diabétesz közötti kapcsolatot [20, 21]. Feltételezték, hogy a 6p21.3 kromoszómán található, igen polimorf *HLA* régió genetikai variánsai határozzák meg, mely fehérje fragmentek prezentálódnak az immunrendszer számára, ami az autoimmun folyamatok alapjául szolgálhat. Kezdetben a *HLA* I. osztályú, később a *HLA* II. osztályú allélekről sikerült kimutatni, hogy szoros kapcsolatban vannak a T1DM-mel, és a DR4 és DR3 hajlamosító allélek kombinációja (DR3/DR4) jelenti a legnagyobb rizikójú genetikai kombinációt [22]. Később az 1-es típusú diabéteszre vonatkozó kapcsoltsági és asszociációs génvizsgálatok igazolták a betegség *inzulin génnel* való szoros kapcsolatát is [23].

Az 1990-es években a genetikai technológia fejlődése lehetővé tette a teljes genom területén a polimorfizmusok részletes feltérképezését [7]. A szemi-automatizált genotipizáló technológia segítségével lehetővé vált a T1DM-mel asszociált genetikai markerek mikroszatellita és SNP szintű vizsgálata az egész humán genomban. Az első generációs genom vizsgálatok során a genetikai markereket tömbökbe kapcsolták. A korábbi nevén inzulindependens diabétesz mellitusznak nevezett betegséggel összefüggést mutató genom területeket IDDM számokkal jelölték, ezek között volt 18 számozott (IDDM1-18) és 7 nem teljesen elfogadott, elnevezés nélküli lókusz. A fő rizikófaktor IDDM1 jelű *HLA* II. osztályú génrégió és az IDDM2 jelű *inzulin gén* hajlamosító hatását minden vizsgálat igazolta. A többi lókusz megerősítésére végzett vizsgálatok ellentmondásos eredményre vezettek. A jelölt gén vizsgálatok során a minor

genetikai hajlamosító faktorok közül további lókuszokat sikerült több független populációban megerősítve azonosítani, ezek a citotoxikus T-limfocita antigén 4 génrégió (*CTLA4*), a protein tirozin-foszfatáz non-receptor 22 gén (*PTPN22*), az interleukin 2 receptor alfa gén (*IL2RA*) és az interferon indukálta helikáz 1 gén (*IFIH1*).

A XXI. században a posztgenomikus éra GWA vizsgálatai már több ezer fős beteg- és kontroll mintákkal dolgoznak, így lényegesen nagyobb statisztikai erővel bírnak. A vizsgálatok során számos, korábban nem jelölt génrégió (pl. 12q24, 12q13, 16p13, 18p11) 1-es típusú diabétesszel való kapcsolatát sikerült igazolni. A 12q24 és 12q13 lókuszok területén levő hajlamosító géneket még nem azonosították, de a 16p13 és a 18p11 régióban már közölték a *CLEC16A*-t és a *PTPN2*-t, mint legvalószínűbb jelölt géneket [24].

1.3.1.4. A KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK SZEREPE

Az 1-es típusú diabétesz kialakulásának elméletei szerint a betegség *genetikai hajlam* alapján *környezeti faktorok hatására* jön létre. Azonban nem ismert, hogy a környezeti faktorok oki tényezők, akcelerátorok vagy védő faktorok, esetleg több ponton, több mechanizmussal működnek. Feltételezhető, hogy univerzális, minden beteg esetében ható környezeti faktor nem létezik. Inkább az adott „diabetogén” genetikai háttér által kialakított immun- és metabolikus miliővel interakcióba kerülő faktorok specifikus hatásáról van szó [25]. A gén-környezet kölcsönhatások dinamikus változására bizonyítékot jelent, hogy napjainkban a környezeti faktorok átalakulása miatt kisebb *HLA*-hoz köthető genetikai rizikó is elegendő a diabétesz kialakulásához. Emellett valószínű, hogy újabb genetikai faktorok is szerephez jutnak a modern korban megjelenő új környezeti faktorok hatására (pl. ételadalékok, környezetszennyezés) [26].

Az 1-es típusú diabétesz kialakulásával kapcsolatban leggyakrabban felmerült környezeti tényezők [27]:

- **Perinatális tényezők:** az alacsony születési súly és az anyai β-sejt elleni antitestek növelhetik a későbbi T1DM-hajlamot.

- **Diétás faktorok:** a genetikailag nagy kockázatú csecsemőkben a tehéntej, illetve tehéntejalapú tápszerek fokozzák az T1DM kialakulásának kockázatát. A tehéntejfehérjék közül a bovin szérumalbumin és a β-laktalbumin, valamint a szarvasmarha inzulin átjuthat a csecsemők éretlen tápcsatorna-barrierjén és a keringésbe kerülve idegen antigénként aktiválhatja a T- és B-limfocitákat.
- **Infekció:** számos vírust (mumpsz, rubeola, entero-, citomegalovírusok) kapcsolatba hoztak az 1-es típusú diabétesz kialakulásával. Régóta ismert, hogy az újonnan diagnosztizált T1DM esetek döntő többsége a hideg periódusokban halmozódik, amit alátámaszt a β-sejt elleni autoantitestek megjelenésének őszi-téli dominanciája is. Egy svéd tanulmányban és a finn DIPP vizsgálatban kapcsolatot találtak az enterovírus infekció és az első diabétesz-asszociált autoantitest megjelenése között [28, 29]. Az enterovírus fertőzés nagyon gyakori az átlagpopulációban, mivel e vírusok evolúciója nagyon gyors, az egy adott évben kimutatható vírustörzsek nagy valószínűséggel 10 éven belül eltűnnek. Így ha léteznek diabetogén enterovírus törzsek, akkor a diabetogén tulajdonság a vírus ún. stabil genomikus régiójában helyezkedhet el és az evolúció során továbbvivődik. Az enterovírusok közé tartozó Coxsackie B4 provokáló szerepét alátámasztja, hogy a T1DM kialakulásakor vizsgált gyermekek és felnőttek jelentős hányadában emelkedett vírus-specifikus IgM titert észleltek, ami aktív Coxsackie B4 fertőzést igazol, sikerült a vírust kitenyészteni autopsziás hasnyálmirigyből és állatkísérletben kimutatták, hogy a Coxsackie B4 fertőzés a β-sejtek akut citolízise révén inzulindependens diabéteszt váltott ki [30].
- **Csökkent UV-sugárzás és D-vitamin hiány:** korábbi vizsgálatok újonnan diagnosztizált T1DM-es betegek szérumában csökkent D_3-vitamin-szintet igazoltak. A kevéssé napsütéses északi régiókban (Skandinávia, Új-Fundland) a csökkent UV sugárzás és az T1DM emelkedett incidenciája között összefüggést mutattak ki. Az Amerikai Egyesült Államokban jelenleg is folyik az az intervenciós vizsgálat, melyben a nagy genetikai rizikójú csecsemőket emelt adagú D_3-vitamin-pótlásban részesítik T1DM prevenciós céllal.
- **Pszichoszociális (stressz) tényezők** szerepe is felmerül a T1DM kialakulásában.

doi:10.14753/SE.2013.1801

1.3.2. A FELNŐTTKORI LÁTENS AUTOIMMUN DIABÉTESZ (LADA)

1986-ban *Groop és munkatársai* az 1-es típusú diabéteszes betegeknek egy olyan alcsoportját ismertették, akiknél az autoantitest pozitivitás ellenére hosszú ideig megőrződött a β-sejt funkció [31]. Később *Tuomi* és munkacsoportjának kezdeményezésére **felnőttkori látens autoimmun diabétesz**nek (latent autoimmune diabetes in adults, LADA) nevezték el ezt a diabétesz formát [32]. A jelenlegi klasszifikáció szerint a LADA nem önálló kórkép, hanem az *autoimmun mechanizmusú 1-es típusú cukorbetegség lassú progressziójú formája*.

A LADA **diagnosztikai kritériumait** a közelmúltban a Nemzetközi Diabétesz Tásaság Immunológiai szekciója határozta meg:

- 30 éves vagy afeletti életkor,
- az 1-es típusú diabéteszre jellemző autoantitestek közül legalább egy pozitív,
- a diagnózist követő 6 hónapon belül nincs szükség inzulinkezelésre [33].

Ezen kritériumok alapján tett epidemiológiai becslések szerint a LADA az összes cukorbeteg eset 2-12%-át teszi ki [33].

Az autoantitestek és a β-sejt-reaktív T-sejtek jelenléte egyaránt szilárd bizonyíték arra, hogy mind a LADA és mind a klasszikus gyermekkori 1-es típusú diabétesz hátterében β-sejt specifikus autoimmun folyamatok állnak. Ugyanakkor egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy a klasszikus gyermekkori 1-es típusú és a felnőttkori autoimmun diabétesz hátterében álló patogenetikai folyamatok több lényeges ponton különböznek. Erre bizonyítékokat jelent, hogy:

- A két kórkép **antitest-pozitivitás mintázata eltérő**. A klasszikus gyermekkori 1-es típusú diabéteszben az ismert diabétesz autoantitestek (ICA, GADA, IA-2A, IAA és ZnT8 antitest) gyakoriak és jellemző, hogy az antitestek klaszterben jelennek meg. Ugyanakkor LADA-ban a GADA és ICA sokkal gyakrabban, míg az IAA, az IA-2A és a ZnT8 antitestek ritkán fordulnak elő és az egyszeres autoantitest pozitivitás a jellemző. További különbség, hogy LADA betegekben gyakoribb az anti-GAD IgG4 alosztálya, mint 1-es típusú diabéteszben, ami egy „szabályozottabb", $CD4^+$ T helper 2 domináns immunválaszt igazol [33].

- Az 1-es típusú diabétesz és a LADA esetén **különbözik az egyes antitestek epitóp specificitása**. Az 1-es típusú diabéteszesek több mint 90%-ának szérumából olyan antitestek izolálhatók, melyek a GAD65 középső vagy COOH-terminális részét kötik és csak 5%-ban ismerik fel a GAD65 NH_2-terminális részét, míg LADA betegeknél ezek az arányok 65% és 20% [33].
- A celluláris immunoblot teszt felhasználásával eltéréseket találtak 1-es típusú diabéteszben és LADA-ban a **szigetfehérjék elleni T sejt válasz**ban is [33].
- Klinikailag igazolt, hogy a LADA betegekben a C-peptid szint gyorsabban csökken mint az autoantitest negatív 2-es típusú diabéteszes betegekben, de lassabban és kisebb mértékben mint felnőtt 1-es típusú diabéteszesekben [33].
- A genetikai hátteret tekintve az 1-es típusú diabétesz iránti öröklési hajlamot közel 50%-ban meghatározó *HLA* lókuszok hajlamosító hatása alapvetően hasonló LADA-ban [34], de van néhány lényeges különbség a két kórkép között: a nagy kockázatú *DQB1*0201/*0302* genotípus sokkal gyakoribb T1DM-ben mint LADA-ban, míg a protektív **0602/X* és *0603/X* genotípusok gyakrabban fordulnak elő LADA-ban mint T1DM-ben [35].

1.3.3. A 2-ES TÍPUSÚ DIABÉTESZ (T2DM)

A jelenleg legelfogadottabb hipotézis szerint 2-es típusú diabétesz akkor alakul ki, ha a β-sejt diszfunkcióra genetikailag hajlamos egyénben a környezeti tényezők hatására inzulinrezisztencia lép fel [36]. A patomechanizmus lényege, hogy a túltáplálkozás, a mozgásszegény életmód és a genetikai hajlam okozta elhízás komplex mechanizmusok révén csökkenti a célszervek inzulinnal szembeni érzékenységét, az inzulinrezisztencia fokozza a hasnyálmirigy inzulinszekrécióját, a hiperinzulinémia hosszú ideig képes fenntartani a normoglikémiát, de végül a β-sejtek kimerülése miatt emelkedik a vércukorszint és manifesztálódik a diabétesz. Az esetek döntő többségében az inzulinrezisztencia az elsődleges, az inzulinszekréció zavara következményes. Ugyanakkor az inzulinrezisztens betegek 2/3-ánál nem alakul ki diabétesz és a betegek kis hányadánál, elsősorban a sovány és normális testalkatúaknál primer

inzulinszekreciós zavar feltételezhető [37]. Mint kategória a 2-es típusú diabétesz tehát igen heterogén, a betegek széles tartományát fogja át, a dominálóan inzulinrezisztencián alapuló, relatív inzulinhiánnyal társuló formáktól az elsődlegesen szekréciós zavarra visszavezethető, inzulinrezisztenciával társuló vagy anélkül megjelenő formákig.

1.3.3.1. AZ INZULINREZISZTENCIA

1939-ben *Hinsworth* és *Kerr* azt tapasztalták, hogy az általuk vizsgált cukorbetegek egyharmadánál a beadott inzulin a vártnál kisebb hatást váltott ki, azaz e betegek inzulinérzékenysége csökkent volt. A normális mennyiségű inzulin szubnormális biológiai válaszát inzulinrezisztenciának nevezték el. Az inzulin biológiai hatását elsődlegesen a zsírszöveten, az izomszöveten és a májon fejti ki, ezért az inzulinrezisztencia ezekben a szervekben, szövetekben alakulhat ki. Feltételezések szerint elsőként a zsírszövet inzulinrezisztenciája jön létre, az izomszövet és a máj inzulinrezisztenciája következményes [37].

Bizonyított, hogy az inzulinrezisztencia elsődleges oka az elhízás. Ha a túlzott energiabevitel miatt pozitív energiamérleg alakul ki, a többletenergia trigliceridek formájában feltölti a zsírsejt raktárakat, a lipohipertrófia során egy kritikus méret elérése után (3 μg lipid/sejt) a zsírsejtek nem képesek tovább növekedni. Ezt követően az inzulin már nem tudja fokozni a zsírsejtek zsírsav-felvételét, azaz a zsírsejtek inzulinrezisztenssé válnak. Az inzulinrezisztencia molekuláris hátterében a megemelkedett TNF-α−szint áll, ami gátolja a lipoproteinlipáz, a zsírsavtranszportáló fehérje és a trigliceridreszintézist katalizáló acetil-CoA-szintetáz szintézisét, és megakadályozza a zsírsejt glükóztranszporter-4 (GLUT-4) általi glükózfelvetelét. Tartósan magas TNF-α koncentráció esetén az inzulinreceptor-szubsztrát-1 aktivitása is csökkent, ami a β-sejtjekben kompenzatórikusan fokozza az inzulinszekréciót. Az így kialakult hiperinzulinémia a zsírsejtfelszíni inzulinreceptorok számának csökkenéséhez vezet [37].

Az inzulinrezisztens zsírszövetben csökken a lipogenezis és fokozódik a lipolízis, ami növeli a zsírsavkiáramlást a zsírsejtekből. Bár a megemelkedett plazma szabad

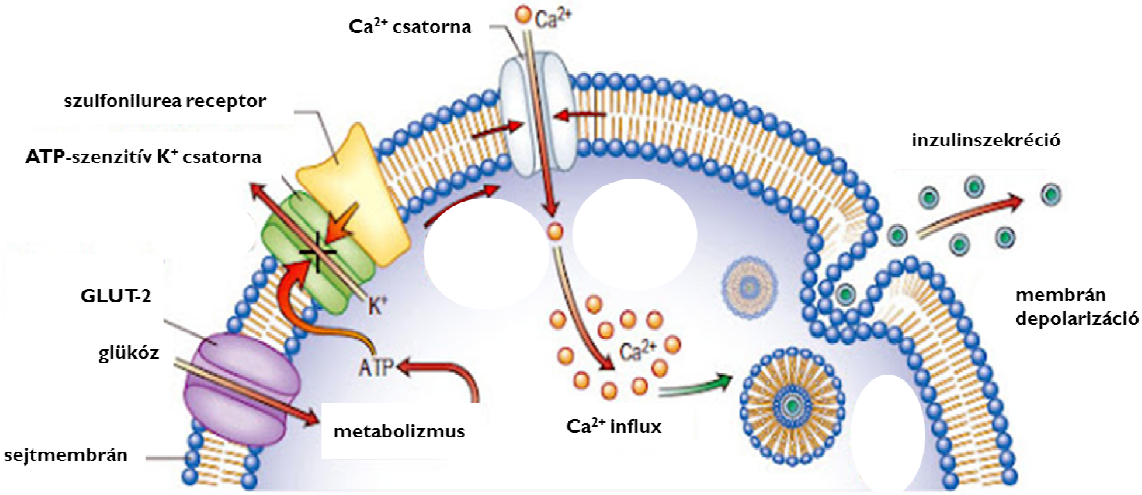
zsírsav koncentráció (FFA) okozza elsődlegesen a harántcsíkolt izom és a máj inzulinrezisztenciáját, a zsírszövet által termelt adipokinek (pl. leptin, adiponektin, rezisztin, TNF-α, IL-6) szintén jelentősen befolyásolják a máj- és az izomszövet inzulinérzékenységét. A leptin döntően a szubkután zsírszövetben termelődik és az energia-homeosztázis szabályozója. Centrális hatása, hogy csökkenti az étvágyfokozó neuropeptid Y termelődését, ezáltal gátolva az étvágyközpontot. A harántcsíkolt izomban a leptin fokozza a szétkapcsoló fehérjék (uncoupling protein, UCP) termelődését és ezáltal az energia hő formájában történő leadását. Mindkét folyamat csökkenti a plazma FFA szintjét, ami megvédi a sejteket a lipotoxicitástól. Túlsúly esetén nő plazma a leptinszintje, ami leptinrezisztenciára utal. Az adiponektin serkenti a zsírsavoxidációt, csökkenti a trigliceridszintet és a fokozódó inzulinérzékenység révén javítja a glükózanyagcserét. A rezisztin-, az IL-6- és a TNF-α-szint növekedése fokozza az inzulinrezisztenciát [37].

1.3.3.2. AZ INZULINSZEKRÉCIÓ ZAVARA

A β-sejt diszfunkció a hasnyálmirigy β-sejtjeinek funkcionális károsodását jelenti, melynek következtében az inzulinszekréció kezdetben reverzibilisen csökken, majd a β-sejtek kimerülésekor véglegesen megszűnik.

Fiziológiásan az inzulinszekréció legfontosabb ingere a vércukorszint emelkedése, ennek során a glükóz a glükóztranszporter 2-n (GLUT-2) keresztül a koncentrációgradiens mentén bejut a β-sejtekbe, ahol a mitokondriumokban oxidálódik, miközben ATP képződik. Ennek hatására a sejtmembrán ATP-szenzitív K^+-csatornái zárulnak és a depolarizáció megnyitja a feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornákat. A beáramló Ca^{2+} hatására az inzulinnal telt szekréciós granulumok kiürülnek (6. ábra).

doi:10.14753/SE.2013.1801



6. ábra: A β-sejtek inzulinszekréciójának mechanizmusa

A fiziológiás inzulinszekréció több szakaszból áll [38]:

- A **bazális inzulinszekréció:** fiziológiásan gyakoribb (8–10 percenkénti) β-sejtek által vezérelt pulzációk és ritkább (80–150 percenkénti) β-sejteken kívüli szignálok által kontrollált oszcillációk formájában zajlik. A szabályos pulzatilis ritmus kiesése már önmagában is az inzulinhatás csökkenését eredményezheti.
- Az **étkezési inzulinszekréció** kétfázisú. A *korai* inzulinválaszt a β-sejtek szekretoros granulumaiban tárolt preformált inzulin kiáramlása okozza, ez az étkezést követően rövid időn belül bekövetkezik és hirtelen jelentősen megemeli a plazma inzulinszintet. A *késői* inzulinválasz: az étkezést követő korai inzulincsúcs után a plazma inzulinszint mérsékeltebb elhúzódó emelkedése tapasztalható, amit nagyrészt az aktuálisan szintetizálódó inzulinkiáramlás okoz.

A β-sejtek kimerülése a kezdeti hiperinzulinémiás szakaszt követően a bazális inzulinszint csökkenésében illetve az étkezési plazma inzulinszint-emelkedés elmaradásában nyilvánul meg. A klinikai következmények, az éhomi és a posztprandiális vércukorszint emelkedése már a 2-es típusú diabéteszt megelőző glükózintolerancia-stádiumokban (IGT: csökkent glükóztolerancia, IFG: emelkedett éhomi vércukor) megjelennek.

doi:10.14753/SE.2013.1801

A károsodott β-sejt működés hátterében számos ok állhat [38]:

- **glükotoxicitás**: az inzulinszekréció legfontosabb ingere a vércukorszint emelkedése, ugyanakkor 8,25–8,8 mmol/l fölé emelkedő vércukorszintnél a tendencia megfordul és a tartós hiperglikémia kezdetben reverzibilisen csökkenti a β-sejtek szekréciós tevékenységét, ez a glükózdeszenzitizáció. Később az irreverzibilis glükotoxicitási szakban a β-sejtek refrakterré válnak a glükózstimulussal szemben, a szekréciós granulumok kiürülnek, végül teljesen elmarad a szekréciós válasz.
- **lipotoxicitás**: a szabad zsírsavak a fiziológiás tartományban elősegítik a bazális és az éhomi inzulinszekréció fenntartását, és potencírozzák a glükóz indukálta inzulinszekréciót. A kórosan magas FFA szint azonban gátolja a glükóz indukálta inzulinszekréciót, csökkenti az inzulin gén expresszióját, fokozza a β-sejtek apoptózisát.
- **szöveti inzulinrezisztencia**: a zsírszövet, a máj és az izomszövet inzulinrezisztenciája fokozott szekréciós terhet jelent a β-sejtek számára és a kimerülés veszélyével fenyeget. A fokozott szekréció miatt a β-sejttömeg a kezdeti hipertrófiát követően csökken. A β-sejtek apoptózisa felgyorsul és ezt a genetikailag meghatározott sejtneogenezis nem képes kompenzálni.
- **β-sejtek inzulinrezisztenciája**: inzulinreceptorok a β-sejtek felszínén is találhatók, ezek fontos szerepet játszanak a β-sejtek autokrin szabályozásában. Az inzulinreceptorok fokozott expressziója növeli az inzulin gén expresszióját, aminek eredményeként nő a β-sejtek inzulintartalma. A β-sejtek inzulinreceptorainak épsége szükséges a normális inzulinszekrécióhoz, a β-sejtek inzulinrezisztenciája pedig hozzájárulhat a β-sejt-diszfunkció kialakuláshoz.
- **β-sejt amiloid-depozíció**: az amilin (islet amyloid polypeptide, IAPP) az inzulinnal együtt termelődik a β-sejtekben. 2-es típusú diabéteszben az amilin szekréciója károsodik, és a keletkező polimerizált forma felhalmozódva a β-sejtekben fokozott apoptózishoz vezet.

doi:10.14753/SE.2013.1801

1.3.3.3. A GENETIKAI FAKTOROK SZEREPE

Az utóbbi években jelentősen felgyorsult a 2-es típusú diabétesz patofiziológiai folyamatait meghatározó genetikai tényezők kutatása, melynek eredményeként bebizonyosodott, hogy mind a β-sejtek működési defektusa, mind az inzulinhatás zavara lehet genetikailag meghatározott [39].

A 2-es típusú diabétesz kialakulásában szerepet játszó gének feltérképezése három fázisban zajlott. Elsőként a családalapú kapcsoltsági vizsgálatokra fókuszáltak, melyek igen hatékonynak bizonyultak a korai kezdetű monogénes (mendeli öröklődést követő) diabétesz formák (MODY, mitokondriális és neonatális diabétesz) kialakulásáért felelős gének azonosításában [40].

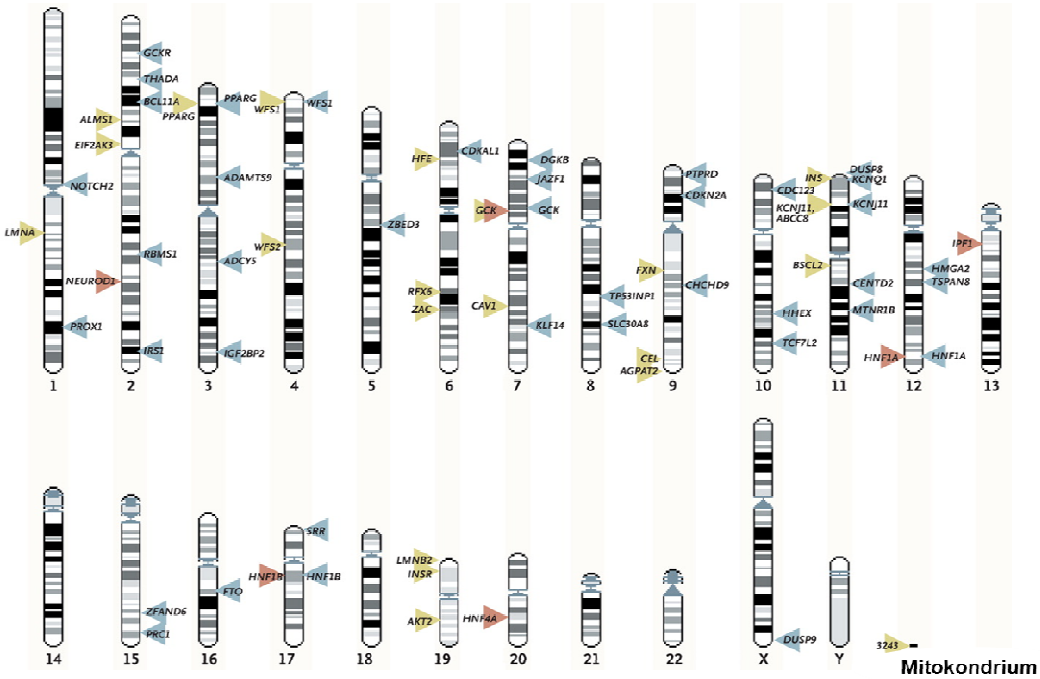
Bár az asszociációs analízis hatékonyabb a kapcsoltsági vizsgálatoknál, hátránya, hogy a jelet csak akkor lehet kimutatni, ha magát az oki variánst vagy egy közeli, szorosan kapcsolódó markert vizsgálnak. Utólag nyilvánvaló, hogy a legtöbb asszociációs analízis statisztikailag nem volt elég erős vagy nem a megfelelő jelölt génekre fókuszált, ezért 2006-ig ezzel a módszerrel csupán két, 2-es típusú diabéteszre hajlamosító lókuszt (*PPARG* és *KCNJ11*) sikerült azonosítani [40].

A harmadik, egyben a legsikeresebb genetikai vizsgálati hullámot a teljes genom asszociációs vizsgálatok jelentik. Az első jelentős eredmény a *TCF7L2* gén és a 2-es típusú diabétesz közötti kapcsolat felfedezése volt, majd hat új asszociációt írtak le, köztük a ciklin-függő kinázokat kódoló *CDKAL1*, *CDKN2A* és *CDKN2B* variánsokat és a β-sejt fejlődéssel összefüggésbe hozható *HHEX* gént. Mivel ezen lókuszok diabetogén hatóereje szerény (általában a hajlamosító allélek minden egyes kópiája 15-20%-kal növeli a betegségkockázatot), jelenleg a fő megközelítési mód a teljes genom asszociációs vizsgálatok adatainak összesítése azért, hogy növelni lehessen a vizsgálatok statisztikai erejét: így további 20 járulékos génvariánst sikerült azonosítani [40].

Jelenleg összesen mintegy 40 lókuszról igazolt, hogy 2-es típusú diabéteszre hajlamosít (7. ábra). Ezen gének többsége a β-sejtek működését befolyásolja (pl. *TCF7L2*, *KCNJ11*, *HNF1A*, *HNF1B*, *SLC30A8*, *GCK*, *WFS1*, *MTNR1B*), míg az inzulin

doi:10.14753/SE.2013.1801

iránti megváltozott érzékenység kialakulásáért felelős genetikai faktorok közül lényegesen kevesebb ismert (pl. *PPARG*, *ADIPOQ*, *ENPP1*, *IRS1*) [39]. Bár az egyes gének diabetogén hatása önmagában csekély, elméleti becslések szerint az igazolt génvariánsok együttesen már több mint 50%-ban határozzák meg a 2-es típusú diabétesz iránti fogékonyságot.



7. ábra: A nem-autoimmun diabétesz-formák hajlamosító genetikai lókuszai (Kék: 2-es típusú diabétesz, Piros: MODY, Sárga: egyéb monogénes diabétesz formák)

1.3.3.4. A KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK SZEREPE

Bizonyított, hogy az elhízás, a csökkent fizikai aktivitás, és az életkor előrehaladása fokozza a 2-es típusú diabétesz kialakulásának kockázatát. Ezek a rizikó faktorok sokakat érintenek, mégsem alakul ki minden érintettben a betegség. Az epigenetikai hatások (pl. DNS metiláció, hiszton módosulás, mikroRNS) olyan nukleotidszekvencia-

módosulás nélküli génfunkció-változások, melyek magyarázatot jelenthetnek a diabétesz hajlam ilyen interindividuális változására [41].

Az **elhízás** a 2-es típusú diabétesz kialakulása szempontjából a legjelentősebb környezeti tényező, mely az inzulinrezisztencia elsődleges okaként közvetlenül felelős a kóros patogenetikai folyamatok elindításáért. Az elhízás hátterében általában a genetikai faktorok, a túltáplálkozás és a mozgásszegény életmód együttese áll. A bizonyos etnikai csoportokra jellemző nagyfokú elhízásra részben magyarázatot jelent a **takarékos gén elmélet** (thrifty gene hypothesis), mely szerint az evolúció során bizonyos népek (pl. Pima indiánok, ausztrál bennszülöttek, Nauru szigetén élők) alkalmazkodtak az állandó vagy a periodikus éhezéshez. A megváltozott életkörülmények, az állandó táplálékbőség mellett a korábban túlélési, azaz szelekciós előnyt jelentő „raktározó génvariánsok" hordozása túlsúly kialakulásához vezet. A **leptin gén** elsősorban az érett zsírsejtekben fejeződik ki és az étvágyat illetve az energia homeosztázist szabályozza. Patkányokban igazolt, hogy a magas zsírtartalmú étrend fokozza a zsírsejtekben a leptin gén promóter régiójában a génexpressziót szabályozó CpG szigetek DNS-metilációját (51), azaz a leptin expresszió *epigenetikai szabályozása* közvetlenül kapcsolódik a táplálékbevitellel és az elhízással [41].

Epidemiológiai vizsgálatokban azt találták, hogy kis testsúlyú újszülöttek között évtizedekkel később megnőtt a 2-es típusú cukorbetegek száma. A jelenség hátterében azt feltételezik, hogy a magzati szervezet **fehérjehiányos intrauterin táplálás** esetén prioritási sorrendet állít fel, és az életfontosságú szervek (pl. az agy) elsőbbséget élveznek, míg a hasnyálmirigy β-sejtek kevésbé fejlődnek, ami felnőttkorban csökkent inzulinszekréciós kapacitást eredményezhet [38]. Az intrauterin tápláltság feltehetően olyan epigenetikai változásokat indukál, melyek kapcsolatba hozhatók a későbbi inzulinrezisztencia és 2-es típusú diabétesz kialakulásával. Rágcsálókban bizonyított, hogy a Pdx1/inzulin promóter faktor-1 (IPF-1) transzkripciós faktor szabályozza a hasnyálmirigy fejlődését és a β-sejtek differenciálódását. Az uteroplacentáris elégtelenség okozta intrauterin növekedési retardáció során a *Pdx1* gén progresszív epigenetikai elnémítása zajlik, ami csökkent β-sejt működéssel, és felnőttkorban 2-es típusú cukorbetegség kialakulásával jár. Elképzelhető, hogy emberben az uteroplacentáris elégtelenség esetén szintén a *PDX1* gén az epigenetikai mechanizmusok célpontja [41].

Gyenge fizikai erőnlét és a 2-es típusú diabétesz kockázata között is összefüggést találtak. A háttérben a fizikai aktivitás okozta génexpresszió indukció (pl. a vázizomzat glükóz felvételét szabályozó *GLUT4* gén), a mitokondriális diszfunkció és az izomrost-típus összetételében bekövetkező változások állhatnak [41].

1.3.4. A *FOLYAMATOS DIABÉTESZ SPEKTRUM* ÚJ ELMÉLETE

Az 1-es vagy a 2-es típusú diabétesz diagnózisa általában olyan kritériumokon alapszik, mint a betegség kezdetekori életkor, a hiperglikémia súlyossága, a ketózis jelenléte, az elhízás mértéke vagy az inzulinpótlás szükségessége. A klinikai tünetek azonban széles határok között mozognak, így a diagnózis gyakran bizonytalan.

Az elmúlt években számos jelentős kutatási eredmény hívta fel a figyelmet a jelenlegi diabétesz klasszifikációs rendszer hiányosságaira [42, 43]:

- A β-sejt specifikus autoantitestek jelenléte egyértelmű bizonyíték a Langerhans-sziget elleni autoimmunitásra diabéteszben. Ismert, hogy mind az 1-es, mind a 2-es típusú diabéteszben kimutathatók β-sejt specifikus autoantitestek, de ezek megoszlása eltérő. Míg T1DM-ben a multiplex autoantitest pozitivitás (ICA, GADA, IAA, IA-2A, ZnT8) a jellemző, addig a felnőttkori látens autoimmun diabéteszben az IAA, az IA-2A és a ZnT8 elleni autoantitestek ritkák és elsősorban ICA vagy GADA egymagában fordul elő [44]. Mivel a 2-es típusú diabéteszben eddig kimutatott autoantitesteket eredetileg T1DM-ben azonosították, nem lehet kizárni annak a lehetőségét, hogy vannak olyan - eddig nem azonosított - β-sejt autoantitestek, melyek a fenotípusosan T2DM-es betegekben zajló autoimmun folyamatra jellemzők.
- Az 1-es típusú diabétesz patogenezisének alapja az autoreaktív T-sejtek általi szelektív β-sejt destrukció, ugyanakkor nemrégiben a 2-es típusú diabéteszesekben is a hasnyálmirigyet infiltráló immunsejteket mutattak ki [45, 46]. A mindkét betegségben igazolt szigetsejt-reaktív T-sejtek, azaz „autoinflammatórikus" sejtek generálta inzulitisz jelenléte megerősíti, hogy mind a klasszikus 1-es, mind a fenotípusosan 2-es típusú diabéteszes betegekben

a Langerhans-szigetek elleni autoimmunitás egyértelműen jelen van. A fenotípusosan 2-es típusú diabéteszes betegeknél kimutatták azt is, hogy a sziget-reaktív T-sejtek jelenléte súlyosabb β-sejt károsodást jelez, mint ha csak autoantitestek vannak jelen [47]. Ez alátámasztja T2DM-ben is a sziget-reaktív T-sejtek és a β-sejt destrukció közötti közvetlen kapcsolat tényét. Ugyanakkor a β-sejt destrukció mértéke egyértelműen súlyosbodik a T2DM-es betegektől, a felnőttkori T1DM-es betegeken át a klasszikus gyermekkori 1-es típusú diabéteszes betegek irányába.

- A metabolikus szindróma részét képező elhízás, magas vérnyomás és diszlipidémia társulhat 1-es és 2-es típusú diabétesszel is. A T2DM patofiziológiai alapját jelentő inzulinrezisztenciát a homeosztázis modellel értékelve és a testtömeg-index-szel korrigálva nem mutatható ki különbség az autoimmun eredetű LADA és a 2-es típusú diabéteszes betegek között [48]. Inzulinrezisztenciát 1-es típusú diabéteszben is kimutattak, és igazolt, hogy elősegíti a prediabéteszes stádiumból a betegség irányú progressziót [49].

Mindezen eredményeket összegezve - a jelenlegi diabétesz klasszifikációs rendszer hiányosságaiból kiindulva - született meg a **diabétesz-spektrum folytonosságát hangsúlyozó elmélet**. Az új elmélet azt sugallja, hogy a diabétesz tulajdonképpen olyan betegségek tárháza, amelyek kialakulásában részt vesz az immunrendszer. A spektrum egyik végén a kiterjedt autoimmun β-sejt pusztulással járó klasszikus gyermekkori T1DM áll, ezt követi a felnőttkorban kialakuló T1DM és a LADA, míg a spektrum másik végén a glükóztolerancia korfüggő romlásával összefüggő, nem-autoimmun fenotípusú T2DM áll. A folyamatos diabétesz-spektrum elmélet az immunrendszer β-sejt károsodásban való részvételének mértéke alapján differenciál és figyelmen kívül hagyja a betegek fenotípusos jellemzőit. Hangsúlyozza, hogy az immunrendszer szerepe a β-sejt destrukcióban általános, de az autoantitest-profilban és a reaktív T-sejtek által felismert szigetfehérjékben levő eltérések igen lényeges különbségeket jelentenek az 1-es és a 2-es típusú diabétesz patogenezisében [43].

doi:10.14753/SE.2013.1801

1.4. MINOR ÉS MAJOR GENETIKAI FAKTOROK DIABÉTESZBEN

1.4.1. AZ 1-ES TÍPUSÚ DIABÉTESZ ÁLTALAM VIZSGÁLT GENETIKAI FAKTORAI

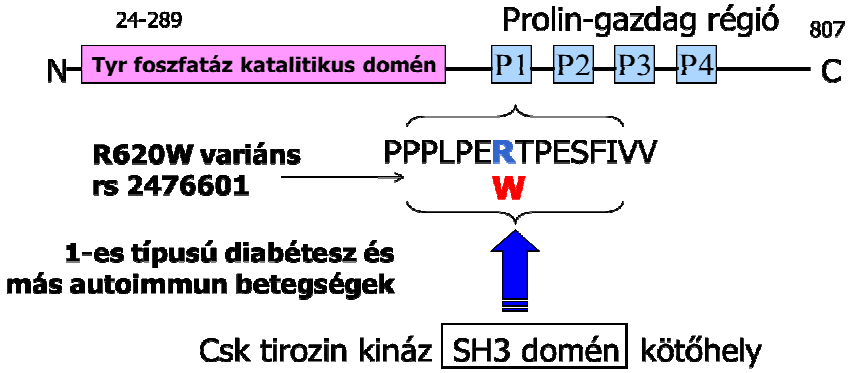
1.4.1.1. *PTPN22* gén (protein tyrosine phosphatase non-receptor 22)

2004-ben *Bottini és munkatársai* írták le elsőként, hogy a *PTPN22* gén rs2476601 jelű polimorfizmusának minor allélje fokozott rizikót jelent az 1-es típusú diabétesz kialakulására mind a fehérbőrű amerikai, mind a szardíniai populációban [50]. Azóta ezt az eredményt számos független népcsoport vizsgálatával megerősítették, így kimondható, hogy a *PTPN22* gén populáció-független módon hajlamosít T1DM kialakulására közel 10%-ban határozva meg a betegség iránti genetikai fogékonyságot [51-53].

A *PTPN22* gén az 1-es kromoszóma rövid karján a p13.3-13.1 régióban található, és a LYP nevű tirozin foszfatázt kódolja. A LYP fehérje, mely valamennyi limfocitában, a neutrofil granulocitákban, a monocitákban, az NK-sejtekben, és a dendritikus sejtekben expresszálódik, az egyik legerősebb T-sejt aktivációt gátló faktor. A LYP fő funkciója, hogy a Csk kináz SH3 doménjével kapcsolódva az intracelluláris Ca^{2+}-beáramlás és a citokin-felszabadulás csökkenését eredményezi, ezáltal szuppresszálja a T-sejt receptor szignalizáció mediátorait, az Lck, Fyn és ZAP70 kinázokat. Emellett a LYP fehérjéről kimutatták, hogy kötődik a Grb2 adaptor molekulához és ez a kölcsönhatás szintén negatív szabályozó szereppel bír a T-sejt szignalizációban [54].

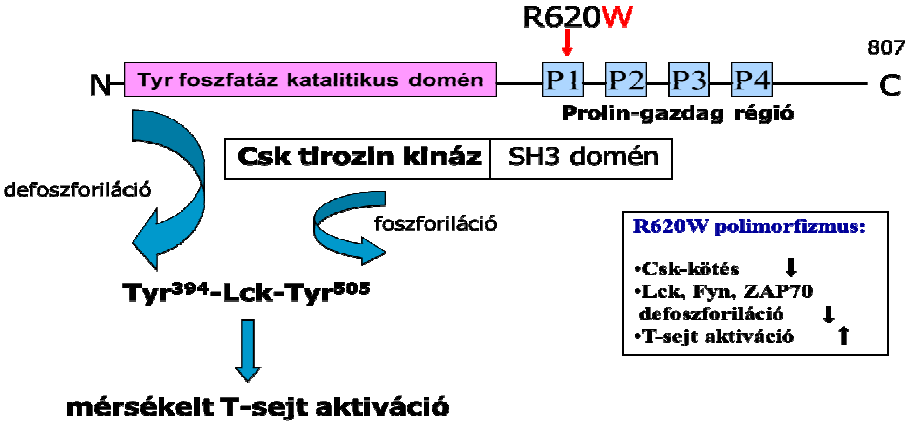
A *PTPN22* gén rs2476601 jelű polimorfizmusa esetén az 1858-as pozícióban egy C-T nukleotidcsere miatt a LYP fehérjében arginin (C-allél) helyett triptofán (T-allél) épül be az aminosavlánc 620-as helyére, ez pedig felszakítja a prolin-gazdag régióban azt a PxxPxR kötőmotívumot, ami döntő jelentőségű a LYP fehérje Csk tirozin kinázhoz és Grb2 adaptor molekulához való kötődésében (8. ábra).

doi:10.14753/SE.2013.1801



8. ábra: A LYP fehérje szerkezete

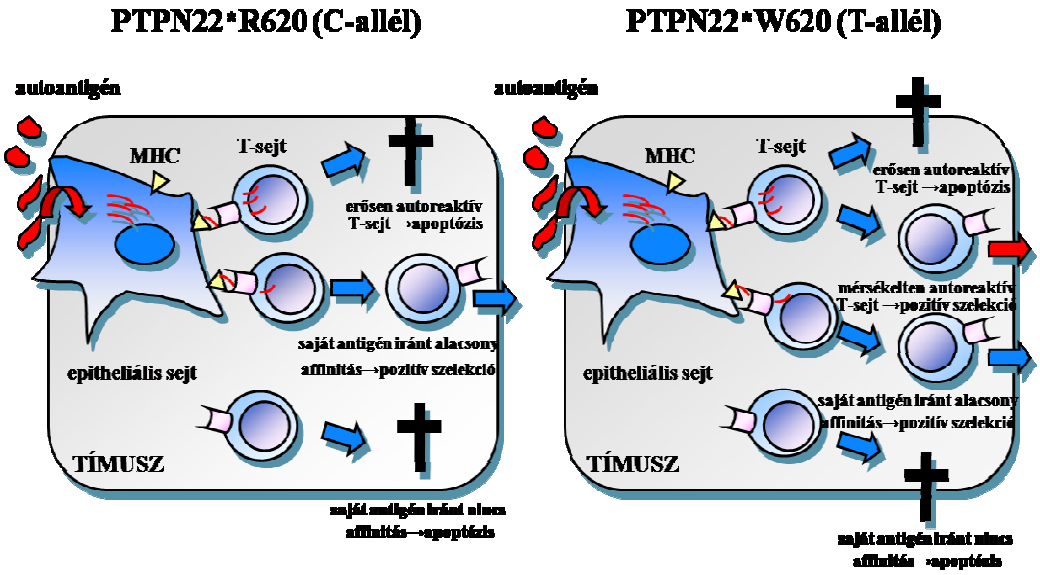
Immunprecipitációs kísérletekben igazolták, hogy az aminosavcsere hatására a képződő kóros LYP fehérje funkciójában jelentős változás következik be. A Trp620-as LYP fehérje alacsonyabb Csk-kötő kapacitással bír, aminek következtében a Csk T-sejt aktivációt mérséklő hatása is lecsökken (9. ábra) [55].



9. ábra: A LYP fehérje funkciója

Korábbi tanulmányok már felhívták a figyelmet arra, hogy a LYP és a Csk közötti kapcsolat lehetővé teszi, hogy ezek az effektorok szinergizmusban gátolják a T-sejt aktivációt. A LYP-Csk komplex hiányában a tímuszban a T-sejtek egy része hiperreaktívvá válik és ezen autoantigénekre fokozottan reagáló T-sejtek apoptózisa elmarad. Az autoreaktív sejtek kijutva a perifériára – külső környezeti tényező hatására - az autoimmun folyamat elindulását eredményezhetik. Azaz a *PTPN22* gén T-allél öröklése megnöveli a hiperreaktív patogén T-sejt válasz kialakulásának esélyét (10. ábra) [56].

doi:10.14753/SE.2013.1801



10. ábra: A *PTPN22* gén polimorfizmus feltételezett szerepe az autoimmunitás elindításában

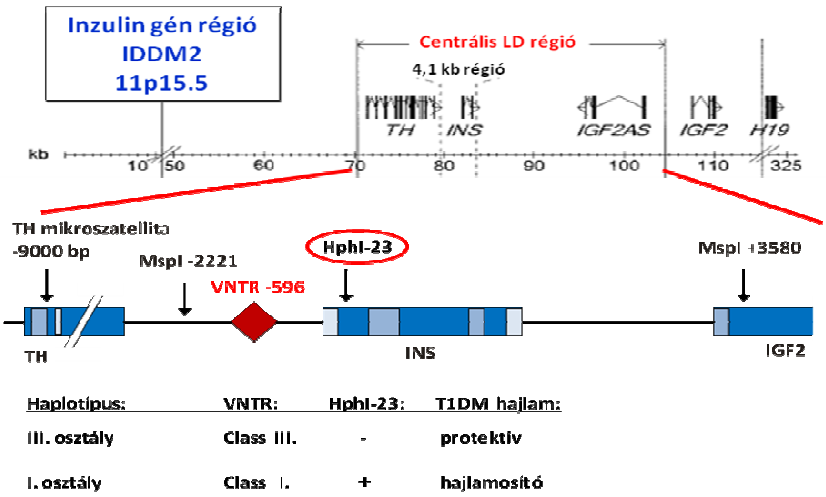
Számos tanulmányban beszámoltak a *T-allélhordozás* és a reumatoid artritisz, a juvenilis reumatoid artritisz, a szisztémás lupusz eritematózusz, a Graves-Basedow kór, a Hashimoto tireoiditisz, az autoimmun eredetű Addison-kór és a generalizált vitiligo kialakulása közötti kapcsolatról, ami tovább hangsúlyozza a *PTPN22* gén fehérjetermékének fontosságát az immunfolyamatok szabályozásában. Ezek alapján feltételezhető, hogy a *PTPN22* gén jelentheti az egyik közös prediszponáló faktort több autoimmun betegség kialakulására [57].

1.4.1.2. *INS* gén (insulin gene)

1983-ban egy eset-kontroll vizsgálat azonosította az 1-es típusú diabéteszre hajlamosító inzulin génrégiót, mely becslések szerint a genetikai hajlam 10-15%-áért felelős [58]. Az inzulin génrégiót IDDM2-nek vagy *INS*-nek is nevezik, markere egy genetikai polimorfizmus, az INS-VNTR. Az inzulin gén a 11-es kromoszóma p15.5 régiójában helyezkedik el, e terület fontos szabályozója a termelődő inzulin mennyiségének.

doi:10.14753/SE.2013.1801

Több autoantigénről bizonyították már, hogy részt vesz a diabétesz patogenezisében, ezek közül az **inzulin** az egyetlen, ami β-sejt specifikus. Az inzulin polipeptid 51 aminosavból áll és konzervatív szerkezetű, mutációi nagyon ritka monogénes diabétesz formákat okoznak. A T1DM patogenezisében nem az inzulin molekula szerkezeti variabilitásának, hanem a gén átíródását szabályozó promóter szakasznak van szerepe, mely sok genetikailag variábilis szakaszt tartalmaz [59]. Az egyik legismertebb a **VNTR régió**, mely az inzulin géntől 5' irányban található a promóter régióban és egy 14-15 bázispárból álló szekvencia (ACAGGGGTCTGGGG) meghatározott számú ismétlődése. Ezen szakasz ismétlődéseinek a száma alapján három csoportba sorolhatjuk az INS-VNTR-t (11. ábra).



11. ábra: Az inzulin génrégió és az 1-es típusú diabétesz hajlam

Az *I. osztályban* az ismétlődő szakaszok száma 30-60, ez a rövid allélvariáns homozigóta formában (I/I) fokozott diabétesz rizikót jelent (relatív rizikó ~ 2.0), ezt jelzi, hogy a diabéteszes betegek között 75-85%-ban fordul elő, szemben az átlagpopulációban észlelhető 50-60%-kal. A *III. osztályba* sorolt, 120-170 ismétlődést tartalmazó hosszú allélvariáns domináns protektív hatású. Az intermedier hosszúságú *II. osztályú* allélek nagyon ritkák az európai származású népcsoportokban [60]. A VNTR szakasz közelében található a **−23HphI polimorfizmus**, mely egy LD-blokkban van az I. és III. osztályú allélekkel, így helyettesítő markerként használható a VNTR osztályok helyett [61]. Mivel meghatározása technikailag könnyebb, ezért a gyakorlatban a

szomszédos −23HphI polimorfizmust genotipizálva különbséget lehet tenni a hajlamosító és a védő allélek között a VNTR szakaszok direkt vizsgálata nélkül. A−23HphI polimorfizmus *A-allélje* jelzi a VNTR I. osztályát, míg a *T-allél* a III. osztályát.

Pugliese és *Valfiadis* vizsgálatai arra utalnak, hogy az INS-VNTR allélek hossza egyenesen arányos az inzulin transzkripció szintjével a tímuszban. A tímusz központi szerepet játszik a magzati és újszülöttkori immuntolerancia kialakításában. A *III. osztályú VNTR allélek* esetén az inzulin gén átíródása fokozott a tímuszban, ez pedig nagyobb arányban vezet az inzulinspecifikus autoreaktív T-limfociták negatív szelekciójához, így csökkenti a β-sejt irányú autoimmunitás rizikóját. Az INS-VNTR szabályozza az inzulin gén szomszédságában elhelyezkedő *IGF2* gént is, melynek fehérjeterméke az IGF-2 fontos szereppel bír a fötális és a korai posztnatális növekedésben. Ez a fehérje szintén termelődik a tímuszban, és közreműködik a T-sejtek érésében és negatív szelekciójában. *VNTR I. osztályú allél* esetén magasabb az IGF-2 expresszió a placentában, ami fokozza a méhen belüli növekedést és ezáltal a születési súlyt, mindkét tényezőnek jelentősége van a T1DM kialakulásában. Emellett az IGF-2 immunmodulátoros hatásának jelentősége lehet az inzulinspecifikus tolerancia kialakításában is [62, 63].

A finn DIPP tanulmány igazolta, hogy az *INS* lókusz fontos szerepet játszik az inzulin specifikus autoimmunitás inicializálásában és szabályozásában. A VNTR I. osztályú allél jelenléte fokozza az inzulin autoantitest (IAA) kialakulásának esélyét. Feltehető, hogy az 1-es típusú diabétesz patogenezisében két fő irányvonal különíthető el: az *inzulin gén-függő* és az *inzulin géntől független útvonal*. Az **inzulin géntől függő útvonal** esetében az IAA már kisgyermekkorban megjelenik, gyakran 1 éves kor alatt, ezt követi a többi autoantitest, az ICA, a GADA, az IA-2A kialakulása, valószínűleg az „antigén szétterjedés” jelenség (antigen spreading) következtében. Ennél a mechanizmusnál a másodlagos antitestek megjelenése IAA- és inzulin gén-függő. A második, **inzulin géntől független útvonal** esetében IAA nem jelenik meg, az első antitest a GADA vagy az ICA és ezt követi az IA-2A [64].

doi:10.14753/SE.2013.1801

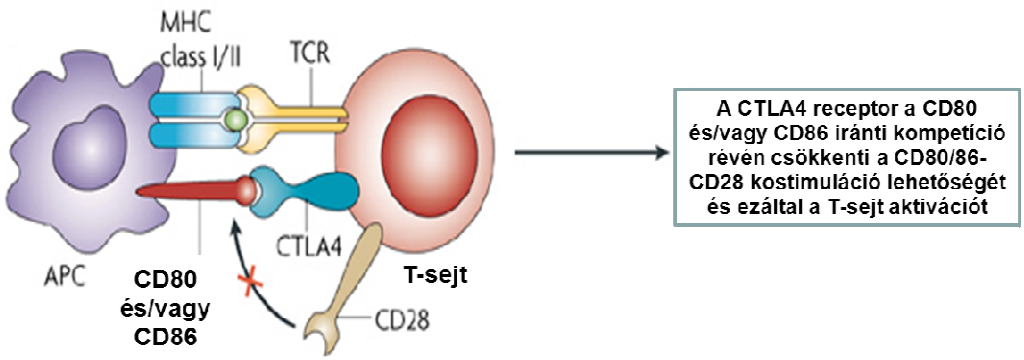
1.4.1.3. *CTLA4* gén (cytotoxic lymphocyte associated antigen-4)

A citotoxikus T-limfocita asszociált antigén 4-et (*CTLA4*) 1996-ban azonosították, becslések szerint a *CTLA4* gén 5%-ban járul hozzá az 1-es típusú diabétesz iránti genetikai hajlam meghatározásához [65].

A *CTLA4* gén 6175 bázispár hosszúságú és a 2q33 régióban található, négy exont tartalmaz, és 223 aminosavat kódol. Az első exon kódolja a leader peptidet, a második a ligand-kötő domént, a harmadik exon a transzmembrán domént, a negyedik pedig a citoplazmatikus farkat. A gén a citotoxikus T-limfocita asszociált proteint kódolja, e fehérjének emberben két izoformája ismert: az egyik a teljes hosszúságú CTLA4 (full length, flCTLA4), ami egy transzmembrán glikoprotein, átmenetileg expresszálódik a $CD4^+$ és $CD8^+$ T-limfociták, a B-sejtek és a felnőtt timociták felszínén. A másik izoforma a szolubilis CTLA4 (soluble, sCTL4), melyből alternatív splicing következtében a harmadik exon kivágódik, így nem tartalmazza a transzmembrán domént. A sCTLA4 monomer formában az inaktív T-sejtek felszínén található. Egerekben és patkányokban azonosítottak egy harmadik izoformát is, az úgynevezett ligand független (ligand independent, liCTLA4) forma a második exon kivágódása miatt nem tartalmazza a ligand-kötő domént [66].

A citotoxikus T-limfocita asszociált protein fő funkciója a T-sejt aktiváció negatív regulációja. A CTLA4 receptor egy kis gyakoriságú, de nagy affinitású receptor a T-sejteken, a B7 molekulával kötődik az antigén prezentáló sejtek felszínén, ezen kostimuláció eredményeként a T-sejt aktiváció szuppresszálódik. A T-sejt aktivációhoz szükséges jelet a CD28-B7 kapcsolat biztosítja. Két fajta B7 fehérje ismert, a B7.1 (CD80) és a B7.2 (CD86), melyek különböző kötési affinitással bírnak. A B7.1 a keratinocitákon, dentritikus-, Langerhans-, B- és T-sejteken, míg a B7.2 a makrofágokon, vaszkuláris endothel-, dentritikus-, Langerhans-, Kupffer-, NK-, B- és T-sejteken jelenik meg. A CD28 receptorok a T-limfociták felszínén találhatók. A CTLA4 és a CD28 fehérjék nagyfokú, körülbelül 30%-os szerkezeti homológiát mutatnak. A CTLA4 protein azonban 20-50-szer nagyobb affinitással köti a B7.1 és B7.2-t, ezáltal a T-sejtek fő autokrin növekedési faktorának, az IL-2-nek a szintézisét gátolja (12. ábra) [67].

doi:10.14753/SE.2013.1801



12. ábra: A CTLA protein szerepe a T-sejt aktiváció gátlásában

Állatkísérletek bizonyítják, hogy a CTLA4 deficit fatális limfoproliferatív és autoimmun betegségek kialakulásához és autoreaktív T-limfociták közvetítette többszervi károsodás kíséretében korai elhalálozáshoz vezet. A B-sejten végzett B7-fehérje expressziós vizsgálatok bizonyítják, hogy a CTLA4 kostimuláló molekulák hiánya csökkenti a T-limfociták apoptózis iránti érzékenységét, így elősegíti az autoimmun diabétesz kialakulását.

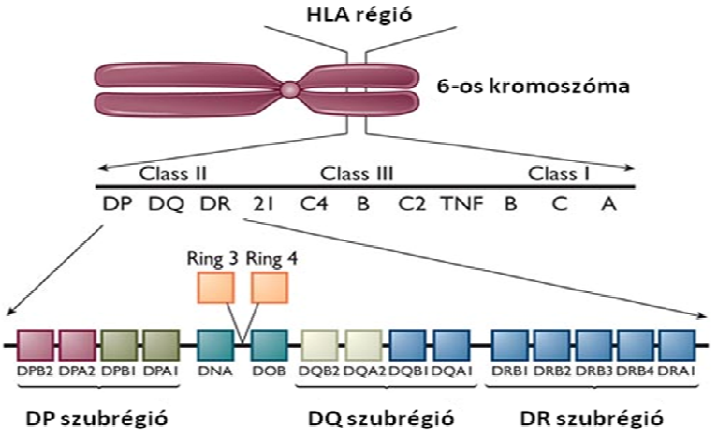
Ueda és munkatársai vizsgálata nyomán vált ismertté, hogy a *CTLA4* génrégió LD-tömbjén belül található 78 SNP közül 55 mutat összefüggést az 1-es típusú diabétesz kialakulásával. Az **A6230G** (korábban **CT60**-ként leírt) variáns a két CTLA4 izoforma arányát szabályozza, a diabéteszre hajlamosító G-allél esetén alacsonyabb a szolubilis CTLA4 molekula aránya [68].

A CTLA4 molekula valószínűleg a celluláris immunitás oldalán kapcsolódik be a T1DM patomechanizmusába, a pontos mechanizmus azonban nem ismert. Feltételezések szerint a *CTLA4* gén betegségre hajlamosító variáns a CTLA4 receptor down-regulációjának elmaradását okozza, ami a T-sejtek folyamatosan aktivált állapotának fennmaradását eredményezi. A *CTLA4* génnek tehát fontos szerepe van az autoimmun válasz iniciálásában, fenntartásában és terminálásában is [69].

doi:10.14753/SE.2013.1801

1.4.1.4. *HLA* génrégió (human leukocyte antigen)

A humán leukocita antigéneket a 6-os kromoszóma p21.3 régiója, az ún. major hisztokompatibilitási komplex (MHC) kódolja, ahol több mint 100 gén helyezkedik el, melyeket a kromoszómán való elhelyezkedésük és funkciójuk alapján több osztályba sorolják. Az **I. osztályba** tartozó *HLA* antigének (*HLA A, B, C*) megtalálhatók minden maggal rendelkező sejten és a trombocitákon, szerkezetileg egy polipeptid láncból és egy β_2-mikroglobulinból állnak, sejtfelszíni antigéneket kódolnak és $CD8^+$ citotoxikus T-limfocitákkal reagálnak. A **II. osztályú** *HLA* antigének (*HLA DR, DQ, DP*) B-limfocitákon, aktivált T-sejteken, monocitákon és makrofágokon fordulnak elő, két polipeptidláncból állnak, szintén sejtfelületi antigéneket kódolnak és $CD4^+$ helper T-limfocitákkal lépnek kapcsolatba. Szerkezetileg a DQ molekulák heterodimerek, melyek két polipeptid láncát a *HLA DQA1* és *DQB1* gének kódolják. A diabétesz hajlam szempontjából a *DQB1* allélek a legmeghatározóbbak, mivel közvetlenül részt vesznek az antigén prezentációban és a T-sejt aktivációban. A hasnyálmirigy β-sejtek károsodásában a *HLA DQ* mellett a *DR, DP* és a *HLA B* géneknek van járulékos szerepe. A **III. osztályú** *HLA* gének immunválasz fehérjéket és a komplement rendszer egyes faktorait kódolják (13. ábra).



13. ábra: A humán leukocita antigén génrégió

A *HLA* poligénes szuperlókuszként határozza meg az egyéni T1DM iránti fogékonyságot, a genetikai hajlam 40-50%-áért ez a génrégió felelős. Emiatt jelenleg a

doi:10.14753/SE.2013.1801

HLA markerek használatosak a genetikai rizikó megbecslésére, illetve populációszűrésre [70].

A *HLA* molekulák hajlamosító vagy protektív szerepe a T-sejtek felé történő antigén prezentációval magyarázható, ezt az egyes molekulák szerkezetében röntgen krisztallográfiával kimutatható különbségek határozzák meg. E térszerkezeti különbségek hátterében a polipeptidlánc aminosavsorrendjében levő eltérések állnak, melyek befolyásolják a *HLA* molekula stabilitását, az antigénkötés erősségét és a T-sejt receptorhoz való kötődés erőssége révén a T-limfociták aktivációját. A tímuszban zajló saját antigén prezentáció hatására immuntolerancia jön létre, amennyiben a folyamat zavart szenved – a hajlamosító gének által kódolt molekulák elégtelen antigén prezentációja miatt - a saját antigénre reagáló T-limfociták negatív szelekciója nem jön létre. Egyes *HLA* molekulák pedig a perifférián történő β-sejt eredetű antigén prezentációért felelősek, mely elindíthatja és fenntarthatja az autoimmun folyamatot (2. táblázat) [71].

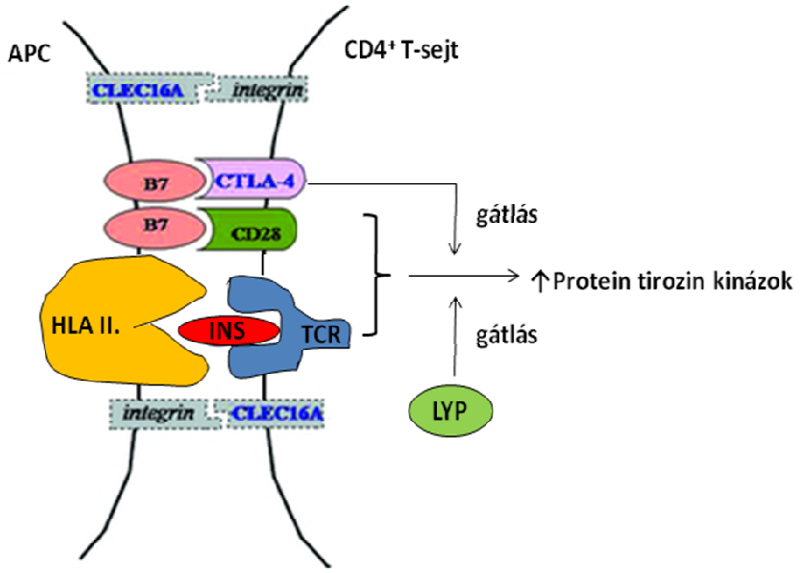
2. táblázat: T1DM kialakulását befolyásoló *HLA* haplotípusok

Magas kockázattal járó haplotípusok			
DR3	DRB1*0301	DQA1*0501	DQB1*0201
DR4	DRB1*0401	DQA1*0301	DQB1*0302
	DRB1*0402	DQA1*0301	DQB1*0302
	DRB1*0405	DQA1*0301	DQB1*0302
Közepes kockázattal járó haplotípusok			
DR1	DRB1*01	DQA1*0101	DQB1*0501
DR8	DRB1*0801	DQA1*0401	DQB1*0402
DR9	DRB1*0901	DQA1*0301	DQB1*0303
Protektív haplotípusok			
Erős protekció			
DR2	DRB1*1501	DQA1*0102	DQB1*0602
DR6	DRB1*1401	DQA1*0101	DQB1*0503
DR7	DRB1*0701	DQA1*0201	DQB1*0303
Mérsékelt protekció			
DR5	DRB1*1101	DQA1*0501	DQB1*0301
Gyenge protekció			
DR4	DRB1*0401	DQA1*0301	DQB1*0301
	DRB1*0403	DQA1*0301	DQB1*0302
DR7	DRB1*0701	DQA1*0201	DQB1*0201

doi:10.14753/SE.2013.1801

Bár az 1-es típusú diabétesz iránti hajlam öröklésmenete nem követi a mendeli szabályokat, általános szabályként elfogadott, hogy a cukorbetegségre hajlamosító *HLA* haplotípusok (*DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302*, *DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201*) hatása recesszív módon nyilvánul meg, míg az erős protektív haplotípusok (*DRB1*1501-DQB1*0602*, *DRB1*1301-DQB1*0603*) domináns módon viselkednek.

1.4.1.5. Az 1-es típusú diabéteszre hajlamosító gének közötti kölcsönhatás



14. ábra: Az 1-es típusú diabéteszre hajlamosító gének szerepe az autoreaktív CD4$^+$ T-limfociták aktivációjában (APC: antigén prezentáló sejt, TCR: T-sejt receptor)

Molekuláris szinten már bizonyított a főbb hajlamosító gének kölcsönhatása az 1-es típusú diabétesz patomechanizmusában. Az antigén prezentáló sejtek felszínén levő **HLA** II. osztályú molekulák az inzulint, mint autoantigént bemutatják a T-sejt receptorok felé, ennek hatására a CD4$^+$ T-sejtek aktiválódnak. Az aktivációhoz szükség van a B7-CD28 molekulák kostimulációjára is. A **CTLA4** fehérje kétféleképpen is gátolja a CD4$^+$ T-sejtek aktivációját, egyrészt a B7 protein kötése révén kompetitíven gátolja a CD28 molekulát, másrészt a citoplazmatikus doménjének foszfatáz aktivitása révén gátolja a protein tirozin kinázok működését. A ***PTPN22*** gén kódolta LYP szintén

az Src protein tirozin kinázok gátlása révén mérsékli a TCR szignalizációt, ezáltal gátolva a $CD4^+$ T-sejt aktivációt (14. ábra) [72, 73].

1.4.2. A 2-ES TÍPUSÚ DIABÉTESZ ÁLTALAM VIZSGÁLT GENETIKAI FAKTORAI

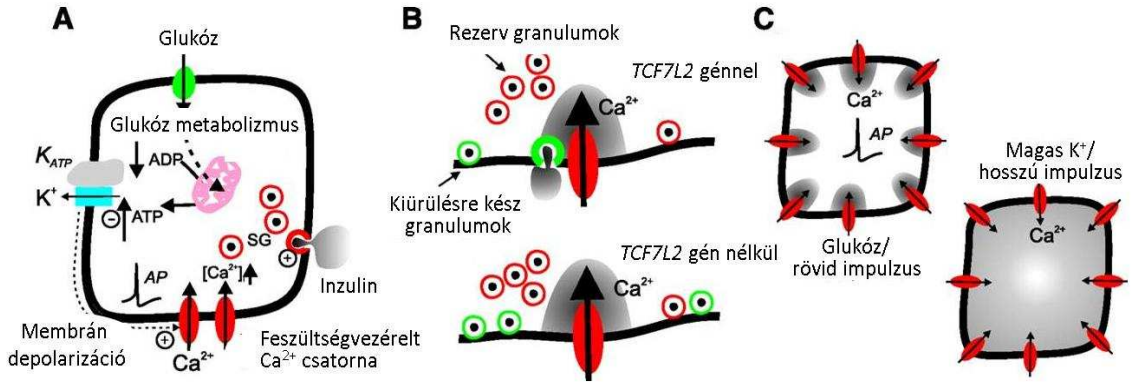
1.4.2.1. *TCF7L2* gén (transcription factor 7-like 2)

2006-ban Grant és munkatársai a deCODE vizsgálat során írták le a *DG10S478* jelű mikroszatellitát a *TCF7L2* génrégióban, ami az izlandi populációban hajlamosító hatással bírt a 2-es típusú diabétesz kialakulása szempontjából [74]. Később Zeggini és munkacsoportja tovább vizsgálták a 10q kromoszóma ezen régióját és a hármas intronban azonosítottak egy nem kódoló polimorfizmust (rs7903146), mely szorosan kapcsolt a *DG10S478*-hoz és erős asszociációt mutat a T2DM-mel [75]. Bár a *TCF7L2* génben azóta számos polimorfizmust leírtak, az rs7903146 jelű az, amelynek 2-es típusú diabétesszel való szoros kapcsolatát több különböző etnikumú, független populációban is sikerült megerősíteni [76-80]. A *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmusának hajlamosító alléljére vonatkozó globális relatív rizikó 1,46-nak bizonyult, ami a legerősebb a jelenleg ismert 2-es típusú diabétesz gének között [81].

Több tanulmány is részletesen vizsgálta a *TCF7L2* gén inzulinszekrécióban betöltött szerepét. *Shu és munkatársai* arról számoltak be, hogy a *TCF7L2* siRNS (kis interferáló RNS darabok) általi elnémítása az inzulinszekréció erős szuppressziójához vezetett a Langerhans-szigetekben, míg a *TCF7L2* fokozott expressziója stimulálta az inzulinelválasztást [82]. *Xavier da Silva és munkatársai* megerősítették a *TCF7L2* elnémítás glükóz indukálta inzulinelválasztást gátló hatását, de kísérletükben a *TCF7L2* fokozott expressziója nem változtatta meg az inzulinelválasztást [83]. Ugyanakkor bizonyították, hogy a *TCF7L2* elnémítása a magas extracelluláris K^+ koncentráció által kiváltott inzulinszekréciót nem befolyásolta. Kimutatták azt is, hogy a *TCF7L2* gén elnémítása a syntaxin-1 és munc18-1 exocitotikus fehérjék szintjét csökkenti, mivel azonban a fehérjék kiütése a glükóz- és a magas extracelluláris K^+ szint által kiváltott inzulinszekréciót egyaránt gátolja, nem valószínű, hogy e fehérjék csökkent

doi:10.14753/SE.2013.1801

expressziója egyedül lenne a felelős az inzulinszekréció elmaradásáért. A szerzők tovább vizsgálták a *TCF7L2* gén szekréciós defektust okozó hatását sejtfelszíni kapacitás mérések révén. Ismert, hogy a normális inzulinszekréciót kiváltó β-sejt akciós potenciál 0,1 másodpercnél rövidebb időtartamú. Ha a *TCF7L2* gént elnémították, a β-sejtek 2,5 másodpercig tartó depolarizációja 40%-os, 0,2 másodpercnél rövidebb ideig tartó depolarizációja 80%-os inzulinszekréció gátlást eredményezett (15.A ábra). A *TCF7L2* gén elnémítása tehát elsősorban a rövid depolarizáció okozta inzulinelválasztást gátolta, ami azt sugallja, hogy a *TCF7L2* gén defektusa a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák eloszlását befolyásolhatja (15.B ábra). Ezt támasztja alá, hogy a magas extracelluláris K^+ koncentráció okozta tartós depolarizáció a *TCF7L2* gén defektusa esetén is kiváltja az inzulinszekréciót. A magas extracelluláris K^+ az intracelluláris Ca^{2+} globális emelkedése révén valamennyi plazma membrán release-granulum exocitózisát kiváltja függetlenül attól, hogy kapcsolatban állnak-e vagy sem a feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornákkal (15.C ábra) [84].



15. ábra: A *TCF7L2* gén szerepe a β-sejtek inzulinszekréciójában

A *TCF7L2* gén terméke, a TCF4 protein transzkripciós faktorként működik, szerkezetében tartalmaz egy DNS-kötő domént, mely - a Wnt receptorhoz való kapcsolódására bekövetkező aktiváció után – a β-katenint köti [85]. A katenin-TCF4 komplex a glükagon gén (*GCG*) expresszióját indukálja, ez a gén kódolja a táplálékfelvétel hatására a bélepitél specifikus L-sejtjeiben elválasztódó, inkretin hormonok közé tartozó GLP-1 fehérjét (glucagon-like peptid 1) [86]. A GLP-1 az

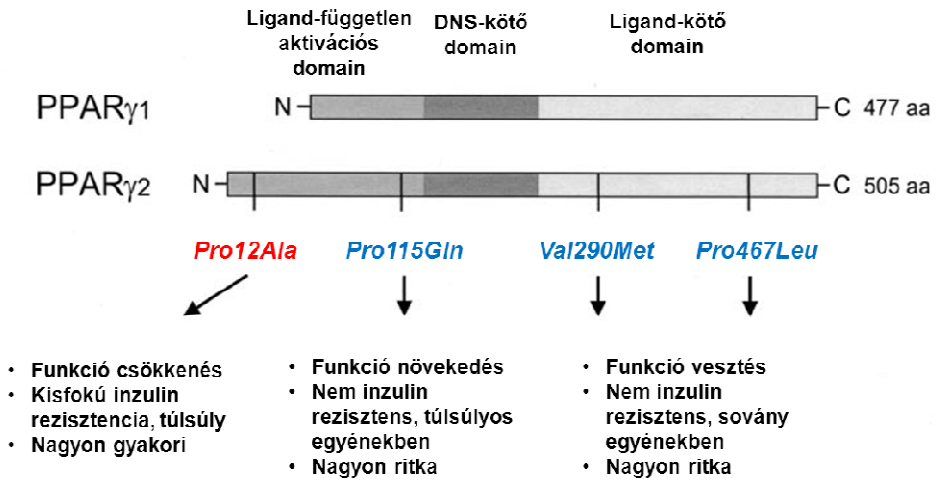
inzulinszekréciót serkenti, a glükagonelválasztást szupprimálja, a gyomorürülést lassítja, a teltségérzetet növeli és kísérleti körülmények között elősegíti a hasnyálmirigy β-sejtek proliferációját is [87]. Ismert, hogy 2-es típusú diabéteszben szenvedő betegekben a GLP-1 szekréciója jelentősen csökken, a funkciója azonban nem károsodik [88]. A *TCF7L2* gén és a GLP-1 közötti kapcsolat miatt feltételezhető, hogy a *TCF7L2* génpolimorfizmusok a károsodott inkretinrendszer révén, közvetlenül a β-sejteken keresztül fejtik ki 2-es típusú diabéteszre hajlamosító hatásukat [89]. A patomechanizmus teljes részletességében még nem ismert, a megváltozott TCF4 termelés és/vagy funkció azonban több mechanizmus alapján is diabétesz kialakulásához vezethet, felmerült a β-sejt tömeg csökkenésének, az inzulintermelés és/vagy kibocsátás károsodásának illetve a GLP-1 szignalizáció zavarának a lehetősége is [90, 91].

Mindezeken túl a Wnt szignalizációs útvonal szabályozza az adipogenezist és a zsírsejtek differenciálódását is. Kísérlettel igazolták, hogy a hajlamosító *T-allélre* homozigóta egyénekben csökkent a zsírszövetben a *TCFL2* gén expressziója. A legerősebb diabetogenitással bíró rs7903146 polimorfizmus hajlamosító alléljéről kimutatták, hogy nem képes kötni azt az adipocita prekurzorokban képződő GATA3 fehérjét, ami a preadipocita-adipocita átalakulást szabályozza [92].

1.4.2.2. *PPARG* gén (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)

A *PPARG* gén a 3-as kromoszómán található (3p25) és a peroxiszóma proliferációt aktiváló receptor gamma fehérjét kódolja, mely magreceptorként funkcionál és különböző gének transzkripcióját szabályozza. A génről alternatív mRNS splicing révén kétféle fehérje képződhet: a PPARG1, ami a legtöbb szövetben kifejeződik és a PPARG2 izoforma, ami a zsírszövetre specifikus és kulcsszerepet játszik az adipociták differenciálódásának szabályozásában. A PPARG fehérje bizonyos zsírsavak, prosztanoidok és tiazolidindionok hatására aktiválódik és a retinoid-X receptorral heterodimerizálódva megköti a DNS specifikusan PPAR-érzékeny elemeit, ami elősegíti számos célgén transzkripcióját [93].

A *PPARG* génben számos polimorfizmust leírtak (pl. Pro115Gln, Val290Met, Pro467Leu), de a legnagyobb jelentősége a nagyon elterjedt, funkció-csökkenéssel járó Pro12Ala polimorfizmusnak van, melyet a *PPARG* gén 12. exonjában a CCA-GCA missense mutáció eredményez (16. ábra). A Pro12Ala polimorfizmus (rs1801282) a kódolt aminosavláncban egy prolin-alanin cserét okoz, ami módosítja a képződő PPARG2 fehérje funkcióját [93].



16. ábra: A *PPARG* gén mutációi okozta fehérje variánsok

2000-ben igazolták a *PPARG* gén Pro12Ala polimorfizmusa és 2-es típusú cukorbetegség közötti kapcsolatot [94], a metaanalízis eredménye szerint a vad Pro allél hordozása közel 1,2-szeresére növeli a diabétesz kockázatot [95].

A *PPARG* gén Pro12Ala polimorfizmusának hatásmechanizmusát vizsgálva feltételezhető, hogy az Ala variáns a zsírsejtek transzkripciós aktivitását változtatja meg, elsősorban az inzulinérzékenységet javítja, ami a lipolízis fokozott szuppressziójában nyilvánul meg. Ennek eredményeképp csökken a szabad zsírsav felszabadulás, aminek következtében javul a harántcsíkolt izomzat és a máj inzulinérzékenysége is, nő az izomszövet glükóz felvétele és csökken a máj glükóz kibocsátása. A Pro12Ala polimorfizmus inzulinérzékenységre gyakorolt hatását feltehetőleg valamely, a zsírszövet által termelt és a PPARG transzkripciós kontrollja alatt álló adipocitokin (pl. TNF-α, rezisztin, adiponektin) közvetíti.

A PPARG aktivátorokról kimutatták, hogy elősegítik a preadipociták kis zsírsejtekké történő differenciálódását, melynek során nő a lipoproteinlipáz, a zsírsavtranszportáló protein (FATP) és az acil-CoA-szintetáz enzimeket kódoló, lipogén génszakaszok expressziója. A PPARG-aktivitás növekedésével nő a zsírraktározásra alkalmas érett zsírsejtek száma. Az újonnan differenciálódott, inzulinszenzitív, kis zsírsejtek megjelenésével nő a zsírtárolási kapacitás és csökken a plazma szabad zsírsav szint [37].

Ellentmondásosnak tűnhet, hogy a *PPARG* Pro12Ala polimorfizmus miatti csökkent transzkripciós aktivitása és a *PPARG* farmakológiai aktiválása (tiazolidindion által) is javítja az inzulinérzékenységet, a magyarázat abban rejlik, hogy eltérő metabolikus utak közvetítik a *PPARG* szuprafiziológiás stimuláltan (tiazolidindion) és mérsékelten csökkent (Pro12Ala polimorfizmus) hatását [93].

1.4.2.3. *CDKN2A/2B gén* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A and 2B)

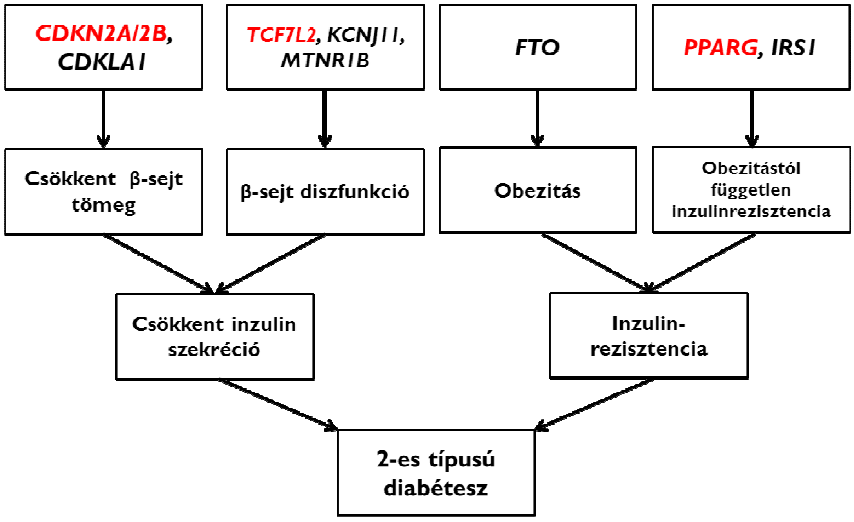
A *CDKN2A* és a *CDKN2B* a 9-es kromoszóma p21 régiójában található tumor szuppresszor gének, fehérjetermékeik fő funkciója a CDK4, CDK6 ciklin-függő kinázok és a p53 tumor szuppresszor protein gátlása [96]. A gének közelében levő rs10811661 polimorfizmus pontos hatása még nem ismert, de feltételezhető, hogy közvetlenül befolyásolja a *CDKN2A/2B* gén működését.

Bár a Langerhans-szigetekben a β-sejt proliferáció a születés után csökken, a felnőtt életben a β-sejt proliferáció feltehetően szerepet játszik az inzulinrezisztencia miatt megnövekedett inzulinigényhez való alkalmazkodásban. Egerekben a *Cdkn2a* gén fokozott expressziója csökkent β-sejt regenerálódással jár az életkor előrehaladtával (82). A *Cdkn2a* gén hajlamosító alléljének hordozása a Cdk4 fehérjetermék mennyiségi csökkenésével, a β-sejtek proliferációjának károsodásával és a β-sejtek tömegének csökkenésével járt, míg Cdk4 fehérje teljes hiánya cukorbetegség kialakulását eredményezte [97, 98]. A háttérben epigenetikai hatás feltételezhető, mert idős egerekben a *Cdkn2a* és az *Ezh2* (hiszton-metiltranszferáz) gének fokozott expressziója egybeesett a gének csökkent hiszton trimetilációjával [41].

Egészséges emberekben kimutatták, hogy a *CDKN2A/2B gén* hajlamosító *T alléljének* hordozása a glükóz indukálta inzulinkibocsátás károsodásához vezet [99, 100]. Az azonban nem ismert, hogy emberben ez a variáns a Langerhans-szigetek csökkent β-sejt proliferációjával jár-e.

1.4.2.4. A 2-es típusú diabéteszre hajlamosító gének közötti kölcsönhatás

A 2-es típusú diabétesz rizikó variánsaira vonatkozó vizsgálatok azt mutatták, hogy a legtöbb gén az inzulinszekréció helyett az inzulinhatás zavarát okozza, a β-sejt funkció (pl. ***TCF7L2***, *KCNJ11*, *MTNR1B* gén), a β-tömeg (***CDKN2A/2B***, *CDKLA1* gén) vagy esetleg mindkettő öröklött rendellenessége kritikus a betegség irányú progresszió szempontjából. Az elsődlegesen az inzulinhatást befolyásoló lókuszok obezitásfüggő (pl. *FTO* gén) és az elhízástól független (pl. ***PPARG***, *IRS1* gén) mechanizmusok révén vesznek részt a patomechanizmusban (17. ábra) [40].



17. ábra: A 2-es típusú diabéteszre hajlamosító gének szerepe a patomechanizmusban

A legjelentősebb 2-es típusú diabéteszre hajlamosító gének közül a *TCF7L2*, az *SLC30A8* és a *CDKN2A/2B* a Wnt jelátviteli-, a cinktranszport, valamint a sejtciklus szabályozási útvonalhoz kapcsolódnak, ami arra utal, hogy ezeknek a funkcióknak fontos szerepük van a normális β-sejt működés meghatározásában [40].

doi:10.14753/SE.2013.1801

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. RÖVID ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám során *asszociációs analízisen alapuló eset-kontroll* és *klinikai vizsgálatokat* végeztem.

Az **eset-kontroll vizsgálatok** elsődleges célja az ismert genetikai determinánsok diabetogén hatásának felmérése volt a különböző diabétesz formákban a magyar és az európai populációkban. Vizsgáltam a hajlamosító genetikai variánsok geográfiai variabilitását, a génhatások erősségének az egyes diabétesz típusok közötti és az európai népcsoportokon belüli heterogenitását.

A **klinikai vizsgálatok** célja a klinikai tényezők (életkor, nem, testtömeg-index) és a genetikai faktorok diabetogén hatáserőssége, illetve a hajlamosító génvariáns hordozása és a diabétesz progresszió (C-peptid értékkel jellemzett reziduális β-sejt funkció) közötti lehetséges összefüggés elemzése volt.

Bár a klinikai genetikai vizsgálatok döntően populáció-genetikai jelentőséggel bírnak, egy ritka autoimmun triász esetén a közös prediszponáló genetikai faktorok meghatározása során lehetőségem nyílt egy **esettanulmány** keretében is megvizsgálni a génkölcsönhatások betegség-fenotípusra gyakorolt komplex hatását.

2.2. A VIZSGÁLATOK RÉSZLETES ISMERTETÉSE

<u>1. vizsgálat:</u> A látens autoimmun diabétesz genetikai hátterének vizsgálata

Elméleti háttér: A jelenleg érvényes klasszifikáció szerint a felnőttkori látens autoimmun diabétesz az 1-es típusú cukorbetegség lassú progressziójú alcsoportja. Ugyanakkor a LADA fenotípusosan inkább a 2-es típusú cukorbetegséghez hasonlít és a legújabb genetikai kutatások során felmerült, hogy a 2-es típusú cukorbetegségre hajlamosító *TCF7L2* génvariánsa növeli a LADA kialakulásának kockázatát is. Az európai populációkra vonatkozó genetikai vizsgálatok eredményei ellentmondásosak.

Feltett kérdések:

1. A 2-es típusú diabétesszel legerősebben asszociálódott *TCF7L2* gén rs7903146, *CDKN2A/2B* gén rs10811661 és *PPARG* gén rs1801282 polimorfizmusai hajlamosítanak-e felnőttkori látens autoimmun diabéteszre a magyar populációban?
2. A *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmusa valóban hozzájárul-e a felnőttkori látens autoimmun diabétesz kialakulásához az európai származású egyénekben?
3. A vizsgált génvariánsok és a betegek klinikai adatai között van-e összefüggés?

2. vizsgálat: A 2-es típusú diabétesz genetikai hátterének vizsgálata

Elméleti háttér: A 2-es típusú cukorbetegség poligénes öröklődésű kórkép, eddig összesen mintegy 40 lókuszt hoztak kapcsolatba a betegség kialakulásával. Ezek alacsony penetranciájú, önmagukban csekély diabetogén hatással bíró gének, melyeknek populációs varianciája széles határok között mozog.

Feltett kérdések:

1. A GWA vizsgálatok eredménye szerint a 2-es típusú diabétesszel legerősebben asszociálódott *TCF7L2* gén rs7903146, *CDKN2A/2B* gén rs10811661 és *PPARG* gén rs1801282 polimorfizmusok hajlamosítanak-e 2-es típusú diabéteszre a magyar populációban?
2. A vizsgált génvariánsok és a betegek klinikai adatai között van-e összefüggés?
3. Milyen a *TCF7L2* gén geográfiai variabilitása és a génhatások erősségének heterogenitása az egyes diabétesz típusok között illetve az európai népcsoportokon belül?

3. vizsgálat: Az 1-es típusú diabétesz genetikai hátterének vizsgálata

Elméleti háttér: Az 1-es típusú cukorbetegség poligénes öröklődésű kórkép, eddig 41 lókuszt hoztak kapcsolatba a betegség kialakulásával. A *HLA-DQ-DR* poligénes szuperlókuszként a családi halmozódások 40-50%-áért felelős. A minor génvariánsok

közül az *inzulin gén* és a *PTPN22* gén becslések szerint további 15%-ban határozza meg a betegség iránti fogékonyságot.

Feltett kérdések:

1. Az *inzulin gén* rs689 és a *PTPN22* gén rs2476601 polimorfizmusok hajlamosítanak-e 1-es típusú diabéteszre a magyar populációban?
2. A vizsgált génvariánsok és a betegek klinikai adatai között van-e összefüggés?

4. vizsgálat: Egy autoimmun betegségtriász genetikai hátterének vizsgálata

Elméleti háttér: Az autoimmun betegségek genetikai és környezeti faktorok kölcsönhatása során akkor alakulnak ki, ha az immunrendszer működészavara miatt a saját antigének felismerése hibásan történik és a saját antigén iránti immuntolerancia elveszik. Az autoimmun betegségek társulási hajlama ismert, de autoimmun betegségtriász kialakulása meglehetősen ritka.

Feltett kérdés:

1. Milyen a major és a minor genetikai faktorok betegség-fenotípus kialakításban játszott szerepe?

doi:10.14753/SE.2013.1801

3. MÓDSZEREK

3.1. A VIZSGÁLT POPULÁCIÓK JELLEMZŐI

3.1.1. BETEGEK ÉS DIAGNOSZTIKAI KRITÉRIUMOK

Diagnosztikai kritériumok: Valamennyi betegcsoport diagnózisa a WHO 1998 óta érvényben levő irányelvein alapult [101].

- **1-es típusú diabétesz:** a diagnózis felállításakor a betegek 15 évesnél fiatalabbak voltak és klasszikus diabéteszes tüneteket mutattak (poliuria, polidipszia, polifágia, testsúlycsökkenés), az éhomi szérum C-peptid szintjük a normálisnál alacsonyabb volt (<0,35 nmol/l vagy <1,05 ng/ml), a diagnózis felállításától kezdve azonnal inzulinterápiát igényeltek és legalább egy β-sejt autoimmunitási markerre (ICA, GADA, IAA, IA-2A) pozitívnak bizonyultak.

  Az *1.* és a *3. vizsgálatban* a Semmelweis Egyetem I. Sz. Gyermekgyógyászati Klinikán 1-es típusú diabétesszel újonnan diagnosztizált gyermek klinikai és genetikai adatait elemeztem. A *4. vizsgálatban* egy, a Gyulai Pándy Kálmán Kórház Gyermekgyógyászati Osztályán gondozott gyermek adatait használtam fel. Az összes beteg szerepelt a *Magyar Gyermekdiabetes Regiszter* adatbázisában is, mely része az *EURODIAB* nemzetközi gyermekkori 1-es típusú diabétesz epidemiológiai hálózatának.

- **Felnőttkori látens autoimmun diabétesz:** a betegek 35 éves vagy idősebb életkorúak voltak, a diabétesz-asszociált autoantitestek (ICA, GADA, IAA, IA-2A) közül legalább egy pozitív volt és nem kaptak inzulint a cukorbetegség diagnózisát követő 6 hónapon belül.

  Az *1.* és a *2. vizsgálatban* szereplő LADA betegeket a Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinikán diagnosztizálták és gondozták.

- **2-es típusú diabétesz:** a betegek 35 évesnél idősebbek voltak, autoantitest vizsgálatuk negatív lett, anamnézisükben nem szerepelt ketonuria és/vagy ketoacidózis, terápiájuk kezdettől diétára és orális antidiabetikumokra épült.

Az *1.* és a *2. vizsgálatban* szereplő 2-es típusú diabéteszes betegeket a Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinikán diagnosztizálták és/vagy gondozták.

3.1.2. KONTROLLOK

Valamennyi vizsgálatban szerelő beteg és kontroll személy európai származású volt (3. táblázat).

3. táblázat: A vizsgálatokba bevont beteg- és kontrollpopulációk

Vizsgálat	Vizsgált betegcsoport	Vizsgált gének	Vizsgálat típusa	Betegek	Kontrollok
1.	LADA	*TCF7L2, CDKN2A/2B, PPARG*	eset-kontroll	211 LADA, 545 T1DM	1497
			metaanalízis	999 LADA, 1880 T1DM	5358 5163
2.	T2DM	*TCF7L2, CDKN2A/2B, PPARG*	eset-kontroll	1297 T2DM	1497
			metaanalízis	4529 T2DM	5163
3.	T1DM	*PTPN22, INS*	eset-kontroll	572 T1DM	236
			eset-kontroll	207 T1DM	136
4.	autoimmun triász	*HLA DRB1-DQA1-DQB1, PTPN22, CTLA4*	eset-tanulmány	1 eset	-

Az *1-3. eset-kontroll vizsgálatok magyar részéhez* a kontroll populációt nem rokon, anyagcsere-egészségesnek tartott magyar véradók képezték. A mintagyűjtéshez az Országos Vérellátó Szolgálat és az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága is hozzájárult (ETT TUKEB, engedély száma: 88/KO/2005 kiegészítés). A vérvételek a *Budai Regionális Vérellátó Központ* (1113 Budapest,

Karolina út 19-21.) által szervezett nyilvános véradások keretében történtek. Minden, a genetikai vizsgálatba beleegyező véradó egy kérdőívet töltött ki, melyben a személyes adatok (életkor, nem és származás) mellett rákérdeztem a véradó saját és az első-/másodfokú rokonainak anamnézisére. Anyagcsere-egészségesnek tekintettem azokat a személyeket, akiknek saját, vagy első-/másodfokú rokonai anamnézisében nem szerepelt semmilyen típusú diabétesz, autoimmun betegség vagy genetikai szindróma, és akiknél az éhomi vércukorérték normális tartományban (3,5-5,3 mmol/l) volt. Ezt követően a vizsgálatban résztvevő véradóknál antropometriai mérésekre (testsúly, testmagasság) került sor.

Az *1.* és *2. vizsgálat metaanalízisében* a kontrollok a vizsgálatban résztvevő országok anyagcsere-egészséges tagjai közül kerültek ki.

A *4. vizsgálathoz* nem volt szükség kontroll csoportra.

3.1.3. KLINIKAI ADATOK

A szérum **C-peptid** szint meghatározása a diabétesz diagnózisakor, éhomi mintából, radioimmunoassay segítségével történt, normális tartománynak a 0,35-1,15 nmol/l (SI egység, ami megfelel 1,05-3,45 ng/ml-nek) közé eső értékeket tekintettem.

A **glikált hemoglobin A_{1c}** (HbA_{1c}) koncentrációjának mérése turbidimetriás immuninhibíciós módszerrel történt, a normális érték 4-6% volt.

A **testtömeg-indexet** (BMI) a testsúly(kg)/testmagasság$(m)^2$ képlet alapján számoltam. A BMI adatokat felnőttek és gyermekek esetén is a WHO klasszifikációs rendszere alapján osztottam két csoportba:

- nem-túlsúlyos egyének: felnőtteknél BMI < 25 kg/m^2, gyermekeknél BMI < +1SD,
- túlsúlyos egyének: felnőtteknél BMI ≥ 25 kg/m^2, gyermekeknél BMI ≥ +1SD.

doi:10.14753/SE.2013.1801

3.1.4. VIZSGÁLATI KÖRÜLMÉNYEK

Megfelelő tájékoztatás után a genetikai vizsgálatba valamennyi résztvevő illetve a gyermekek esetén törvényes képviselőjük is beleegyezett. A vizsgálatokat az Orvosok Világszövetsége Helsinki Deklarációjának alapelveiben foglaltaknak megfelelően végeztem *(Helsinki Declaration, sixth revision 2008.)*, és azokat az ETT TUKEB (engedély száma: 88/KO/2005) is engedélyezte.

A diabéteszes betegektől és a kontroll személyektől 4 ml EDTA-val vagy citráttal antikoagulált perifériás vér került levételre, Venosafe™ és BD Vacutainer™ zárt vérvételi rendszer használatával. A mintákat felhasználásig -20°C-on tároltam.

A kontroll és a diabéteszes személyek klinikai és genetikai adatainak tárolásához és kiértékeléséhez Microsoft Access adatbázist használtam. Valamennyi mintát anonim módon, kóddal ellátva kezeltem. A kód a diabétesz típusát jelző négy karakterből és négyjegyű sorszámból állt (pl. T1DM0001, LADA0623, T2DM1234). A kontroll minták kódjában az OVSZ betűk után szerepelt a négyjegyű sorszám (pl. OVSZ0051).

3.2. GENETIKAI VIZSGÁLATOK

3.2.1. DNS IZOLÁLÁS

A DNS izolálás **standard kisózásos módszerrel** történt, melyhez minden esetben EDTA-val vagy citráttal alvadásgátolt 4 ml perifériás vért használtam. A munka során sterilizált eszközökkel dolgoztam. A -20°C-on tárolt vérminták esetén gyors olvasztással és alapos keveréssel értem el a nukleinsavak minél kisebb mértékű sérülését és a minták homogenizálását. A sejtlízist 4°C-os vörösvértest *lízis pufferrel* végeztem, majd a mintákat ROTANTA centrifugával[1] 2500 rpm-en, 4°C-on 10 percig centrifugáltam. A felülúszót *Haemosol oldatban* semlegesítettem. A mosási lépéseket *ultratiszta vízzel* végeztem, közben a mintákat BIOFUGEPICO centrifugával[2] 13000 rpm-en, szobahőmérsékleten 1 percig centrifugáltam. A mosási lépést addig ismételtem,

amíg az üledék homogén, lazac színű lett. A biológiai membránok megbontása és az enzimes emésztés *Proteinase-K mix* hozzáadásával történt, mely az endogén nukleázok inaktiválásához szükséges komplexánst is tartalmazta. A mintákat 15 percig inkubáltam 55°C-on DRI-BLOCK DB3 száraz inkubátorban[3]. A fehérjéket szelektív kicsapással távolítottam el 5 M *NaCl-oldat* alkalmazásával, ezt követően BIOFUGEPICO centrifugával[2] 13000 rpm-en, 5 perc szobahőmérsékleten történő centrifugálás után a nukleinsavak a felülúszóba szeparálódtak. A felülúszót új Eppendorf csőbe pipettáztam, majd 99,5%-os, 4°C-os *etanol* hozzáadásával precipitáltam a DNS-t. A látható DNS-t 70%-os 4°C-os *etanolba* áthelyezve rehidratáltam. Az alkohol leszívása után a DNS-t 37°C-on száraz inkubátorban addig szárítottam, amíg az alkohol teljesen elpárolgott. Ekkor a DNS-t *TE-ben* feloldottam, majd 37°C-on száraz inkubátorban tovább inkubáltam a teljes beoldódásig (4. táblázat).

4. táblázat: A DNS izolálás során használt oldatok összetétele

Név	Összetevők
Haemosol oldat	5 v/v% Haemosol solution[4], csapvíz
Lízis puffer	12 mM Tris-HCl, 320 mM szacharóz, 1% Triton-X-100, 5 mM $MgCl_2$, MQ víz, pH 7,5
Proteinase-K mix	Proteinase-K puffer, 0,08 ng/ml Proteinase-K[5], 20% SDS, MQ víz
Proteinase-K puffer	350 mM NaCl, 120 mM EDTA, MQ víz, pH 7,5
TE	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7,5

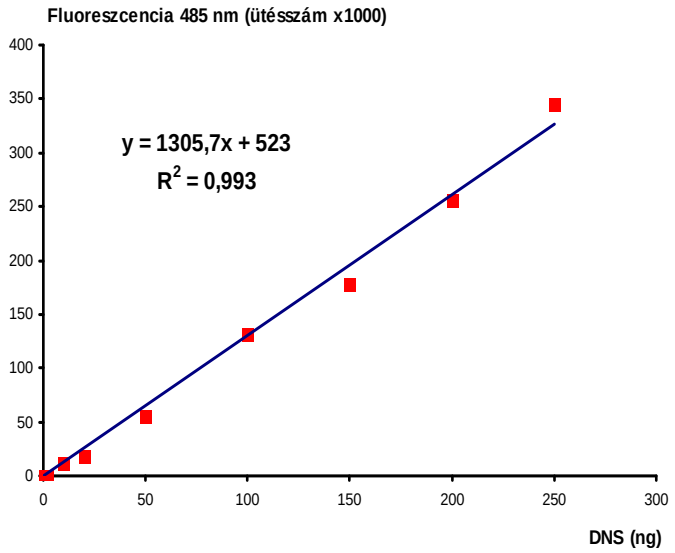
3.2.2. DNS KVANTITÁLÁS

A DNS koncentráció meghatározásához Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit-et[6] használtam [102].

Első lépésben 96 lyukú plate-ben 50-szeresre hígítottam a mintákat, majd egy éjszakán át 37°C-on inkubáltam. Második lépésben 20-szorosra hígítottam a mintákat, így a végső hígítás 1000-szeres lett. Az összemérést duplikátumban végeztem. Hígítási sort készítettem a gyártó által biztosított λ-DNS törzsoldatból. Minden mintához és a

doi:10.14753/SE.2013.1801

hígítási sorhoz PicoGreen oldatot (TE-vel 200-szorosra hígított PicoGreen törzsoldat) adtam, a plate-ket DELFIA PLATESHAKE-kel[7] 5 percig rázattam, majd a minták fluoreszcens jelét CHAMELEON MULTILABEL DETECTION PLATFORM platereader-en[8] mértem le (exmisszió: 485 nm, emisszió: 545 nm). A koncentráció meghatározása a standard hígítási sor alapján történt (18. ábra).



18. ábra: A DNS koncentráció meghatározásához használt standard hígítási sor

3.2.3. GENOTIPIZÁLÁS

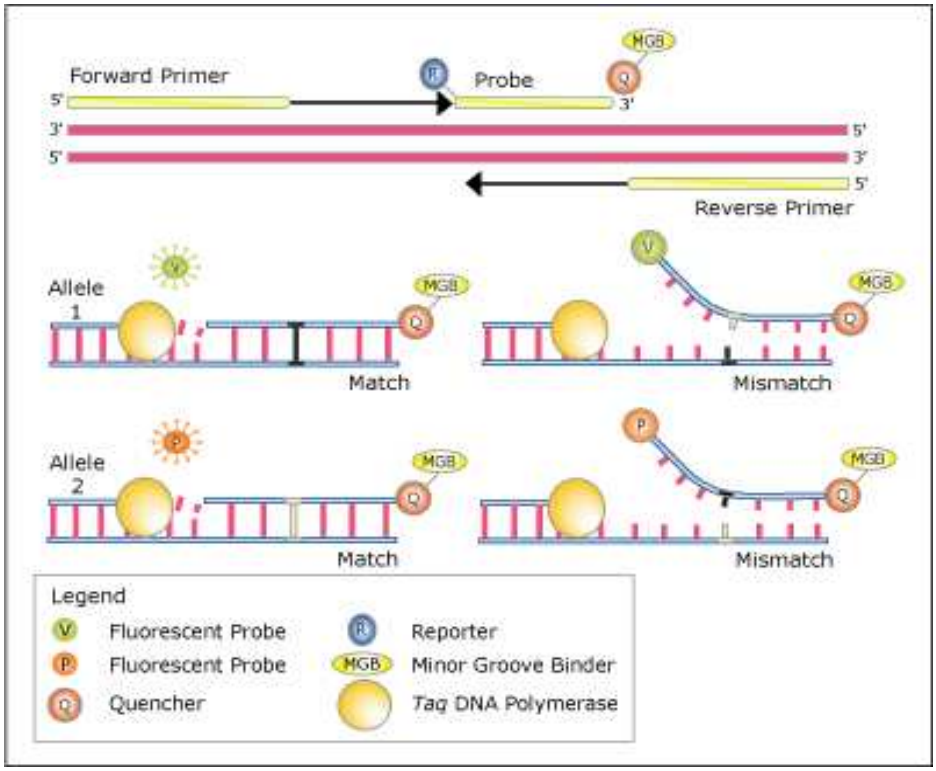
3.2.3.1. TAQMAN® ASSAY

A *PTPN22*, az *INS*, a *CTLA4*, a *TCF7L2*, a *CDKN2A/2B* és a *PPARG* gén polimorfizmusainak vizsgálatához TaqMan® SNP Genotyping Assay-t[22] használtam (19. ábra).

Az előre gyártott *master mix* nagy feleslegben tartalmazza a Taq DNS polimerázt, a négy dezoxi-ribonukleozid-trifoszfátot és a reakció optimális végbemeneteléhez szükséges anyagokat. Az adott polimorfizmusra specifikus *genotyping assay*

tartalmazza a forward és reverse primereket, valamint a fluoreszcens festékkel jelölt allélspecifikus oligonukleotid próbákat.

A próbákat az adott SNP két allélvariánsához tervezték, az 5’ végüket VIC vagy FAM fluoreszcens festékkel jelölték, a 3’ végükre pedig a fluoreszcens jelet elnyelő quenchert kötöttek. A próbákat úgynevezett Minor Groove Binderrel (MGB) stabilizálták. A forward primer az antisense DNS szálhoz, a reverse primer a sense DNS szálhoz hibridizál. A próbák allélspecifikusan kötődnek a DNS-hez. Amennyiben létrejön az allélspecifikus kötődés, a Taq DNS polimeráz a próbához érve 5’ nukleáz aktivitás révén elhasítja a próbát, így a festék eltávolodik a quenchertől és fluoreszcens jel detektálható. Ha nem jön létre az allélspecifikus hibridizáció, akkor a próba nem hasítódik, így mivel a próbákon levő festék és a quencher közel helyezkednek el egymáshoz, a quencher elnyeli a fluoreszcens jelet [103].



19. ábra: A TaqMan® genotipizáló assay működési elve

A PCR reakcióelegyet a gyártó javaslatai szerint állítottam össze 96 lyukú, fekete ThermoFast® plate-ekben[9], mintánként 20 ng genomiális DNS felhasználásával. Minden mintát duplikátumban vizsgáA minták amplifikálását DNA Engine Dyad® Delier

doi:10.14753/SE.2013.1801

Thermal Cycler[11] készülékben végeztem. Elődenaturálást, majd a minta térfogatától függően (5 µl vagy 15 µl) 52 illetve 40, két lépésből álló ciklust alkalmaztam (5. táblázat).

5. táblázat: A különböző térfogatú PCR reakció elegyek összetétele

Reagens	Törzsoldat koncentráció	Végső koncentráció	Lyuk	Törzsoldat koncentráció	Végső koncentráció	Lyuk
Master Mix	2x	1x	7,5µl	2x	1x	2,5µl
Genotyping Assay	20x	0,5x	0,375µl	20x	0,5x	0,175µl
MQ víz	-	-	6,125µl	-	-	1,375µl
DNS	20ng/µl	20ng/lyuk	1µl	20ng/µl	20ng/lyuk	1µl
Térfogat	-	-	15µl	-	-	5µl

Az elődenaturálás során 95°C-on 10 perc alatt megtörtént az enzimaktiváció és a DNS láncok szétválása. Ezt követően a ciklus során az első lépésben 92°C-on, 15 másodperc alatt a láncok véglegesen szétváltak (denaturáció), a második lépésben 1 perc alatt 60°C-on a primerek kötődtek (annealing), és a DNS szintézis (elongáció) is végbement. A ciklus végén a mintákat 7°C-ra hűtötte a készülék (6. a, b táblázat).

A minták fluorimetriás detektálását CHAMELEON MULTILABEL DETECTION PLATFORM platereaderrel[8] végeztem, a fluoreszcens festékekre jellemző excitációs és emissziós hullámhosszokon (VIC: ex/em: 532/560 nm, FAM: ex/em: 485/535 nm). A háttérzaj meghatározásához no template controlt (NTC) használtam, ami TaqMan master mixet és genotipizáló assay-t tartalmazott, DNS mintát azonban nem. Ebben az esetben is duplikátumban dolgoztam, a detektált értékek átlagával számoltam. A kapott jel/zaj arányokat koordinációs rendszerben ábrázoltam, ahol az abszcisszán a VIC, az ordinátán pedig a FAM festékre jellemző jel/zaj arány látható. Bár a három genotípus csoport (két homozigóta és egy heterozigóta) jól körülhatárolható, mégis a precíz számoláshoz szükséges egy jel/zaj határvonal meghúzása, amely fölötti értékeket emelkedett jelintenzitásnak tekinthetjük. Azokat a mintákat, amelyek a határvonalra vagy az alá estek újragenotipizáltam (20. ábra).

doi:10.14753/SE.2013.1801

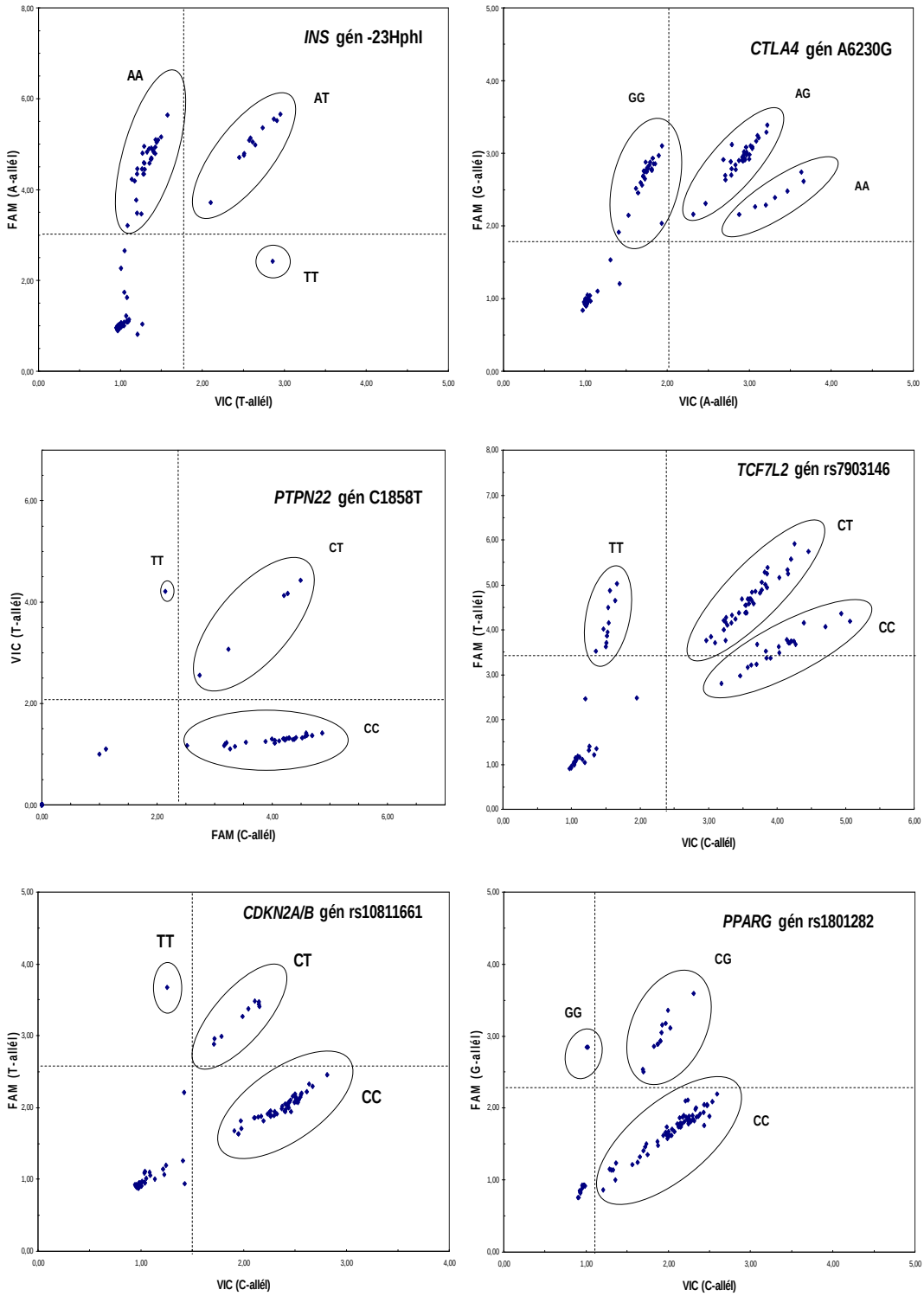
6. a táblázat: A PCR reakciók körülményei az 1-es típusú diabétesz-asszociált gének esetén

Vizsgált gén	***PTPN22 gén***	***INS gén***	***CTLA4 gén***
SNP azonosító	rs2476601	rs689	rs3087243
Lokalizáció	Chr.1:114377568	Chr.11: 2182224	Chr.2: 204738919
SNP típus	C/T, tranzíciós szubsztitúció	A/T, transzverziós szubsztitúció	A/G, tranzíciós szubsztitúció
OMIM szám	600716	176730	123890
VIC/FAM próba	ACCACAATAAA TGATTCAGGTGT CC**[C/T]**TACAGG AAGTGGAGGGG GGATTTCA	CATGGCAGAAG GACAGTGATCT GGG**[A/T]**GACAG GCAGGGCTGAG GCAGGCTGA	TCTTCACCACTA TTTGGGATATAA C**[A/G]**TGGGTTA ACACAGACATA GCAGTCC
PCR körülmények			
▪ **ciklusszám**	40 ciklus	52 ciklus	40 ciklus
▪ **elődenaturáció**	95ºC – 10 min	95ºC – 10 min	95ºC – 10 min
▪ **denaturáció**	92ºC – 15 sec	92ºC – 15 sec	92ºC – 15 sec
▪ **annealing, elongáció**	60ºC – 1 min	60ºC – 1 min	60ºC – 1 min
▪ **térfogat**	15 µl	5 µl	15 µl

6. b táblázat: A PCR reakciók körülményei a 2-es típusú diabétesz-asszociált gének esetén

Vizsgált gén	***TCF7L2 gén***	***CDKN2A/2B gén***	***PPARG gén***
SNP azonosító	rs7903146	rs10811661	rs1801282
Lokalizáció	Chr.10:114758349	Chr.9:22134094	Chr.3:12393125
SNP típus	C/T, tranzíciós szubsztitúció	C/T, tranzíciós szubsztitúció	C/G, transzverziós szubsztitúció
OMIM szám	602228	600160	601487
VIC/FAM próba	TAGAGAGCTAA GCACTTTTTAGA TA**[C/T]**TATATA ATTTAATTGCCG TATGAGG	CAGCTCACCTCC AGCTTTAGTTTT C**[C/T]**CATGACA GTAAGTCTATTA CCCTCC	AACTCTGGGAG ATTCTCCTATTG AC**[C/G]**CAGAAA GCGATTCCTTCA CTGATAC
PCR körülmények			
▪ **ciklusszám**	40 ciklus	52 ciklus	52 ciklus
▪ **elődenaturáció**	95ºC – 10 min	95ºC – 10 min	95ºC – 10 min
▪ **denaturáció**	92ºC – 15 sec	92ºC – 15 sec	92ºC – 15 sec
▪ **annealing, elongáció**	60ºC – 1 min	60ºC – 1 min	60ºC – 1 min
▪ **térfogat**	15 µl	5 µl	5 µl

doi:10.14753/SE.2013.1801

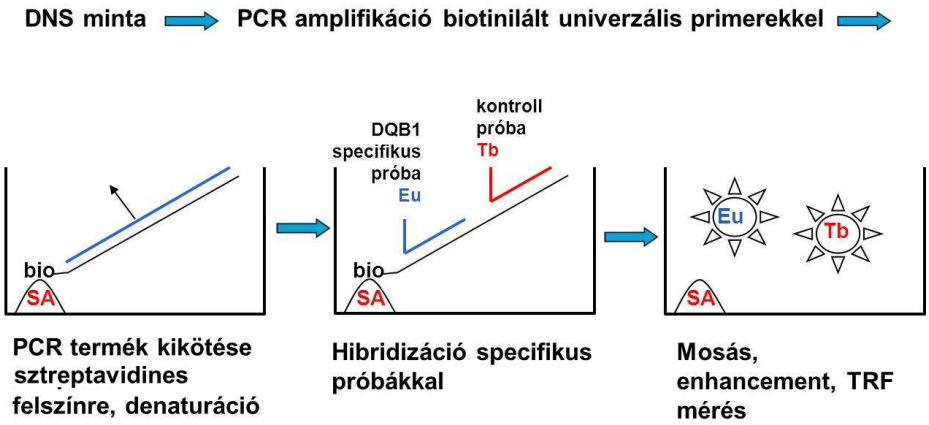


20. ábra VIC és FAM festékekre jellemző jel/zaj arányok az egyes gén-polimorfizmusok esetén

doi:10.14753/SE.2013.1801

3.2.3.2. DELFIA ASSAY

A *HLA DQB1* meghatározás lanthanoid alapú oligonukleotid hibridizálással, DELFIA (dissociation-enhanced lanthanide fluoro-immonoassay) módszerrel történt. Ennek főbb lépései: 1. polimeráz láncreakció (PCR) során biotinilált primerekkel történő amplifikáció, 2. PCR termékek kikötése sztreptavidines felszínre, denaturáció, 3. hibridizáció lanthanoid alapú oligonukleotid próbákkal, 4. mosás, enhancement és TRF mérés (21. ábra).



21. ábra: A DELFIA Assay működési elve

Vizsgálati körülmények: a reakcióelegyet ThermoFast® 96 lyukú plate-kben[9] állítottam össze, majd Microseal-A filmmel[10] zártam le azokat. A minták amplifikálását DNA ENGINE DYAD® DELIER THERMAL CYCLER[11] készülékben végeztem. A mintát duplikátumban vizsgáltam. A **reakcióelegy** Taq polimerázt[12], Hybridization Buffer oldatot[13], dNTP mixet[14], betaine-t, $MgCl_2$-ot, *DQB1* primereket[15] és DNS-t tartalmazott (7. a, b táblázat).

7. a táblázat: Az alkalmazott primerek

Primerek	Szekvencia
WO-340[15]	5'-Biotin- GCA TGT GCT ACT TCA CCA ACG -3'
BIO-351[15]	5'-Biotin- CCT TCT GGC TGT TCC AGT ACT -3'

doi:10.14753/SE.2013.1801

7. b táblázat: A *HLA DQB1* PCR reakcióelegy

Reagens	Törzsoldat koncentráció	Végső koncentráció	Lyuk
Hybridization Buffer[13]	10x	1x	11,0 µl
dNTP mix[14]	10 mM	0,2 mM	2,2 µl
Betaine	5 M	1,5 M	33,0 µl
$MgCl_2$	25 mM	3 mM	13,2 µl
Wo-340[15]	2 µM	0,2 µM	11,0 µl
Bio-351[15]	2 µM	0,2 µM	11,0 µl
MQ víz	-	-	27,3 µl
Taq polimeráz[12]	5 U/µl	1,5 U/110 µl	0,3 µl
DNS	20 ng/ml	-	1,0 µl

Az amplifikációs hiba felismerésére ismert *DQB1* allélű *kontroll mintákat*, a háttérzaj meghatározásához pedig *blankot* használtam, ami csak PCR mixet tartalmazott, DNS mintát nem.

Amplifikáció és PCR program: az elődenaturálás 95°C-on 6 percig, 55°C-on 4 percig és 73°C-on 2 percig tartott, mely alatt megtörtént az enzimaktiváció és a DNS láncok szétválása. Ezt 39 ciklus követte, mely során az első lépésben 95°C-on, 50 másodperc alatt a láncok véglegesen szétváltak (denaturáció), a második lépésben 1 perc alatt 55°C-on a biotinnal jelölt primerek kötődtek (annealing), majd a hőmérséklet másodpercenként 0,5°C-ot emelkedett és 73°C-on 1 perc 10 másodperc alatt végbement a DNS szintézis (elongáció) is. A ciklus végén nagyon lassan, 0,02°C/másodperces sebességgel szobahőmérsékletre hűtötte a mintákat a készülék.

Hibridizáció: az egyszálú, biotinnal jelölt PCR terméket a *Hybridization Buffer-rel*[17] együtt 96 lyukú DELFIA Streptavidin Microtitration Stript-re[16] vittem fel, majd Microseal-A filmmel[10] lefedve DELFIA PLATESHAKE-kel[7] 30 percig rázattam a plate-t. A biotin – streptavidin kötés révén a PCR termék rögzült a plate felszínén, a felesleget pedig DELFIA PLATEWASH[18] készülékben *Washing Solution* oldattal 4 mosási ciklusban eltávolítottam. 50 mM *NaOH* és 5 perc fedetlen rázatás hatására a PCR termék denaturálódott. A *Solution A, B, C* vagy *D* oldat hozzáadása után 2 órán át 37°C-on inkubáltam az elegyet, mely során a lanthanoidákkal jelölt oligonukleotid próbák hibridizáltak a target szekvenciájukkal. Ha a PCR terméknek nem volt megfelelő komplementer szekvenciája a reakcióelegyben, a lanthanoid jelölt próba a quencher oligonukleotidhoz hibridizált és a próba fluoreszcens jele elnyelődött. Ezt ismét 6 mosási ciklus követte 46°C-ra előmelegített *Washing Solution*-nel (8. a, b, c táblázat).

doi:10.14753/SE.2013.1801

8. a táblázat: A hibridizáció során használt oldatok összetétele

Név	Összetevők
Washing solution	NaCl, Tris base, 4N HCl, Tween-20, H_2O, pH 7,75
Solution A, B, C, D	870 mM NaCl, 0,1 % Tween-20, Hybridzation Buffer[17], lanthanoid alapú oligonukleotid próbák[19]

8. b táblázat: A hibridizáló oldatok

DQB1			Full house		
Próba	**Solution A**	**Solution B**	**Próba**	**Solution C**	**Solution D**
AD0129	10 ng/ml		**AD0152**	15 ng/ml	
AD0127	10 ng/ml		**AD0150**	10 ng/ml	
AD0128	20 ng/ml		**AD0151**	20 ng/ml	
AD0132		10 ng/ml	**AD0155**		20 ng/ml
AD0130		10 ng/ml	**AD0153**		5,0 ng/ml
AD0131		9,6 ng/ml	**AD0154**		82 ng/ml

8. c táblázat: Az alkalmazott lanthanoid alapú oligonukleotid próbák[19] jellemzői

Próba	Szekvencia	DQB1 allél	Jelölő lanthanoid
AD0127	5'- GTA CCG CGC GGT –3'	*0602/0603	Eu
AD0128	5'- TTG TAA CCA GAC ACA –3'	*0603/0604	Sm
AD0129	5'- CTT CGA CAG CGA CG –3'	kontroll	Tb
AD0130	5'- GCC GCC TGC CG –3'	*0302	Eu
AD0131	5'- ACG TGG AGG TGT AC –3'	*0301	Sm
AD0132	5'- CTT CGA CAG CGA CG –3'	*02	Tb
AD0150	5'- AGG AGG ACG TGC –3'	*0601	Eu
AD0151	5'- TGC GGG GTG TGA C –3'	*04/05	Sm
AD0152	5'- CCG CCT GAC GC –3'	*0301/0303	Tb
AD0153	5'- AAC GGG ACC GAG C –3'	*04	Eu
AD0154	5'- ACC GGG CAG TGA C –3'	*0501	Sm
AD0155	5'- CGG CCT AGC GCC –3'	*0502/0504	Tb

TRF mérés (time-resolved fluorimetry**):** A lanthanoidák egyedi fluoreszcens tulajdonságokkal, hosszú bomlásidővel és nagy excitáció-emisszió hullámhossz különbséggel (úgynevezett Stokes-shift) jellemezhetők. A jelölt oligonukleotidok csak akkor fluoreszkálnak, ha *DELFIA Enhancement Solution (DES)*[20] és *DELFIA Enhancer (DE)*[21] oldatban a lanthanoidok disszociálnak és alkalmassá válnak a nagy érzékenységű időfelbontott fluorimetriás detektálásra. *DES* hozzáadása és 25 perc rázatás után először az európium és a szamárium szignált, majd *DE* hozzáadása és 5 perc rázatás után a

doi:10.14753/SE.2013.1801

terbium szignált mértem le CHAMELEON MULTILABEL DETECTION PLATFORM platereader-rel[8] (9. táblázat).

9. táblázat: A lanthanoidák fluoreszcens jellemzői

Lanthanoida	Excitációs hullámhossz	Emissziós hullámhossz	Késleltetési idő	Mérési ciklus
Európium	337 nm	615 nm	0,4 ms	1 ms
Terbium	340 nm	545 nm	0,5 ms	2 ms
Szamárium	349 nm	648 nm	0,3 ms	1 ms

doi:10.14753/SE.2013.1801

3.3. STATISZTIKAI ANALÍZIS

Az **eset-kontroll vizsgálatok** megkezdése előtt a megfelelő statisztikai erő biztosítása érdekében minden esetben felmértem az adott génpolimorfizmus vizsgálatához szükséges esetszámot [104].

Az eredmények statisztikai analízisét az **SPSS program** 17.0 verziójával[23] végeztem. Az adott polimorfizmus betegségre való hajlamosító hatását az életkorral, a nemmel és a testtömeg-index-szel korrigált *logisztikus regressziós modellel* számított esélyhányadossal (odds ratio, OR) és 95%-os konfidencia intervallummal (95% CI) becsültem. A kapott genotípusok megoszlását minden esetben összevetettem a Hardy-Weinberg ekvilibriummal.

A **metaanalíziseket** megelőző irodalomkutatás során a MEDLINE és a Cochrane Library adatbázisát tekintettem át. A metaanalíziseket a **MIX szoftver** segítségével készítettem [105]. Ha a *Cochran Q-teszt* eredménye nem igazolta a vizsgálatok szignifikáns heterogenitását, akkor a *Mantel-Haenszel teszt fix-hatás modelljét* használtam az esélyhányadosok összegzésére. Az allélfrekvenciák genetikai heterogenitását *Breslow-Day-teszttel* értékeltem. A populációs járulékos kockázati hányad (population attributable risk, PAR) számítása a következő képlet alapján történt: $PAR = (X-1)/X$, ahol $X = (1-f)^2 + 2f(1-f)\gamma + f^2\gamma^2$; γ az allélikus esélyhányados, f a hajlamosító allél frekvenciája volt a háttér populációban.

A **klinikai adatok** elemzésekor a változók normalitásának és homogenitásának ellenőrzésére a *Shapiro-Wilk's W* és a *Levene teszteket* használtam. A diszkrét változókat (pl. nem) esetszámmal (n), a folytonos változókat (pl. életkor, BMI, C-peptid) átlag ± standard deviáció (SD) értékkel jellemeztem. A polimorfizmusok és a diszkrét adatok összehasonlításánál *Pearson khí-négyzet tesztet* alkalmaztam. A polimorfizmusok és a folytonos változók közötti kapcsolatot *varianciaanalízissel* (*ANCOVA,* életkor és nem a kovariánsok), majd a post-hoc analízisként *Tukey teszttel* vizsgáltam.

Valamennyi statisztikai vizsgálatban a *p*-érték kétoldalas próbából származott, a szignifikancia szintet 0,05-nek tekintettem.

doi:10.14753/SE.2013.1801

4. EREDMÉNYEK

A genetikai vizsgálat során a genotípus megoszlások tekintetében egyik polimorfizmus esetén sem tapasztaltunk eltérést a Hardy-Weinberg egyensúlytól (HWE) sem a beteg, sem a kontroll populációkban (*p*-értékek>0,05).

1. vizsgálat: A látens autoimmun diabétesz genetikai hátterének vizsgálata

A vizsgálat magyar részében 211 LADA beteg és 1497 anyagcsere-egészséges kontroll személy esetén genotipizáltuk a *TCF7L2* gén rs7903146, a *CDKN2A/2B gén* rs10811661 és a *PPARG* gén rs1801282 polimorfizmusát. A *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmusa 545 1-es típusú diabéteszes beteg esetén is meghatározásra került. A vizsgált beteg- és kontrollcsoportok klinikai adatait a 10. táblázat foglalja össze.

10. táblázat: A magyar beteg- és kontrollcsoportok jellemzői

	Esetszám (n)	Férfi/nő	Életkor (év±SD)	BMI (kg/m^2±SD)
LADA	211	112/99	44,94±8,26	25,12±4,62
T1DM	545	291/254	8,11±4,08	16,06±3,67
Kontroll	1497	765/732	37,62±10,92	26,35±4,46

A genetikai adatok elemzése során azt találtuk, hogy a magyar populációban a *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmusa szignifikáns összefüggést mutatott a felnőttkori látens autoimmun diabétesz kialakulásával (*T-allélikus* OR 1,34, 95% CI 1,07-1,68; *p*=0,0127), de 1-es típusú diabéteszre nem hajlamosított (OR 0,98, 95% CI 0,73-1,31; *p*=0,5219).

A magyar populációban a *TCF7L2* gén rs7903146 *T-alléljének* populációs járulékos kockázati hányada LADA kialakulására 15,21% volt.

A magyar populációban sem a *CDKN2A/2B gén* rs10811661 polimorfizmusa (*T-allélikus* OR 1,07, 95% CI 0,82-1,40; *p*=0,6221, sem a *PPARG* gén rs1801282

polimorfizmusa (*C-allélikus* OR 1,03, 95% CI 0,74-1,42; *p*=0,8628) nem hajlamosított felnőttkori látens autoimmun diabétesz kialakulására (11. táblázat). A vizsgálat e génekre vonatkozó statisztikai ereje 50% alatt maradt.

11. táblázat: A 2-es típusú diabéteszre hajlamosító génlókuszok kapcsolata a felnőttkori látens autoimmun diabétesszel a magyar populációban

Gén neve (SNP)	Allél	Allélfrekvencia		LADA vs. kontroll	
		LADA n=211	Kontroll n=1497	OR (95% CI)	*p*-érték
***TCF7L2* (rs7903146)**	C	0,6825	0,7410	0,75 (0,60-0,93)	**0,0127**
	T	0,3175	0,2590	1,34 (1,07-1,68)	
***CDKN2A/2B* (rs10811661)**	T	0,8325	0,8220	1,07 (0,82-1,40)	0,6221
	C	0,1675	0,1780	0,93 (0,71-1,23)	
***PPARG* (rs1801282)**	C	0,8886	0,8857	1,03 (0,74-1,42)	0,8628
	G	0,1114	0,1143	0,97 (0,70-1,34)	

A saját eredményeinkre és a korábban publikált európai tanulmányokra épülő metaanalízisben összesen 999 LADA és 5358 kontroll egyén adatait elemeztük. A vizsgálatban szereplő beteg- és kontrollcsoportok klinikai adatait a 12. táblázat foglalja össze.

A metaanalízis a *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmus *T-alléljének* szerény, de szignifikáns hajlamosító hatását igazolta a LADA kialakulására az európai származású egyénekben (OR 1,28, 95% CI 1,15-1,42; *p*<0,0001) (22. ábra). Az egyes tanulmányok között nem volt heterogenitás (*p*=0,9288). Az európai származásúakban a *TCF7L2* gén rs7903146 *T-alléljének* tulajdonítható átlagos populációs járulékos kockázati hányad felnőttkori látens autoimmun diabéteszben 12,99%-ra volt becsülhető.

doi:10.14753/SE.2013.1801

12. táblázat: A metaanalízisben szereplő beteg- és kontrollcsoportok jellemzői

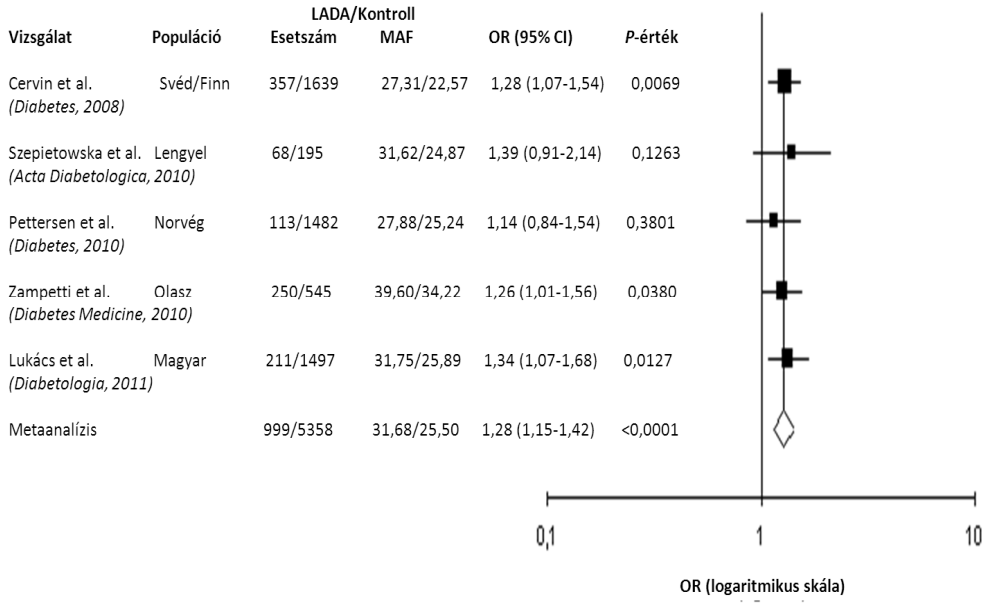
	Esetek	Esetszám (n)	Férfi/nő	Életkor (év±SD)	BMI (kg/m^2±SD)
Svéd	**LADA**	164	73/91	52,4±11,4	25,9±5,6
	T1DM	718	394/324	17,9±9,2	23,8±3,3
	Kontroll	1000	553/447	70,1±2,9	27,6±4,4
Finn	**LADA**	196	83/113	54,6±11,4	26,8±5,0
	T1DM	na	na	na	na
	Kontroll	704	338/366	53,7±11,4	25,9±3,7
Lengyel	**LADA**	68	26/42	44,9±9,5	26,3±4,6
	T1DM	na	na	na	na
	Kontroll	195	na	na	na
Norvég	**LADA**	126	68/58	58±11 és 60±12	27,4±3,8 és 29,4±5,3
	T1DM	120	72/48	26±16 és 34±16	25,8±3,4 és 26,6±4,6
	Kontroll	1503	740/763	64±15 és 68±14	26,4±3,4 és 27,1±4,5
Olasz	**LADA**	250	na	50,3±12,8	na
	T1DM	551	na	14,9±7,8	na
	Kontroll	545	na	30±5	na
Magyar	**LADA**	211	112/99	44,94±8,26	25,12±4,62
	T1DM	545	291/254	8,11±4,08	16,06±3,67
	Kontroll	1497	765/732	37,62±10,92	26,35±4,46

Na = nincs adat.

(Az esetszámok a cikkekben közölt adatokat tükrözik, melyek nem minden esetben egyeznek meg az eset-kontroll vizsgálatba bevett esetek számával. Az életkor a betegcsoportok esetén a diagnóziskori életkorral, a kontrollok esetén a vizsgálat időpontjában betöltött életkorral egyezik meg.)

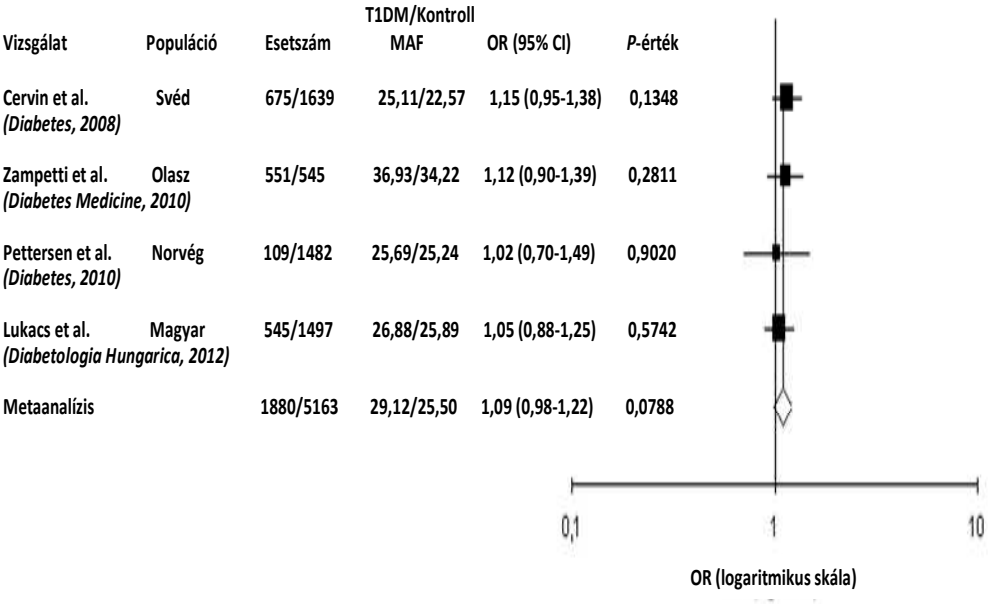
A metaanalízis igazolta azt is, hogy a *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmus nem hajlamosít 1-es típusú diabétesz kialakulására az európai származású egyénekben (OR 1,09, 95% CI 0,98-1,22; *p*=0,0788) (23. ábra).

doi:10.14753/SE.2013.1801



22. ábra: A *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmus és a felnőttkori látens autoimmun diabétesz közötti kapcsolat az európai populációkban

[Hat különböző földrajzi fekvésű, európai népcsoport eset-kontroll tanulmányának metaanalízise. A tanulmányok között heterogenitás nem volt igazolható (Cochran Q-teszt *p*=0,9288). A vizsgálatok közlési sorrendben vannak rendezve. Az OR szimbólumok méretei a vizsgálati mintaszámmal arányosak. MAF: minor allél frekvencia.]



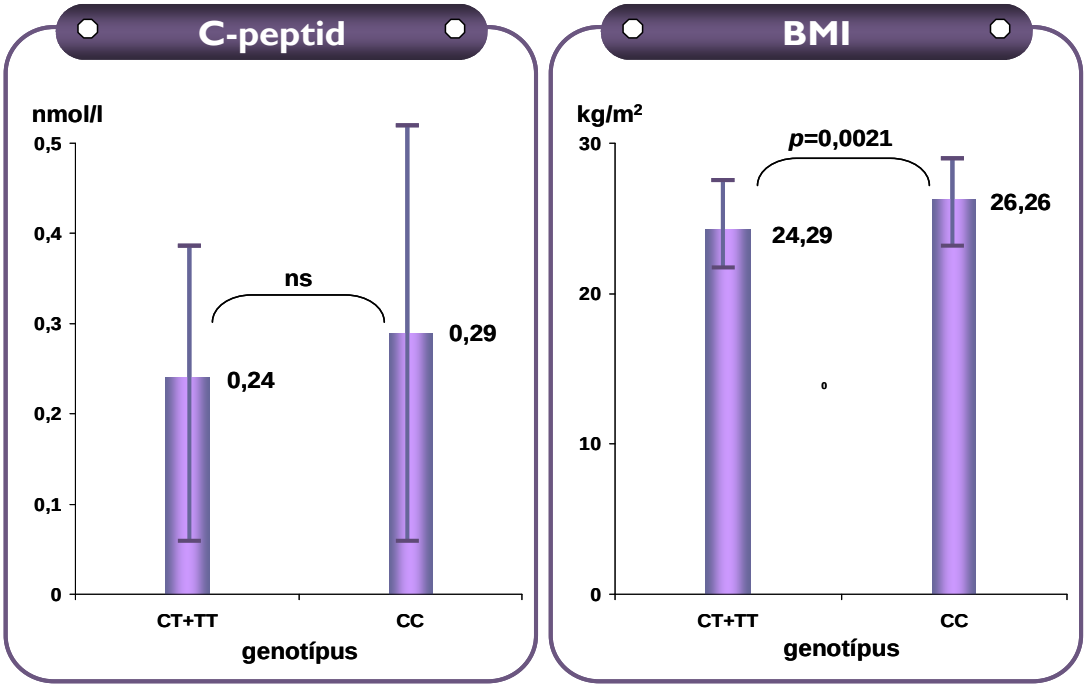
23. ábra: A *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmus és az 1-es típusú diabétesz közötti kapcsolat az európai populációkban

[Négy különböző földrajzi fekvésű, európai népcsoport eset-kontroll tanulmányának metaanalízise. A tanulmányok között heterogenitás nem volt igazolható (Cochran Q-teszt *p*=0,8872). A vizsgálatok közlési sorrendben vannak rendezve. Az OR szimbólumok méretei a vizsgálati mintaszámmal arányosak. MAF: minor allél frekvencia.]

doi:10.14753/SE.2013.1801

Ezt követően a magyar populációban tovább elemeztük a LADA kialakulására hajlamosító *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmus és a klinikai adatok lehetséges összefüggését. A génvariáns-hordozás a betegek nemétől és a diagnóziskor betöltött életkorától függetlennek bizonyult. A diabétesz diagnózisakor mért éhomi szérum C-peptid értékek összevetésekor azt találtuk, hogy a *T-allélt* hordozó (*CT/TT genotípusú*) LADA betegeknél tendenciózusan alacsonyabb C-peptid értékek mérhetők, mint a *CC genotípusúaknál*, de a különbség nem érte el a szignifikancia határát (*CT/TT genotípusúak:* 0,24±0,18 nmol/l illetve *CC genotípusúak:* 0,29±0,23 nmol/l; *p*=0,0841) (24. ábra).

A *T-allélt* hordozók BMI értéke szignifikánsan alacsonyabb volt mint a *CC genotípusú* betegeké (*CT/TT genotípusúak:* 24,29±2,74 kg/m^2 illetve *CC genotípusúak:* 26,26±2,82 kg/m^2, *p*=0,0021) (24. ábra). Nem volt hasonló kapcsolat sem a kontroll, sem az 1-es típusú diabéteszes csoportban.



24. ábra: A *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmus és az éhomi szérum C-peptid érték (átlag±SD) illetve a testtömeg-index (átlag±SD) közötti kapcsolat felnőttkori látens autoimmun diabéteszben a magyar populációban

doi:10.14753/SE.2013.1801

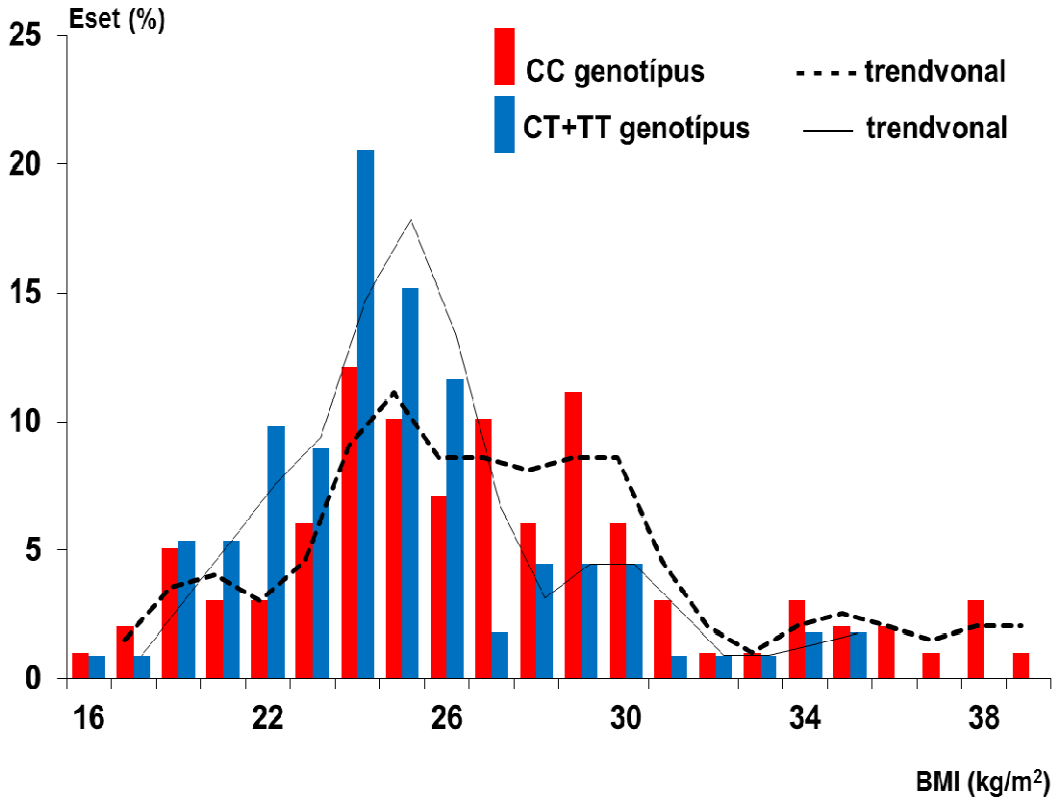
A *TCF7L2* diabetogén hatását a nem-túlsúlyos illetve a túlsúlyos BMI kategóriákban tovább elemezve azt találtuk, hogy a *T-allél* csak a nem-túlsúlyos csoportban hajlamosított LADA kialakulására (OR 1,61, 95% CI 1,21-2,12; *p*=0,0011); a nem-túlsúlyos LADA betegek esetén a hajlamosító variáns hordozása okozta rizikófokozódás 2,84-szeres volt a túlsúlyos *T-allélt* hordozó LADA betegekhez képest (*p*=0,0013). Az 1-es típusú diabéteszes csoportban nem volt hasonló kapcsolat (13. táblázat és 25. ábra).

13. táblázat: A *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmus és testtömeg-index közötti kapcsolat a felnőttkori látens autoimmun és az 1-es típusú diabéteszes betegekben, a magyar populációban

BMI státusz	Estek	Genotípusok (n)			*T-allél* frekvencia (%)	Diabéteszes csoport vs. kontrollok		Nem-túlsúlyos vs. túlsúlyos	
		CC	CT	TT		*T-allél* OR (95% CI)	*p*-érték	*T-allél* OR (95% CI)	*p*-érték
Nem-túlsúlyos	Kontroll	375	270	43	25,9	-	-	-	-
	LADA	56	72	16	36,1	1,61 (1,21-2,12)	**0,0011**	2,84 (1,55-5,21)	**0,0013**
	T1DM	238	166	35	26,9	1,05 (0,87-1,28)	ns	1,05 (0,68-1,62)	ns
Túlsúlyos	Kontroll	445	309	55	25,9	-	-	-	-
	LADA	43	18	6	22,4	0,86 (0,56-1,31)	ns	1,00 referencia	-
	T1DM	57	41	8	26,9	1,07 (0,77-1,48)	ns	1,00 referencia	-

Ns = nem szignifikáns.

doi:10.14753/SE.2013.1801



25. ábra: A *TCF7L2* gén rs7903146 genotípus-csoportok megoszlása a testömeg-index szerint felnőttkori látens autoimmun diabéteszes betegekben, a magyar populációban

<u>2. vizsgálat:</u> A 2-es típusú diabétesz genetikai hátterének vizsgálata

A vizsgálat magyar részében 1297 2-es típusú diabéteszes és 1497 anyagcsere-egészséges kontroll személy esetén genotipizáltuk a *TCF7L2* gén rs7903146, a *CDKN2A/2B gén* rs10811661 és a *PPARG* gén rs1801282 polimorfizmusát. A vizsgált beteg- és kontrollcsoportok klinikai adatait a 14. táblázat foglalja össze.

14. táblázat: A magyar beteg- és kontrollcsoport jellemzői

	Esetszám (n)	Férfi/nő	Életkor (év±SD)	BMI (kg/m^2±SD)
T2DM	1297	636/661	52,63±9,85	29,52±4,95
Kontroll	1497	765/732	37,62±10,92	26,35±4,46

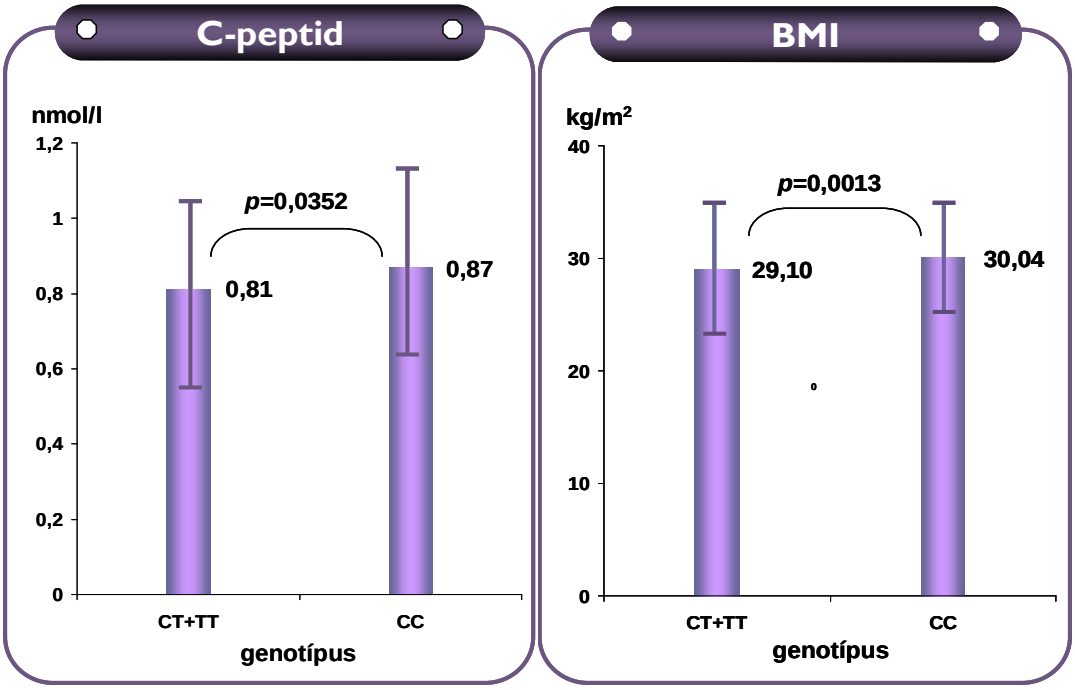
A genetikai adatok elemzése azt igazolta, hogy mind a *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmusa (*T-allélikus* OR 1,49, 95% CI 1,13-1,73; *p*<0,0001), mind a *CDKN2A/2B gén* rs10811661 polimorfizmusa (*T-allélikus* OR 1,20, 95% CI 1,04-1,39; *p*=0,0111), mind a *PPARG* gén rs1801282 polimorfizmusa (*C-allélikus* OR 1,20, 95% CI 1,01-1,43; *p*=0,0345) hajlamosított a magyar populációban 2-es típusú diabétesz kialakulására (15. táblázat). Az egyes gének járulékos kockázati hányada sorrendben 16,96%, 26,46% és 28,24% volt.

15. táblázat: A *TCF7L2*, a *CDKN2A/2B* és a *PPARG* gének kapcsolata a 2-es típusú cukorbetegséggel a magyar populációban

Gén neve (SNP)	Allél	Allélfrekvencia		T2DM vs. kontroll	
		T2DM n=1297	Kontroll n=1497	OR (95% CI)	*p*-érték
***TCF7L2* (rs7903146)**	C	0,6754	0,7410	0,73 (0,65-0,81)	**<0,0001**
	T	0,3246	0,2590	1,49 (1,13-1,73)	
***CDKN2A/2B* (rs10811661)**	T	0,8475	0,8220	1,20 (1,04-1,39)	**0,0111**
	C	0,1525	0,1780	0,83 (0,72-0,96)	
***PPARG* (rs1801282)**	C	0,9033	0,8857	1,20 (1,01-1,43)	**0,0345**
	G	0,0967	0,1143	0,83 (0,70-0,99)	

A továbbiakban az egyes génvariánsok és a betegek klinikai adatai közötti kapcsolatokat kerestük. A gének diabetogén hatása mindhárom esetben a betegek életkorától és nemétől függetlennek bizonyult. A *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmus 2-es típusú diabéteszesekben összefüggést mutatott a betegség diagnózisakor mért éhomi szérum C-peptid szinttel és a betegek testömegindexével. A *CC genotípusú* betegekhez képest a *T-allélt* hordozóknál szignifikánsan alacsonyabb C-peptid szintek (*CT/TT genotípusúak*: 0,81±0,23 nmol/l illetve *CC genotípusúak*: 0,87±0,24 nmol/l; *p*=0,0352) és BMI értékek (*CT/TT genotípusúak*: 29,10±5,06 kg/m^2 illetve *CC genotípusúak*: 30,04±4,77 kg/m^2, *p*=0,0013) voltak mérhetők (26. ábra).

doi:10.14753/SE.2013.1801



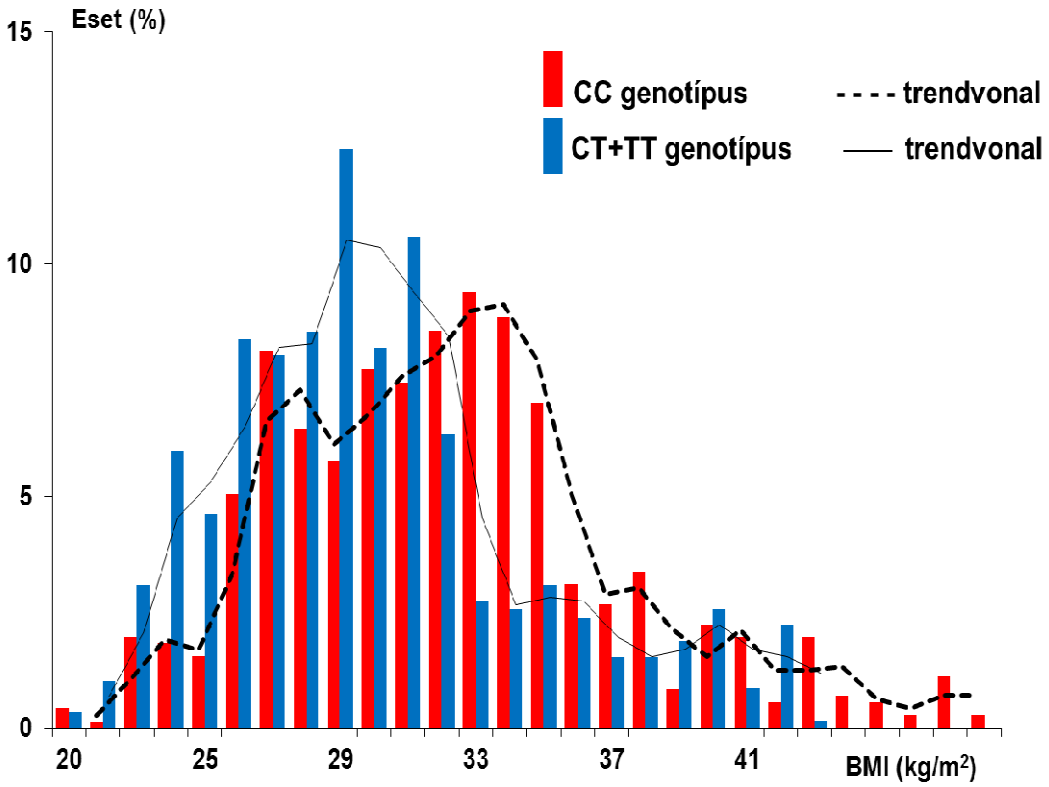
26. ábra: A *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmus és az éhomi szérum C-peptid érték (átlag±SD) illetve a testtömeg-index (átlag±SD) közötti kapcsolat 2-es típusú diabéteszben a magyar populációban

A 2-es típusú diabéteszes csoportban a *T-allél* hordozása a nem-túlsúlyos és a túlsúlyos betegcsoportban is növelte a diabétesz kialakulásának a kockázatát a kontrollokhoz képest (nem-túlsúlyos csoport: OR 1,93, 95% CI 1,49-2,50; $p<0,0001$; túlsúlyos csoport: OR 1,36, 95% CI 1,14-1,63; $p=0,0038$), de a rizikófokozódás a nem-túlsúlyos kategóriában szignifikánsan nagyobb volt mint a túlsúlyos betegcsoportban ($p<0,0001$) (16. táblázat és 27. ábra).

doi:10.14753/SE.2013.1801

16. táblázat: A *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmus és testtömeg-index közötti kapcsolat 2-es típusú diabéteszes betegekben, a magyar populációban

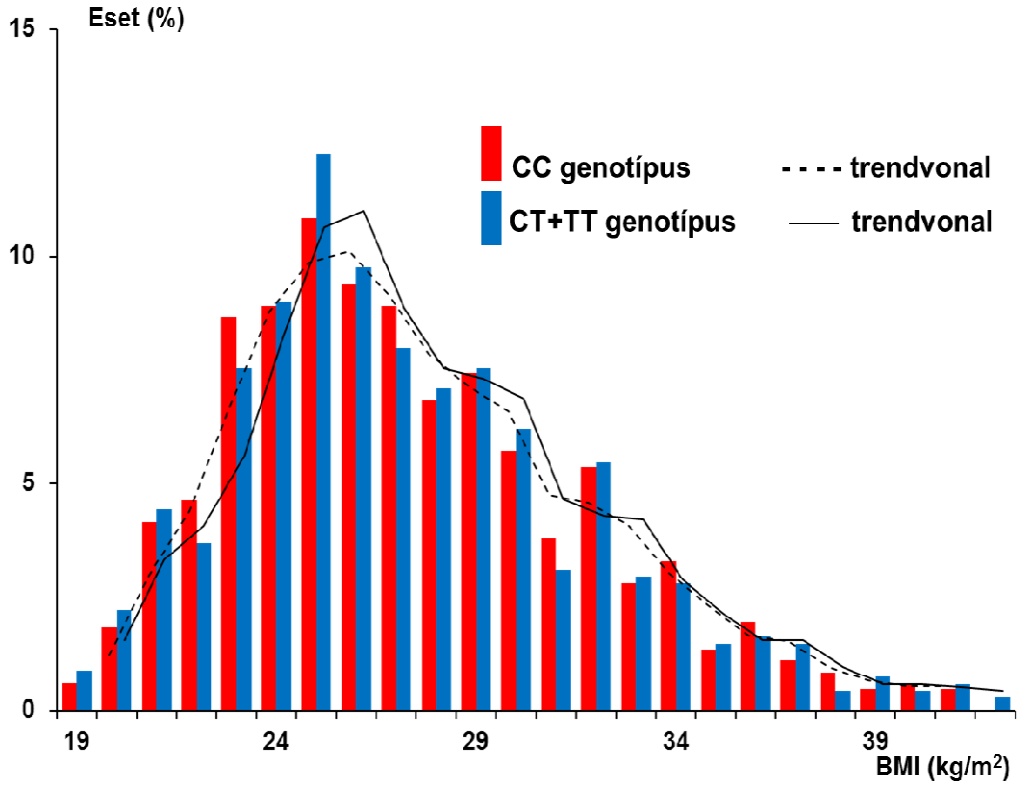
BMI státusz	Estek	Genotípusok (n)			*T-allél* frekvencia (%)	Diabéteszes csoport vs. kontrollok		Nem-túlsúlyos vs. túlsúlyos	
		CC	CT	TT		*T-allél* OR (95% CI)	*p*-érték	*T-allél* OR (95% CI)	*p*-érték
Nem-túlsúlyos	**Kontroll**	375	270	43	25,9	-	-	-	-
	T2DM	71	136	34	42,3	1,93 (1,49-2,50)	**<0,0001**	2,26 (1,68-3,07)	**<0,0001**
Túlsúlyos	**Kontroll**	445	309	55	25,9	-	-	-	-
	T2DM	514	446	96	30,2	1,36 (1,14-1,63)	**0,0038**	1,00 referencia	-



27. ábra: A *TCF7L2* gén rs7903146 genotípus-csoportok megoszlása a testtömeg-index szerint 2-es típusú diabéteszesekben, a magyar populációban

doi:10.14753/SE.2013.1801

Az anyagcsere-egészséges kontrollcsoportban a T-allél megoszlása a testtömeg-indextől függetlenül homogén volt (28. ábra)



28. ábra: A *TCF7L2* gén rs7903146 genotípus-csoportok megoszlása a testömeg-index szerint a kontrollcsoportban, a magyar populációban

Vizsgálatunkban a *CDKN2A/2B gén* rs10811661 és a *PPARG* gén rs1801282 polimorfizmusa 2-es típusú diabéteszes betegek esetén nem mutatott összefüggést sem az éhomi szérum C-peptid értékkel, sem a testtömeg-index-szel.

Ezt követően a saját eredményeinket és az. 1. vizsgálatban szereplő európai tanulmányok 2-es típusú diabéteszre vonatkozó eredményeit - összesen 4529 T2DM és 5163 kontroll egyén genetikai adatait - egy metaanalízisben egyesítettük. A vizsgálatban szereplő beteg- és kontrollcsoportok klinikai adatait a 17. táblázat foglalja össze.

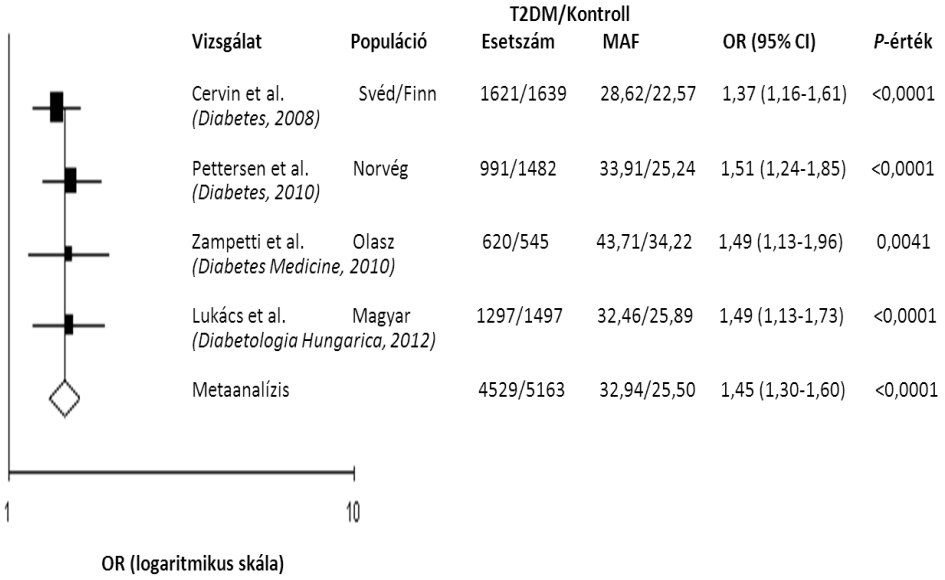
doi:10.14753/SE.2013.1801

17. táblázat: A metaanalízisben szereplő beteg- és kontrollcsoportok jellemzői

	Esetek	Esetszám (n) *	Férfi/nő	Életkor (év±SD)**	BMI (kg/m^2±SD)
Svéd	**T2DM**	1000	553/447	54,3±8,8	29,2±4,8
	Kontroll	1000	553/447	70,1±2,9	27,6±4,4
Finn	**T2DM**	676	361/315	54,8±9,3	29,1±4,8
	Kontroll	704	338/366	53,7±11,4	25,9±3,7
Norvég	**T2DM**	1090	534/556	60±11 és 61±12	28,5±3,8 és 30,8±5,4
	Kontroll	1503	740/763	64±15 és 68±14	26,4±3,4 és 27,1±4,5
Olasz	**T2DM**	620	na	51,6±10,8	na
	Kontroll	545	na	30±5	na
Magyar	**T2DM**	1297	636/661	52,63±9,85	29,52±4,95
	Kontroll	1497	765/732	37,62±10,92	26,35±4,46

Na = nincs adat.

(Az esetszámok a cikkekben közölt adatokat tükrözik, melyek nem minden esetben egyeznek meg az eset-kontroll vizsgálatba bevett esetek számával. Az életkor a betegcsoportok esetén a diagnóziskori életkorral, a kontrollok esetén a vizsgálat időpontjában betöltött életkorral egyezik meg.)



29. ábra: A *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmus és a 2-es típusú diabétesz kapcsolata az európai populációkban

[Öt különböző földrajzi fekvésű, európai népcsoport eset-kontroll tanulmányának metaanalízise. A tanulmányok között heterogenitás nem volt igazolható (Cochran Q-teszt p=0,8391). A vizsgálatok közlési sorrendben vannak rendezve. Az OR szimbólumok méretei a vizsgálati mintaszámmal arányosak. MAF: minor allél frekvencia.]

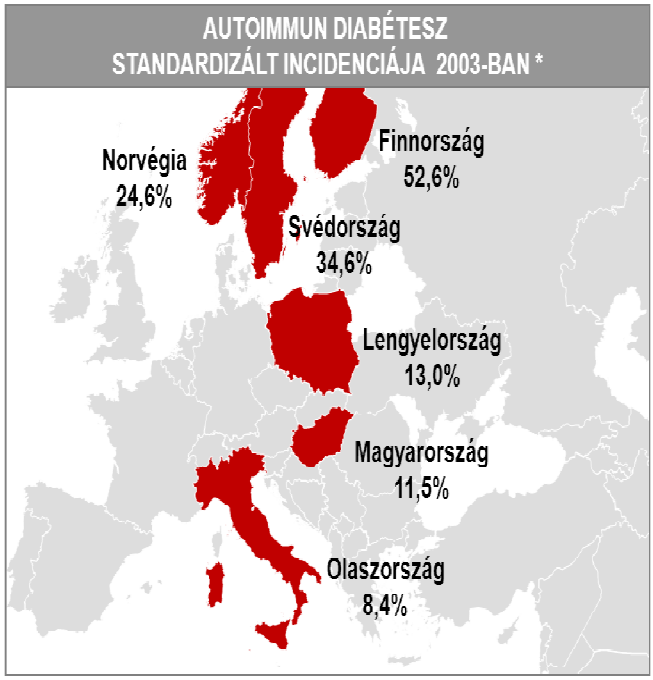
A metaanalízis azt igazolta, hogy a *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmus a 2-es típusú diabétesz kialakulása szempontjából egységes és jelentős rizikótényező az európai származású egyénekben (OR 1,42, 95% CI 1,29-1,56; $p<0,0001$) (29. ábra).

Az európai származásúakban a *TCF7L2* gén rs7903146 *T-alléljének* tulajdonítható átlagos populációs járulékos kockázati hányad 2-es típusú diabéteszre 18,45%-ra volt becsülhető.

A továbbiakban összehasonlítottuk az 1. és 2. vizsgálat *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmusának felnőttkori látens autoimmun és 2-es típusú diabéteszre vonatkozó eredményeit. A magyar populációban a *TCF7L2* gén *T-allél* frekvencia megoszlása nem különbözött érdemben LADA és T2DM esetén (31,75% illetve 32,49%; Breslow-Day teszt $p=0,7740$). A *TCF7L2* gén hatáserőssége az európai populációkra vonatkozó metaanalízisekben sem különbözött szignifikánsan a két betegcsoportban (LADA OR: 1,28 vs. T2DM OR: 1,45; $p=0,2423$).

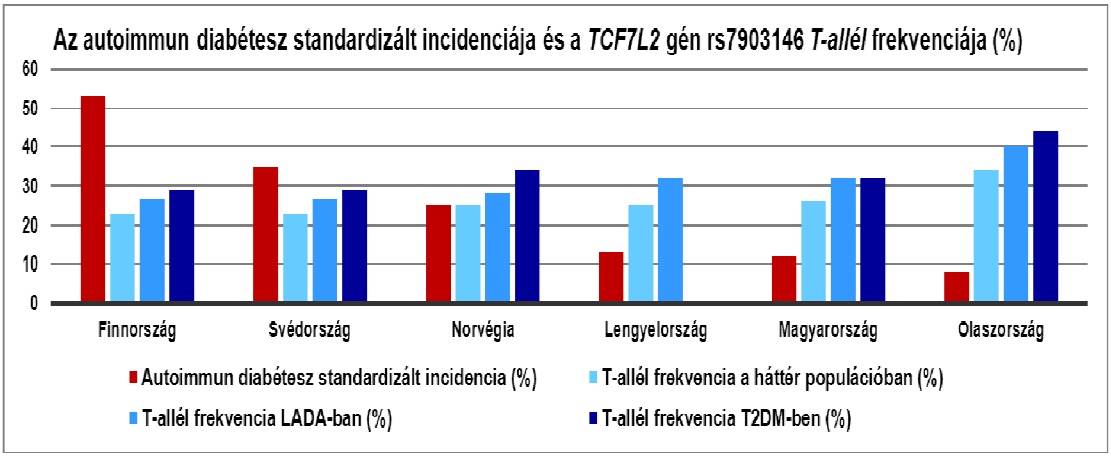
A vizsgált európai populációkban a *TCF7L2* gén betegség-asszociált *T-allél* frekvenciájában mind a háttér-, mind a betegpopulációkban észak-dél irányú gradiens volt észlelhető. Az északi népcsoportokban alacsony (kontroll/LADA/T2DM: Finnország és Svédország esetén 23/27/29%, Norvégiában 25/28/34%), a közép-európai régióban közepes (Lengyelországban 25/32/-% és Magyarországon 26/32/33%), míg délen magas volt a hajlamosító allél előfordulási gyakorisága (Olaszország 34/40/44%) (30. ábra).

doi:10.14753/SE.2013.1801



ORSZÁG	*T-ALLÉL* FREKVENCIÁJA KONTROLLOKBAN ÉS LADA-BAN	
Finnország	22,57%	27,31%
Svédország	22,57%	27,31%
Norvégia	25,24%	27,88%
Lengyelország	24,87%	31,62%
Magyarország	25,89%	31,75%
Olaszország	34,22%	39,60%

*Forrás: Patterson CC., *Lancet*, 2009, 373: 2027-33



30. ábra: A *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmus allélfrekvenciája felnőttkori látens autoimmun és 2-es típusú diabéteszben illetve a háttér populációban és az autoimmun diabétesz incidenciája a vizsgált európai országokban

doi:10.14753/SE.2013.1801

3. vizsgálat: Az 1-es típusú diabétesz genetikai hátterének vizsgálata

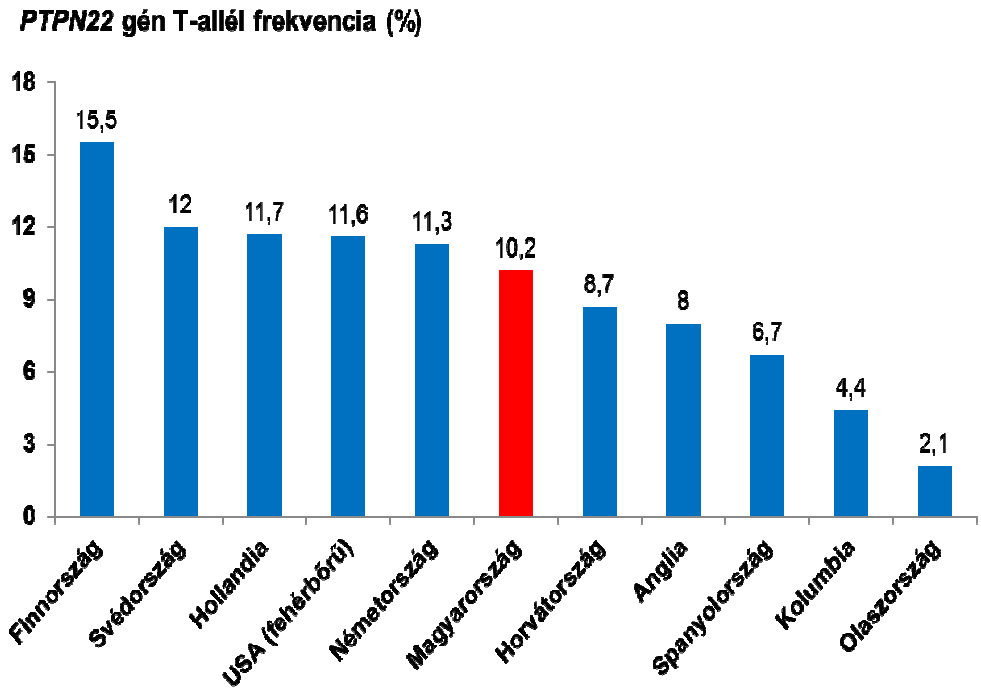
A *PTPN22* gén C1858T polimorfizmus vizsgálata során 572 1-es típusú diabéteszes gyermek (290 fiú/282 lány, diagnóziskori átlagéletkor ±SD: 7,88±4,27 év) és 236 egészséges kontroll (120 férfi/116 nő, átlagéletkor ±SD: 29,86±6,21 év) vérmintáját genotipizáltuk. Az allélfrekvenciák vizsgálata a *PTPN22* gén C1858T polimorfizmus *T-alléljének* erős 1-es típusú diabéteszre hajlamosító hatását igazolta (OR 2,01, 95% CI 1,44-2,81; p=3,18x10^{-5}), a genotípus megoszlások vizsgálata pedig alátámasztotta a minor *T-allél* domináns diabetogén hatását a magyar populációban (*CT genotípus*: OR 1,86, 95% CI 1,27-2,71; p=1,26x10^{-3}) (18. táblázat).

18. táblázat: A *PTPN22* gén C1858T polimorfizmus és az 1-es típusú diabétesz kapcsolata a magyar populációban

Vizsgálati alanyok	Genotípus (n, %)			Allélek (n, %)	
	CC	**CT**	**TT**	**C**	**T**
T1DM n=572 (100%)	384 (67,13%)	164 (28,67%)	24 (4,20%)	932 (81,46%)	212 (18,54%)
Kontrollok n=236 (100%)	191 (80,93%)	42 (17,80%)	3 (1,27%)	424 (89,83%)	48 (10,17%)
OR (95% CI)	0,48 (0,33-0.70)	1,86 (1,27-2,71)	3,40 (1,01-11,41)	0,50 (0,36-0,69)	2,01 (1,44-2,81)
***p*-érték**	**8,24x10^{-5}**	**1,26x10^{-3}**	**3,54x10^{-2}**	**3,18x10^{-5}**	**3,18x10^{-5}**

Hazánkban a betegség-asszociált *T-allél* az anyagcsere-egészséges háttér populáció 10%-ában fordult elő, ami jól beleilleszthető a független népcsoportokban elvégzett genetikai vizsgálat során Európában észlelt észak-déli irányú geográfiai gradiensbe (31. ábra).

doi:10.14753/SE.2013.1801



31. ábra: A *PTPN22* gén C1858T polimorfizmus allélfrekvenciájának geográfiai gradiense európai származású anyagcsere-egészséges populációkban

A klinikai adatok elemzése azt mutatta, hogy a *PTPN22* gén C1858T polimorfizmusa és a betegek neme, illetve a diabétesz diagnózisakor betöltött életkora között nincs összefüggés (19. a táblázat).

19. a táblázat: A *PTPN22* C1858T genotípusok és klinikai adatok kapcsolata

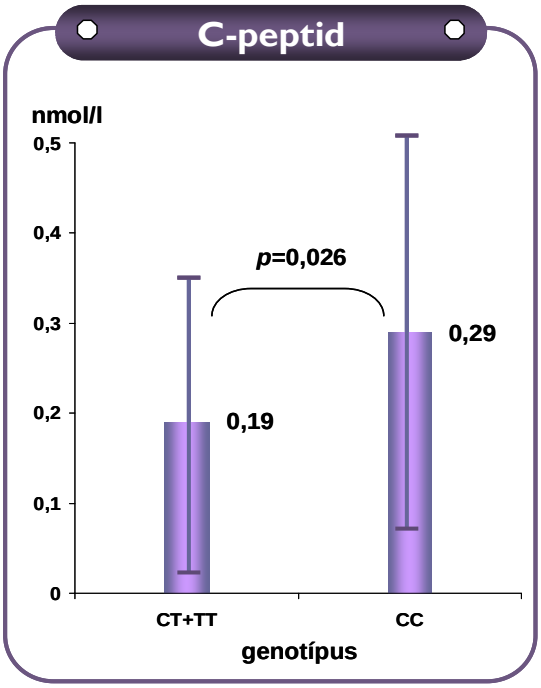
Genotípus		CC	CT	TT	*p*-érték
T1DM n=572 (100%)		384 (67,13%)	164 (28,67%)	24 (4,20%)	-
Életkor (év) ±SD		8,05±4,28	7,43±4,23	7,98±4,19	0,301
Nemek	**Fiú** n=290	193 (66,5%)	86 (29,7%)	11 (3,8%)	0,796
	Lány n=282	191 (67,7%)	78 (27,7%)	13 (4,6%)	

Ugyanakkor a diabétesz diagnózisakor mért éhomi szérum C-peptid koncentráció a *T-allélt* hordozók esetén szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a homozigóta *CC*

genotípusú betegek esetén (*CT/TT genotípus*: 0,19±0,16 nmol/l illetve *CC genotípus*: 0,29±0,22 nmol/l; *p*=0,026) (19. b táblázat és 32. ábra).

19. b táblázat: A *PTPN22* C1858T genotípusok és klinikai adatok kapcsolata

Genotípus	CC	CT+TT	*p*-érték
T1DM n=572 (100%)	384 (67,13%)	188 (32,87%)	-
C-peptid (nmol/l) ±SD	0,29±0,22	0,19±0,16	**0,026**



32. ábra: A *PTPN22* gén C1858T polimorfizmus és az éhomi szérum C-peptid érték (átlag±SD) közötti kapcsolat 1-es típusú diabéteszben, a magyar populációban

Az inzulin gén -23HphI polimorfizmusát 207 1-es típusú diabéteszes gyermeknél (110 fiú/97 lány, diagnóziskori átlagéletkor ±SD: 7,25±4,27 év) és 136 egészséges kontrollnál (72 férfi/64 nő, átlagéletkor ±SD: 27,19±5,12 év) genotipizáltuk. A diabéteszre hajlamosító, VNTR I. osztályát képviselő *A-allél* jelentősen növelte az 1-es típusú diabétesz kialakulásának kockázatát a magyar populációban (OR 2,33, 95% CI 1,59-3,42; p=1,03x10^{-5}). A genotípus megoszlások elemzése a VNTR III. osztályt jelző

doi:10.14753/SE.2013.1801

T-allél dominánsan protektív hatását igazolta (*AT genotípus*: OR 0,43, 95% CI 0,26-0,70; p=7,42x10^{-4}) (21. táblázat).

20. táblázat: Az *INS* gén -23HphI polimorfizmus és az 1-es típusú diabétesz kapcsolata a magyar populációban

Vizsgálati alanyok	Genotípus (n, %)			Allélek (n, %)	
	TT	**AT**	**AA**	**T**	**A**
T1DM n=207 (100%)	11 (5,31%)	37 (17,88%)	159 (76,81%)	59 (14,25%)	355 (85,75%)
Kontrollok n=136 (100%)	15 (11,03%)	46 (33,82%)	75 (55,15%)	76 (27,94%)	196 (72,06%)
OR (95% CI)	0,45 (0,20-1,02)	0,43 (0,26-0,70)	2,69 (1,69-4,30)	0,43 (0,29-0,63)	2,33 (1,59-3,42)
***p*-érték**	5,04x10^{-2}	**7,42x10^{-4}**	**2,49x10^{-5}**	**1,03x10^{-5}**	**1,03x10^{-5}**

Az inzulin gén -23HphI polimorfizmusának hordozása a beteg nemétől és a diabétesz diagnózisakor betöltött életkorától függetlennek bizonyult (22. táblázat).

21. táblázat: Az *INS* -23HphI genotípusok és klinikai adatok kapcsolata

Genotípus		**TT**	**AT**	**AA**	***p*-érték**
T1DM n=207 (100%)		11 (5,31%)	37 (17,88%)	159 (76,81%)	-
Életkor (év) ±SD		6,91±4,38	7,29±4,50	7,26±4,23	0,964
Nemek	**Fiú** n=110	5 (4,54%)	21 (19,09%)	84 (76,37%)	0,794
	Lány n=97	6 (6,19%)	16 (16,49%)	75 (77,32%)	

doi:10.14753/SE.2013.1801

4. vizsgálat: 1-es típusú diabétesz, Hashimoto tireoiditisz és juvenilis reumatoid artritisz triásza: esettanulmány klinikai és genetikai vizsgálatokkal

A vizsgálat időpontjában 17 éves lány eseménytelen terhesség után terminusra született (születési súlya 2,9 kg; testhossza 47 cm volt). Családi anamnézisében nem szerepelt autoimmun betegség. A gyermek két éves korában súlyos ketoacidózissal kezdődő 1-es típusú diabéteszt, 11 éves korában autoimmun hipotireózist diagnosztizáltak, melynek hátterében Hashimoto tireoiditisz állt. A betegnél 15 éves korában a juvenilis reumatoid artritisz szeronegatív poliartikuláris formája alakult ki. A három autoimmun betegség diagnózisát megalapozó laboratóriumi és képalkotó vizsgálatok eredményeit a 21. táblázat tartalmazza.

A gyermeknél három, humán autoimmunitással következetesen kapcsolódó gén (a *HLA*, a *CTLA4* és a *PTPN22*) polimorfizmusainak meghatározását végeztem el. A család többi tagjának genetikai vizsgálatára – a beleegyezésük hiányában – nem került sor.

22. táblázat: Az autoimmun betegségek diagnózisát megalapozó klinikai vizsgálatok eredményei

Vizsgálatok	A beteg értékei	Normális értékek
1-es típusú diabétesz		
Éhomi plazma glükóz	37,6 mmol/l	3,5-5,3 mmol/l
Éhomi szérum C-peptid	0,32 ng/ml	1,05-3,45 ng/ml
HbA_{1c}	14,2 %	3,9-5,7 %
GADA	160 IU/ml	<5 IU/ml
Hashimoto tireoiditisz		
TSH	100 μU/l	0,3-3,0 μU/l
FT3	2,06 pmol/l	1,23-3,08 pmol/l
FT4	2,12 pmol/l	7,72-23,17 pmol/l
anti-TPO	>4000 U/ml	<100 U/ml
TG	4744 U/ml	<100 U/ml
TRAb	31.6 U/ml	<14 U/ml
Nyaki ultrahang	pozitív	-
Juvenilis reumatoid artritisz		
We	36 mm/h	<12 mm/h
CRP	6,6 mg/ml	<5,0 mg/ml
RF	negatív	negatív
Csontszcintigráfia	pozitív	-

doi:10.14753/SE.2013.1801

A vérminta genetikai vizsgálatának eredménye szerint a *HLA* genotípus *DRB1*0401-DQA1*03-DQB1*0301/(DR14)-DQB1*0503*; a *PTPN22* C1858T polimorfizmus tekintetében *CT*; a *CTLA4* CT60 polimorfizmus vonatkozásában *AG* heterozigóta állapot igazolódott.

doi:10.14753/SE.2013.1801

5. MEGBESZÉLÉS

1. vizsgálat: A látens autoimmun diabétesz genetikai hátterének vizsgálata

A WHO és az ADA jelenlegi klasszifikációs rendszere szerint a felnőttkori látens autoimmun diabétesz nem önálló kórkép, hanem az autoimmun mechanizmusú 1-es típusú cukorbetegség lassan progrediáló formája [10, 11]. Ezt támasztja alá az autoimmun patogenetikai hátteret igazoló autoantitest-pozitivitás és több közös genetikai faktor (pl. *HLA*, *INS*, *PTPN22* gén) jelenléte [106, 107]. Ugyanakkor napjainkra számos vizsgálati eredmény megerősítette azt is, hogy a LADA és az 1-es típusú diabétesz patogenezise lényeges vonásaiban különbözik: eltérő az autoantitest-pozitivitás mintázata, az egyes antitestek epitóp-specificitása és a T-sejt válasz is [33].

A patofiziológiai folyamatok megértéséhez vezető egyik út a genetikai háttér pontos felderítése. Az újabb vizsgálatok egyik legmeglepőbb etiopatogenetikai felvetése, hogy több, eddig 2-es típusú cukorbetegséggel asszociálódó génvariáns szerepet játszhat a felnőttkori látens autoimmun diabétesz kialakulásában is [106, 107].

A GWA vizsgálatok eredménye szerint a *TCF7L2* gén - a rizikó allélenkénti közel másfélszeres kockázatfokozó hatásával - a jelenleg ismert legerősebb 2-es típusú cukorbetegségre hajlamosító genetikai tényező [108], de az 1-es típusú diabétesz kialakulásával nem hozható összefüggésbe [109, 110], és diabetogén hatását bizonyosan nem-autoimmun mechanizmusok révén fejti ki. *Cervin és munkatársai* igazolták először, hogy a *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmusa hajlamosít felnőttkori látens autoimmun diabétesz kialakulására is, a LADA és a 2-es típusú diabétesz genetikai hátterének átfedése pedig felveti a két kórkép eddig eltérőnek vélt patogenezisének közös útvonalát [106]. 2008 óta több populációspecifikus vizsgálatot végeztek a LADA és *TCF7L2* gén vonatkozásában, de az eredmények ellentmondásosak [107, 111, 112].

A felnőttkor látens autoimmun diabétesszel kapcsolatos vizsgálataink elsődleges célja ezért az volt, hogy az eddig közölt európai tanulmányok és a hazai eredményeink alapján egyértelműen bizonyítsuk vagy cáfoljuk a *TCF7L2* gén szerepét a LADA kialakulásában az európai származású egyénekben. Emellett további lehetséges

átfedéseket kerestünk a LADA és a 2-es típusú diabétesz genetikai hátterében, ezért további, ismert 2-es típusú diabéteszre hajlamosító genetikai faktorok hatását is megvizsgáltuk a felnőttkori látens autoimmun diabétesszeé kapcsolatban.

Először eset-kontroll vizsgálatokat végeztünk a magyar LADA betegek körében, melyek során a GWA vizsgálatok eredményei alapján a három, 2-es típusú diabétesszel legerősebben asszociálódó gén, a *TCF7L2*, a *CDKN2A/2B* és a *PPARG* hatását elemeztük. Ezek eredményeként elsőként igazoltuk, hogy a *TCF7L2* gén rs7903146 *C-T* polimorfizmusa hajlamosít felnőttkori látens autoimmun diabétesz létrejöttére a magyar populációban is. Az adatok elemzése azt mutatta, hogy hazánkban a *T-allél* hordozása 1,34-szeresére növeli a LADA kialakulásának a rizikóját, ami közel 15%-os populációs járulékos kockázati hányadot jelent. Ezzel párhuzamosan igazoltuk, hogy hazai gyermekkori kezdetű, igazoltan autoimmun mechanizmusú, 1-es típusú cukorbetegek körében a hajlamosító allél frekvenciája nem különbözik az anyagcsere-egészséges kontroll populációban észlelttől. Ez megererősíti azt a feltételezést, hogy a *TCF7L2* gén nem-autoimmun mechanizmusok révén járulhat hozzá a LADA kialakulásához. A további két, 2-es típusú diabéteszre hajlamosító gén, a *CDKN2A/2B* és a *PPARG* nem mutatott kapcsolatot a felnőttkori látens autoimmun diabétesszel a magyar népességben. Az eredmények értékelésnél azonban figyelembe kell venni, hogy az allélfrekvencia-különbségeket tekintve vizsgálatunk e részének statisztika ereje nem volt megfelelő, ezért a vizsgálat nagyobb esetszámmal történő ismétlését tervezzük.

Ezt követően a saját és a korábban publikált európai tanulmányok [106, 107, 111, 112] eredményeit egy metaanalízisben összegeztük, mely meggyőző statisztikai erővel igazolta, hogy a *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmus valóban szereppel bír a felnőttkori látens autoimmun diabétesz létrejöttében. A gén közel 13%-os átlagos populációs járulékos kockázati hányadot képvisel. Az egyes tanulmányokban kapott *TCF7L2* gén hatáserősségek között nem volt szignifikáns különbség, ami az európai származású egyénekben a *TCF7L2* gén populáció-független diabetogén hatását bizonyítja a LADA kialakulásában. A saját eredményeinkre és ugyanezen európai tanulmányokra alapozva metaanalízisben erősítettük meg azt is, hogy a *TCF7L2* gén valóban nem hajlamosít az autoimmun patomechanizmusú 1-es típusú diabétesz kialakulására. A *TCF7L2* gén pontos hatásmechanizmusa még nem felderített, de az ismert, hogy a gén által kódolt TCF4 fehérje egy transzkripciós faktor, mely a Wnt

szignalizációs útvonalon keresztül a GLP-1 szekrécióját növeli és ezáltal döntő szerepet játszik az endokrin hasnyálmirigy fejlődésében, és az érett β-sejtek funkcióinak (pl. inzulinszekréció, túlélés és proliferáció) szabályozásában [113]. Feltételezhető tehát, hogy a *TCF7L2* génvariáns diabetogén hatását mind a 2-es típusú, mind a felnőttkori látens autoimmun diabétesz esetén közvetlenül a β-sejteken fejti ki az inzulinszekréció nem-immunmediált csökkentésén keresztül.

A továbbiakban a *TCF7L2* gén klinikai adatokkal való összefüggését elemeztük a LADA betegcsoportban. A génhatása az életkortól és a nemtől függetlennek bizonyult, ugyanakkor a betegek testtömeg-indexével szoros korrelációt mutatott.

Ismert, hogy 2-es típusú diabéteszben a genetikailag meghatározott inzulinszekréciós és inzulinérzékenységbeli zavarra való hajlamot a környezeti faktorok - elsősorban az elhízás - jelentősen befolyásolják. A *TCF7L2* gén termékéről, a TCF4 fehérjéről bizonyított, hogy az adipogenezisnek és a zsírsejtek differenciálódásának egyik szabályozója [90, 114, 115], így felmerült, hogy a *TCF7L2* gén közvetlenül hat az elhízás iránti hajlamra, ezt azonban európai származású, normális glükóztoleranciájú egyénekben nem sikerült megerősíteni [92]. Azt azonban *Cauchi és munkatársai* kimutatták, hogy bizonyos gének hatását a testsúly befolyásolja. Így a β-sejtek inzulinszekrécióját módosító gének (pl. *TCF7L2*, *KCNJ11*, *HNF1A*, *HNF4A*, *SLC30A8*, *GCK*) döntően a normális súlyú; míg az inzulinérzékenységet befolyásolók (pl. *PPARG*, *ADIPOQ*, *ENPP1*) elsősorban az elhízott egyénekben növelik a diabéteszrizikót [39]. A magyar vizsgálatban elsőként igazoltuk, hogy a *TCF7L2* gén a testtömeg-indextől függően növeli a diabéteszhajlamot a felnőttkori látens autoimmun diabétesz esetén is. Eredményeink szerint a génvariáns csak a nem-túlsúlyos egyénekben növeli a LADA kialakulásának kockázatát.

Nemrégiben *Szepietowska és munkatársai* azt találták, hogy a LADA betegek között a *TCF7L2* rs7903146 *T-allélt* hordozók esetén szignifikánsan kisebb a reziduális β-sejt funkció [111]. Saját vizsgálatunkban mi is azt észleltünk, hogy a *T-allélt* hordozóknál tendenciózusan alacsonyabb éhomi szérum C-peptid szintek mérhetők a LADA diagnózisának felállításakor, mint a *CC genotípusú* betegeknél, de a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns. Ezért az esetszám emelése révén megnövelt statisztikai erő mellett a vizsgálat ismétlését tervezzük. Humán kísérletek által igazolt,

hogy a *T-allélt* hordozókban károsodott az inzulinszekréció, csökkent az inkretinhatás és a glükózra adott inzulinválasz [116, 117]. Ezek az észlelések felvetik annak a lehetőségét, hogy a LADA betegekben a β-sejt diszfunkció hátterében az autoimmun sejtkárosodás mellett nem-autoimmun mechanizmusok is szerepet játszanak. További terveink között szerepel az újonnan diagnosztizált LADA betegek esetén a szérum C-peptid érték változásának nyomon követése a betegség kórlefolyása során. Feltehető ugyanis, hogy a *T-allélt* hordozó betegeknél a reziduális β-sejt funkció csökkenése gyorsabb, mint a CC genotípus esetén, azaz felmerül a *TCF7L2* gén betegség-progressziót befolyásoló hatása.

Eredményeink összefoglalásaként elmondható, hogy hat európai tanulmányt összesítő metaanalízisben bizonyítottuk, hogy a *TCF7L2* gén rs7903146 *C-T* polimorfizmusa populáció-független módon hozzájárul a felnőttkori látens autoimmun diabétesz létrejöttéhez az európai származásúakban, ugyanakkor az autoimmun mechanizmusú 1-es stípusú diabétesz kialakulában nem játszik szerepet. A LADA genetikai háttere átfedést mutat mind az 1-es, mind a 2-es típusú diabéteszre hajlamosító genetikai tényezőkkel, ezért a betegség patomechanizmusa valószínűleg kevert, autoimmun és nem-autoimmun folyamatok együttesére épül. A *TCF7L2* génvariáns feltehetően azáltal fokozza a LADA kialakulásának rizikóját, hogy nem-immunmediált β-sejt diszfunkción keresztül az inzulinszekréció további csökkenését okozza. Klinikai vizsgálataink eredménye a *TCF7L2* gén diabetogén hatásában egy erős fenotípus-genotípus interakció érvényesülését sugallja, ami a génhatás testtömeg-index általi befolyásolásában nyilvánul meg. Bár a *TCF7L2* gén közvetlenül nem hat az obezitás kialakulására, felnőttkori látens autoimmun diabéteszre való hajlamosító hatása úgy tűnik csak nem-túlsúlyos egyénekben jelenik meg.

<u>2. vizsgálat:</u> A 2-es típusú diabétesz genetikai hátterének vizsgálata

A 2-es típusú diabétesz multifaktoriális etiológiájú, poligénes öröklődésű betegség, patogenezisének kutatásában az utóbbi évek genetikai vizsgálatai jelentős eredményt hoztak; mára bizonyítottá vált, hogy a mind a β-sejtek működési defektusa, mind az inzulinhatás zavara lehet genetikailag meghatározott [39]. A legjelentősebb környezeti

tényezőnek továbbra is az elhízás tekinthető, ennek hátterében részben genetikai faktorok, részben pedig a túltáplálkozás és a mozgásszegény életmód áll. A ma érvényes legelfogadottabb hipotézis szerint 2-es típusú diabétesz akkor alakul ki, ha a β-sejt diszfunkcióra és/vagy az inzulinszekréció zavarára genetikailag hajlamos egyénben a környezeti tényezők hatására inzulinrezisztencia lép fel [36]. A GWA vizsgálatok során leírt gének többsége a β-sejtek működését befolyásolja (köztük az európai származásúakban jelenleg legerősebb diabetogenitásúnak tartott *TCF7L2* gén és a *CDKN2A/2B* gének), míg az inzulin iránti megváltozott érzékenység, az inzulinrezisztencia kialakulásáért felelős gének közül lényegesen kevesebb ismert (pl. *PPARG* gén) [39].

A *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmusának *T-alléljét* hordozókban feltehetően megváltozik a gén termékének, a TCF4 proteinnek a termelése és/vagy funkciója, mely miatt csökkenhet a hasnyálmirigyben a β-sejtek tömege, károsodhat az inzulintermelés és az inzulinkibocsátás - ezek együttesen pedig elősegíthetik a 2-es típusú diabétesz kialakulását [90, 91]. A *CDKN2A* és *CDKN2B* tumor szuppresszor gének, fehérjetermékeinek fő funkciója a ciklin-függő kinázok és a p53 tumor szuppresszor protein gátlása [96]. A gének közelében levő rs10811661 polimorfizmus *T-alléljéről* feltételezhető, hogy hordozása a Cdk4 fehérjetermék mennyiségi csökkenésével, a β-sejtek proliferációjának károsodásával és a β-sejtek tömegének csökkenésével jár [97, 98]. A *PPARG* gén fehérjeterméke magreceptorként funkcionál és számos gén transzkripcióját szabályozva szerepet játszik a szisztémás inzulinhatás kialakításában [118]. A gén rs1801282 polimorfizmusának vad *C-alléje* növelheti az inzulinrezisztencia és a 2-es típusú diabétesz kialakulásának kockázatát [95, 119].

A 2-es típusú diabétesszel kapcsolatos vizsgálataink elsődleges célja a 2-es típusú cukorbetegség genetikai hátterének elemzése volt a magyar populációban, ezért az európai származásúakban legerősebb diabetogenitású gének, a *TCF7L2*, a *CDKN2A/2B* és a *PPARG* hajlamosító hatását és a génvariánsok klinikai adatokkal való összefüggését analizáltuk. Emellett a *TCF7L2* gén esetén részletesen elemeztük a génhatás variabilitását, az allélfrekvenciák földrajzi megoszlását a különböző diabéteszformákban, mind a magyar, mind az európai populációkban.

Először eset-kontroll vizsgálatokban igazoltuk, hogy a három, 2-es típusú diabétesszel legerősebben asszociálódó gén, a *TCF7L2* gén rs7903146, a *CDKN2A/2B* gén rs10811661 és *PPARG* gén rs1801282 polimorfizmusai hajlamosítanak a 2-es típusú diabétesz kialakulására a magyar populációban is. Mindhárom gén rizikófokozó hatása az irodalmi adatokkal [100] összhangban van, a *TCF7L2* gén hajlamosító alléljének hordozása allélenként közel másfélszeresére, míg a *CDKN2A/2B* és *PPARG* gének esetén 1,2-szeresére fokozza a 2-es típusú cukorbetegség kockázatát a hazai populációban.

A *CDKN2A/2B* és *PPARG* gének az általunk vizsgált klinikai adatokkal nem mutattak összefüggést.

A *TCF7L2* gén hatása 2-es típusú diabéteszben – a felnőttkori látens autoimmun diabéteszben tapasztalthoz hasonlóan – a testtömeg-index-szel és a reziduális β-sejt funkciót tükröző szérum C-peptid szinttel szoros korrelációt mutatott. 2-es típusú cukorbetegekben a *TCF7L2* gén rs7903146 *T-allél* minden testsúly-kategóriában növelte a diabéteszrizikót, de a nem-túlsúlyos egyénekben kétszer erősebb volt a hatása. Ugyanakkor az egészséges kontrollcsoportban a *C-* és *T-allél* megoszlása testsúlytól független volt a magyar populációban is, ami megerősíti, hogy a *TCF7L2* gén európai származásúakban nem jelent független kockázati tényezőt az obezitás kialakulására.

A *T-allélt* hordozóknál szignifikánsan alacsonyabb éhomi szérum C-peptid szintek voltak mérhetők a 2-es típusú diabétesz diagnózisának felállításakor, mint a *CC genotípusú* betegeknél, ami alátámasztja azt a feltételezést, hogy a *TCF7L2* gén diabetogén hatását közvetlenül a β-sejteken, az inzulinszekréció csökkentésén keresztül fejti ki.

Ezt követően metaanalízisben erősítettük meg a *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmusának európai származásúakra vonatkozó populáció-független diabetogén hatását. Becsléseink szerint a gén 18%-os átlagos populációs járulékos kockázati hányadot képvisel a 2-es típusú diabétesz kialakulásában. A korábbi és a jelenlegi metaanalízisünk eredményeinek összehasonlítása azt igazolta, hogy a *TCF7L2* gén diabetogén hatáserőssége a LADA és a 2-es típusú diabétesz vonatkozásában nem különbözik szignifikánsan az európai populációkban.

A *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmus allélfrekvenciáinak geográfiai analízise során kimutattuk, hogy a hajlamosító *T-allél* megoszlása az európai anyagcsere-egészséges kontrollcsoportokban és a diabéteszes betegpopulációkban is észak-déli irányú gradienst képez. A *T-allél* frekvenciája az északi területeken volt a legalacsonyabb, a déli régiókban pedig a legmagasabb. Ezzel szemben az autoantitest pozitivitás és az autoimmun eredetű 1-es típusú diabétesz előfordulási gyakorisága észak-déli irányban csökken [120]. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy dél felé haladva az immunmediált folyamatok mellett nő a nem-autoimmun mechanizmusok szerepe a LADA patogenezisében.

Eredményeink összefoglalásaként elmondható, hogy az európai népcsoportokban a jelenleg ismert legerősebb 2-es típusú diabéteszre hajlamosító faktorok közül a *TCF7L2*, a *CDKN2A/2B* és a *PPARG* gén a magyar populációban is növeli a 2-es típusú cukorbetegség kialakulásának kockázatát. A *TCF7L2* gén a legerősebb hatású, a betegség-asszociált alléljének hordozása már a diabétesz diagnózisakor alacsonyabb reziduális β-sejt funkcióval jár, és a gén hatását feltehetően egy fenotípus-genotípus interakció is befolyásolja, hiszen úgy tűnik alacsonyabb testtömeg-index esetén a diabetogén hatás felerősödik. Bár európai származásúakban a *TCF7L2* gén populáció-független módon növeli a 2-es típusú diabétesz kialakulásának kockázatát, a rizikó allél előfordulási gyakorisága Európában észak-déli irányban nő a 2-es típusú és a felnőttkori látens autoimmun diabéteszes betegpopulációkban is, ami felveti annak a lehetőségét, hogy dél felé haladva az autoimmun folyamatok mellett fokozódik a nem-autoimmun mechanizmusok szerepe a LADA patogenezisében.

<u>3. vizsgálat:</u> Az 1-es típusú diabétesz genetikai hátterének vizsgálata

Bár az 1-es típusú diabéteszre hajlamosító gének a genomban elszórva találhatók, a felismerésük a teljes genom asszociációs vizsgálatok révén robbanásszerűen felgyorsult, és napjainkra 41 egypontos nukleotid polimorfizmust hoztak kapcsolatba a kórkép kialakulásával [121]. Az öröklődésben a fő szerep egyértelműen a családi halmozódások 40-50%-áért felelős *HLA-DQ-DR* lókuszé, míg az *inzulin gén*, a *PTPN22*

és a *CTLA4* génrégió együttesen további 10-15%-ban határozza meg a betegség iránti fogékonyságot [73].

Jelen vizsgálatunk célja a *PTPN22* és az *inzulin gén* diabetogén hatásának felmérése és a hajlamosító allélek klinikai adatokkal való összefüggésének elemzése volt a magyar populációban.

A *PTPN22* gén C1858T polimorfizmusára vonatkozó eredményeink azt igazolják, hogy a gén a magyar populációban is szoros összefüggést mutat az 1-es típusú diabétesszel, mert a hajlamosító *T-allél* hordozása allélenként 2-szeresére növeli a betegség kialakulásának kockázatát. Mára már elegendő számú tanulmányt végeztek ahhoz, hogy kimondhassuk a *PTPN22* gén autoimmunitással való kapcsolata populáció-független. Több független népcsoportban elvégzett genetikai vizsgálat alapján a *T-allél* előfordulási gyakoriságában egy észak-déli irányú geográfiai gradienst lehetett kimutatni. Ezek szerint az anyagcsere-egészséges háttér populációban a *T-allél* előfordulási gyakorisága legmagasabb Finnországban (15,5%), Svédországban (12%) és Angliában (8%), dél felé haladva ez az érték csökken: Spanyolországban 6% körül van, Olaszországban 2%. A *T-allél* az afrikai amerikaiakban és az ázsiai populációkban hiányzik. A magyar kontrollcsoportban a *T-allél* gyakorisága 10%-nak bizonyult, ami megfelel a közép-európai átlagnak. A *PTPN22* gén C1858T polimorfizmus felhalmozódásának populáció-genetikai oka egyelőre nem ismert, nem tudni, hogy a *T-allélhordozás* milyen szelekciós genetikai előnyt jelent(hetett) a Föld északi területein.

Klinikai vizsgálatunkban sikerült megerősítenünk azt az először *Petrone és munkatársai* által közölt eredményt, miszerint a *T-allélt* hordozó betegek szignifikánsan alacsonyabb reziduális β-sejt kapacitással bírnak az 1-es típusú diabétesz diagnózisának felállításakor [122]. A *T-allél* kódolta kóros LYP fehérje kevésbé hatékonyan szuppresszálja az autoreaktív T-sejteket, ami magyarázatot jelenthet a *T-allélt* hordozókban észlelt agresszívebb β-sejt destrukcióra. Ennek igen nagy klinikai jelentősége van, hiszen *Palmer és munkatársainak* vizsgálata rámutatott, hogy 0,1 mmol/l C-peptid eltérés már klinikailag jelentős mértékű β-sejt funkció különbséget jelez [123]. A DCCT tanulmány eredményei pedig azt igazolták, hogy a viszonylag szerényebb mértékű β-sejt kapacitás megőrzése is jelentős klinikai

haszonnal jár, a tartósan stabilabb metabolikus állapot és a késői szövődmények (elsősorban a retinopátia és a nefropátia) szempontjából [124].

Az autoimmun betegségek többségével ellentétben 1-es típusú diabéteszben mindkét nem közel egyformán érintett. Ezért több munkacsoport is vizsgálta a *PTPN22* gén C1858T polimorfizmus nem-specifikus hatását. A finn populációban például a *T-allélt* hordozó férfiaknak, míg a német és a dán népcsoportban a *T-allélt* hordozó nőknek volt nagyobb a diabétesz rizikója [125-127]. Saját vizsgálatunkban a nemekre stratifikált analízis során a lányok és a fiúk között nem volt szignifikáns különbség, tehát a *T-allél* hajlamosító hatása mindkét nemben egyaránt fontosnak bizonyult. Ezen különbségek magyarázata valószínűleg a vizsgált populációk genetikai heterogenitásában keresendő, illetve a minor allél különböző előfordulási gyakoriságának és eltérő hatáserősségének tudható be.

Több tanulmányban is vizsgálták a diabetogén *T-allél* és a cukorbetegség diagnózisakor betöltött életkor közötti kapcsolat lehetőségét, az eredmények ez esetben is meglehetősen ellentmondásosak. *Nielsen és munkatársai* a különböző genotípusú gyermekeknél a betegség kezdetén betöltött életkor összehasonlításakor azt találták, hogy a *TT homozigóta* pácienseknél fiatalabb életkorban kezdődött a betegség, mint a *CT* és a *CC genotípusú* egyéneknél [126]. *Ladner és munkacsoportja* is kapcsolatot talált a *T-allélhordozás* és a koraibb betegség manifesztáció között. Az a megfigyelés miszerint a *TT homozigóta* pácienseknél fiatalabb életkorban kezdődött a betegség azt jelzi, hogy már egyetlen *C-allél* kópia hordozása esetén is elegendő mennyiségű normális LYP fehérje termelődik annyi Csk és/vagy Grb molekula kötéséhez, ami sikeresen lecsökkenti a T-sejt válasz mértékét. Másrészt feltételezhető, hogy a *T-allél* hordozása esetén bekövetkező T-sejt hiperreaktivitás miatt korábban kezdődik a hasnyálmirigyben a β-sejtek destrukciója, ami a cukorbetegség fiatalabb életkorban történő megjelenéséhez vezet. Saját vizsgálatunkban – sok más tanulmányhoz hasonlóan - nem sikerült összefüggést kimutatni a *T-allélhordozás* és a diagnóziskori életkor között. Ugyanakkor az is ismert, hogy a *PTPN22* gén C1858T polimorfizmusa részt vesz az inzulinspecifikus humorális autoimmunitás szabályozásában [125]. A *TT homozigóta* páciensek esetén az inzulin elleni autoantitestek (IAA) hamarabb megjelennek, ami a multiplex autoantitest pozitivitás koraibb kialakulásához vezet. Ez felveti a *PTPN22* gén *T-allél* diabétesz-progressziót felgyorsító hatását. Összességében

az eltérő eredmények az autoimmunitás kialakulásának komplexitására hívják fel a figyelmet, vagyis hogy számos, részben még ismeretlen T-sejt faktor befolyásolja az autoimmun státuszt, a β-sejt károsodás mértékét és a betegség megjelenésének időpontját.

Vizsgálataink *inzulin génre* vonatkozó részében sikerült az INS-VNTR régió markereként használt -23HphI A/T polimorfizmus és az 1-es típusú diabétesz között szoros összefüggést kimutatnunk a magyar populációban is. A hajlamosító, VNTR I. osztályt jelző *A-allél* homozigóta AA genotípus formában 2,69-szeresére fokozta a magyar betegek 1-es típusú diabétesz rizikóját. *Vafiadis és munkatársainak* vizsgálata bizonyította, hogy az INS-VNTR allélek hossza arányos az inzulin transzkripció szintjével a tímuszban [128], ami központi jelentőségű az inzulin, mint szövetspecifikus autoantigénnel szembeni immuntolerancia kialakításában. Korábbi vizsgálatok azt igazolták, hogy az *inzulin gén* fontos szerepet játszik az inzulin specifikus autoimmunitás inicializálásában és szabályozásában [129]. Az *inzulin gén* VNTR I. osztályú allél jelenléte fokozza az inzulin elleni autoantitest (IAA) kialakulását. Az 1-es típusú diabétesz patogenezisének vizsgálata során pedig két fő irány látszik elkülönülni, egy *inzulin géntől függő* és egy attól *független útvonal*. Az *inzulin géntől függő útvonal* esetében az inzulin elleni autoantitestek megjelenése már igen fiatal életkorban várható, ez pedig fokozott rizikót jelent az „antigén szétterjedés” jelensége (antigen spreading) következtében a komplex autoimmunitás fellépésére. Saját vizsgálatunkban a vártnak megfelelően csak egyetlen genotípus jelentett fokozott rizikót T1DM kialakulására, a VNTR I/I osztályt jelképező *homozigóta AA genotípus*. Ugyanakkor a VNTR III/III. osztálynak megfelelő *homozigóta TT* és VNTR I/III. osztálynak megfelelő *AT heterozigóta genotípus* védő hatása nagyon hasonló volt, ami a *T-allél* domináns protektív voltát bizonyítja.

Eredményeink összefoglalásaként elmondható, hogy a magyar populációban elsőként igazoltuk a *PTPN22* gén C1858T és az *inzulin gén* -23HphI A/T polimorfizmusának 1-es típusú diabétesszel való szoros kapcsolatát. Továbbá összefüggést találtunk a *PTPN22* gén *T-allélhordozás* és a csökkent reziduális β-sejt funkció között, ami az adott allélvariáns betegség fenotípusra való hatását jelzi.

doi:10.14753/SE.2013.1801

<u>4. vizsgálat:</u> 1-es típusú diabétesz, Hashimoto tireoiditisz és juvenilis reumatoid artritisz triásza: esettanulmány klinikai és genetikai vizsgálatokkal

Az autoimmun betegségek egy egyénen illetve családon belüli halmozódása jól ismert jelenség, ugyanakkor triász kialakulása nem gyakori. Bár a szervspecifikus autoimmun betegségek egyedi klinikai és szerológiai vonásokkal bírnak, e jegyek között gyakori az átfedés mind az adott egyénekben, mind a családokon belül. A humán autoimmunitás genetikai hátterének egyre pontosabb megismerése pedig előrevetíti a közös patogenetikai útvonalak lehetőségét kialakulásuk során.

Irodalmi közlések szerint az 1-es típusú diabétesz, a Hashimoto tireoiditisz és a juvenilis reumatoid artritisz együttes megjelenése meglehetősen ritka [130-133]. A publikált esetek többsége lány, ami nem véletlen, hiszen az autoimmun betegségek általános jellemzője a női túlsúly, kivétel ez alól az 1-es típusú diabétesz, melyben mindkét nem egyformán érintett. A női predominanciára magyarázatot jelenthet bizonyos gének patogenezisben betöltött nemre-specifikus faktor volta [134], de felvetik a hajlamosító gének női nemben esetlegesen megnövekedett penetranciáját is [135]. A legtöbb betegnél – a mi esetünkhöz hasonlóan – a T1DM-et diagnosztizálták először, hónapokkal vagy évekkel ezt követően alakult ki a pajzsmirigy betegség és a juvenilis reumatoid artritisz. Ezen betegségek klaszterszerű halmozódása miatt felmerül a közös genetikai háttér, a hajlamosító major és minor genetikai faktorok közötti átfedés lehetősége [135]. Három olyan gén ismert, mely konzekvensen asszociálódik több autoimmun betegséggel is, ezek a *HLA*, a *CTLA4* és a *PTPN22* gének, melyek így fő autoimmunitás géneknek tekinthetők. Betegünk esetén e gének betegség-asszociált polimorfizmusait határoztuk meg.

Az 1-es típusú diabétesz szempontjából a *HLA-DQB1* lókusz az elsődleges determináns, ezt módosítja a *DQA1*, *DRB1* és néhány I. és III. osztályú gén hatása [73]. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a *DQB1*0301/*0503* protektívnek számít a T1DM szempontjából a magyar populációban [136]. A becsült esélyhányados 0,1, de a pontos OR-t a genotípus ritkasága miatt nem lehet meghatározni. Betegünknél tehát a protektív *HLA* genotípusa ellenére igen korán, már két éves korában első szervspecifikus autoimmun betegségként jelent meg az 1-es típusú diabétesz. Ugyanakkor vizsgálatok igazolták, hogy az elmúlt évtizedekben egyre több olyan egyénben alakul ki diabétesz,

akiknek *HLA* genotípusa korábban védő hatásúnak bizonyult a betegséggel szemben. Azaz az utóbbi években alacsonyabb genetikai rizikó is elegendő a T1DM kialakulásához, és a korábban védő allélek most inkább semleges hatást mutatnak. Ez felveti a *HLA*-hoz köthető genetikai hajlam fontosságának csökkenését és/vagy a környezeti nyomás növekedésének lehetőségét [137]. Nemrégiben állatkísérletekben az is egyértelműen bizonyítást nyert, hogy a diabéteszre hajlamosító MHC genotípusok jelenléte nem abszolút szükséges a β-sejt specifikus autoimmunitás kialakulásához [138].

A triász egyetlen szisztémás tagja, a juvenilis reumatoid artritisz szempontjából a *HLA* I. és II. osztályú allélek a meghatározóak, betegünk egyik haplotípusa, a *DRB1*0401-DQA1*03-DQB1*0301* a betegségre hajlamosító hatású [139, 140].

Több tanulmány is igazolta a *HLA-DR3* és *DR4* haplotípusok összefüggését Hashimoto tireoiditisszel, így betegünk genotípusa emelkedett rizikót jelent a pajzsmirigybetegség kialakulására is [141].

A teljes genom asszociációs vizsgálati stratégia alkalmazása nyomán az utóbbi években egyre nő az autoimmun betegségekkel kapcsolatba hozható, *nem-HLA* gének száma, így a komplex genetikai háttér lassan megismerhetővé válik. A genetikai faktorok jelentőségét tekintve - az ismereteink növekedésével - észlelhető bizonyos eltolódás a korábban „egyeduralkodó” *HLA* rendszer felől a *nem-HLA* gének irányába.

Ismert, hogy a *CTLA4* gén következetesen asszociálódik 1-es típusú diabétesszel és autoimmun tireoiditisszel is, de a juvenilis reumatoid artritisz esetén ellentmondásosak az eredmények. A betegünk *AG heterozigóta* genotípusa az 1-es típusú diabétesz és az autoimmun tireoiditisz szempontjából hajlamosító hatású, de az asszociáció erőssége meglehetősen szerény, a hajlamosító *G-allélre* vonatkozó esélyhányados 1,5 körül van [134].

A *PTPN22* gén C1858T polimorfizmusának *T-allélje* hajlamosító hatással bír az 1-es típusú diabétesz, az autoimmun tireoiditisz és a reumatoid artritisz szempontjából is [135]. Juvenilis reumatoid artritiszben *PTPN22* gén C1858T polimorfizmusról eltérő eredményeket publikáltak a különböző populációkban, ez a betegség-asszociáció etnikum-specifikus voltára utal, szemben a sokkal inkább általános érvényű, populáció-független *HLA* II. osztályú allélekkel. Egy nemrégiben publikált tanulmányban a *PTPN22* gén és a juvenilis reumatoid artritisz között a magyar populációban nem

sikerült kapcsolatot kimutatni [140]. A betegünk *CT heterozigóta* genotípusa tehát a T1DM és a Hashimoto tireoiditisz kockázatát növelte (a *T-allélre* vonatkozó esélyhányadosok 2,0 és 1,77), a juvenilis reumatoid artritiszét nem.

A diverz fenotípusos jellegek ellenére az autoimmun betegségek aggregációs tendenciája azt sugallja, hogy közös lehet a betegségek etiopatogenezisében néhány, elsősorban a humorális és celluláris immunrendszer autoantigénekkel szembeni reaktivitását meghatározó útvonal, és mindez talán a közös genetikai háttéren alapul. A betegünk részletes genetikai vizsgálatai rávilágítottak a *HLA* és *nem-HLA* gének közötti interakció és additív hatás fontosságára, melyek a környezeti hatásokkal együttesen szabják meg a betegség végső klinikai képét. A különböző szervspecifikus és szisztémás autoimmun betegségek egyedi kombinációja esetén végzett genetikai vizsgálatok, és különösen azok klinikai szubfenotípusokkal való kapcsolatának elemzése segíthet azonosítani a közös etiológiai útvonalakat és az autoimmunitás biológiai alapjait.

Természetesen tisztában vagyunk azzal, hogy az egyetlen beteg esetén végzett genetikai vizsgálati eredményekből messzemenő következtetéseket levonni nem lehet. E gének hajlamosító vagy védő hatása nagy esetszámú populációgenetikai vizsgálatokban igazolt, így az eredmények alkalmazása egyedi esetben erősen korlátozott értékű. Sajnos azonban az *EURODIAB* részeként működő *Gyermekdiabetes Regiszter* teljes adatbázisának átnézésével sem sikerült hasonló autoimmun triászra bukkanunk, ezért kezdeményeztük egy nemzetközi adatbázis létrehozását a több autoimmun betegségben szenvedő betegek klinikai és genetikai adatainak gyűjtésére, mely jelenősen javíthatja a kutatási lehetőségeket.

doi:10.14753/SE.2013.1801

6. KÖVETKEZTETÉSEK

A felnőttkori látens autoimmun diabétesszel kapcsolatban tett megállapítások

- A *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmusa populáció-független módon hajlamosít felnőttkori látens autoimmun diabétesz kialakulására az európai származású egyénekben. A génhatás erőssége nem különbözik szignifikánsan LADA és 2-es típusú diabétesz esetén. A LADA genetikai háttere átfedést mutat mind az 1-es, mind a 2-es típusú diabéteszre hajlamosító genetikai tényezőkkel, így feltételezhető, hogy a kórkép patomechanizmusában autoimmun és nem-autoimmun folyamatok is szerepet játszanak.
- A *TCF7L2* gén betegség-asszociált *T-alléljének* előfordulási gyakorisága Európában észak-déli irányban nő a háttér- és a felnőttkori látens autoimmun diabéteszes populációban egyaránt, míg az autoimmun diabétesz incidenciája dél felé haladva csökken. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a déli területeken a nem-autoimmun mechanizmusok szerepe nő a LADA patogenezisében.
- A *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmusa összefüggést mutat a felnőttkori látens autoimmun diabétesszel a magyar populációban is. Hazánkban a *T-allél* hordozása 1,34-szeresére növeli a LADA kialakulásának a kockázatát, ami körülbelül 15%-os populációs járulékos kockázati hányadot jelent. A magyar populációban a *TCF7L2* gén diabetogén hatásában egy erős fenotípus-genotípus interakció érvényesül: a génvariáns csak a nem-túlsúlyos egyénekben növeli a LADA kialakulásának kockázatát.
- A *TCF7L2* gén rs7903146 *T-allélhordozók* esetén a LADA betegség diagnózisakor tendenciózusan kisebb reziduális β-sejt funkció észlelhető, ezért feltételezhető, hogy a génvariáns diabetogén hatását - a 2-es típusú diabéteszben már bizonyított módon – a β-sejt diszfunkció fokozásán keresztül fejti ki.

doi:10.14753/SE.2013.1801

Az 1-es típusú diabétesszel kapcsolatban tett megállapítások

- A *PTPN22* gén C1858T polimorfizmusa jelentős diabetogén hatással bír a magyar populációban, a betegség-asszociált *T-allélhordozás* kétszeresére növeli az 1-es típusú diabétesz rizikóját, de nem mutat összefüggést a betegek nemével és diabétesz diagnózisakor betöltött életkorával. Közvetlen kapcsolat mutatható ki a *PTPN22* gén C1858T polimorfizmusa és a klinikai fenotípus között: a betegség-asszociált *T-allélhordozók* szignifikánsan alacsonyabb éhomi szérum C-peptid szinttel, azaz kisebb reziduális β-sejt kapacitással bírnak az 1-es típusú diabétesz manifesztációjakor.
- Az *INS* gén -23HphI polimorfizmusa esetén a VNTR III. osztályt jelző *T-allél* dominánsan protektív hatású az 1-es típusú diabétesz kialakulása szempontjából a magyar populációban, míg a *homozigóta AA genotípus* a beteg nemétől és életkorától függetlenül közel háromszorosára növeli a betegség kockázatát.
- Az autoimmun betegségek genetikai lókuszai jelentős átfedést mutatnak, mely felveti a közös etiopatogenetikai útvonalak lehetőségét. Az autoimmunitás fő genetikai determinánsainak, a *HLA* lókuszoknak a jelentősége az elmúlt évtizedekben - valószínűleg a megnövekedett környezeti nyomás hatására - csökkent, az egyedi klinikai fenotípust a major és minor genetikai fakorok kölcsönhatása határozza meg.

A 2-es típusú diabétesszel kapcsolatban tett megállapítások

- A *TCF7L2* gén rs7903146, a *CDKN2A/2B gén* rs10811661 és a *PPARG* gén rs1801282 polimorfizmusai a magyar populációban nemtől és életkortól függetlenül hajlamosítanak 2-es típusú diabétesz kialakulására. Valamennyi gén hatáserőssége az irodalmi adatokkal összhangban van.
- A *TCF7L2* gén 2-es típusú diabéteszre vonatkozó hajlamosító hatását a testtömeg-index befolyásolja: a betegség-asszociált *T-allél* minden testsúly-kategóriában növeli a 2-es típusú diabétesz kockázatát, de a nem-túlsúlyos

egyének esetén a diabetogén hatás több mint kétszer erősebb, mint a túlsúlyosok esetén.

- A *TCF7L2* gén rs7903146 *T-allélhordozóknál* szignifikánsan kisebb reziduális β-sejt funkció észlelhető a 2-es típusú diabétesz diagnózisakor, mint a *CC genotípusú* egyéneknél, ami megerősíti, hogy a *TCF7L2* génvariáns diabetogén hatását közvetlenül a β-sejteken, az inzulinszekréció csökkentésén keresztül fejti ki.

doi:10.14753/SE.2013.1801

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Háttér: A WHO osztályozása szerint a diabétesznek két fő etiológiai csoportja van: az 1-es típusú diabétesz, mely genetikailag fogékony egyénekben a hasnyálmirigy β-sejtek immun-mediált pusztulása miatt környezeti tényezők hatására jön létre és a 2-es típusú diabétesz, mely β-sejt diszfunkcióra genetikailag hajlamos egyénekben a környezeti tényezők hatására fellépő inzulinrezisztencia nyomán alakul ki. Az utóbbi évek vizsgálatai azonban a két kórkép számos közös patogenetikai vonását tárták fel, ami felveti a jelenlegi osztályozási rendszer újragondolásának szükségességét.

Célkitűzések: Az eset-kontroll vizsgálatokban célom az 1-es típusú, a felnőttkori látens autoimmun illetve a 2-es típusú diabétesz genetikai faktorainak vizsgálta volt magyar és más európai népcsoportokban. A klinikai vizsgálatokban a gének hajlamosító alléljei és a betegség-fenotípus közötti kapcsolatokat kerestem. Egy esettanulmány kapcsán egy 1-es típusú diabétesszel induló autoimmun betegségtriász részletes genetikai vizsgálatai révén a közös patogenetikai útvonalak lehetőségét elemeztem.

Eredmények: Metaanalízisben bizonyítottuk, hogy a 2-es típusú diabéteszre hajlamosító *TCF7L2* rs7903146 polimorfizmus az európai származásúakban populáció-független módon növeli a felnőttkori látens autoimmun diabétesz kialakulásának kockázatát. Ezzel alátámasztottuk, hogy a korábban tisztán autoimmun eredetűnek tartott kórkép patomechanizmusában nem-autoimmun kórfolyamatok is szerepet játszanak. Igazoltuk, hogy a *TCF7L2* gén hatáserőssége felnőttkori látens autoimmun és 2-es típusú diabétesz esetén hasonló, és a génhatást a testtömeg-index befolyásolhatja: normális testsúly esetén erősebb a diabetogén hatás. A magyar populációban elsőként bizonyítottuk, hogy a *PTPN22* rs2476601 és az *INS* gén rs689 polimorfizmusa az 1-es típusú diabétesz, a *TCF7L2* rs7903146, a *CDKN2A/2B* rs10811661 és a *PPARG* gén rs1801282 polimorfizmusa pedig a 2-es típusú diabétesz kialakulására hajlamosít. A *PTPN22* és a *TCF7L2* gén esetén direkt kapcsolatot találtunk a genotípus és a fenotípus között, a hajlamosító allélt hordozóknál kisebb reziduális β-sejt funkció volt észlelhető az 1-es illetve a 2-es típusú diabétesz diagnózisakor, mint a homozigóta vad genotípusú betegeknél. Az esettanulmányban a *HLA DR-DQ*, a *PTPN22* és a *CTLA4* gén polimorfizmusaira vonatkozó vizsgálatok rámutattak a humán autoimmunitás genetikai lókuszainak jelentős átfedésére, a major és minor genetikai fakorok kölcsönhatásának fontosságára az egyedi klinikai fenotípus meghatározásában.

doi:10.14753/SE.2013.1801

8. SUMMARY

Background: According to the WHO's classification diabetes has been divided into two etiological subgroups: type 1 diabetes, which develops in patients with genetic susceptibility as a result of immune-mediated destruction of pancreatic β-cells, affected by triggering environmental factors vs. type 2 diabetes, which develops as an interaction of genetic susceptibility to β-cell dysfunction and insulin resistance caused by environmental factors. Recent studies explored some similarities in the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes, which suggest that the current diabetes classification scheme needs to be re-evaluated.

Aims: The aim of case-control studies was to analyse the genetic background of type 1 diabetes, the latent autoimmune diabetes in adults and type 2 diabetes in Hungarians and other Europeans. In the clinical studies I assessed the relationship between the risk allele of genetic factors and the clinical phenotype. I reported a case of a child affected by type 1 diabetes and two other autoimmune disorders aggregated in a triad and analysed the possibility of shared genetic pathways in the pathogenesis.

Results: Our meta-analysis demonstrated that the type 2 diabetes-associated variant in *TCF7L2* gene is a population-independent susceptibility locus for latent autoimmune diabetes in adults in Europeans. We confirmed that the autoimmune and non-autoimmune mechanisms can contribute to the pathogenesis of latent autoimmune diabetes in adults. Our results suggested that the effect size of *TCF7L2* gene is similar for latent autoimmune diabetes in adults and type 2 diabetes. The gene effect on diabetes risk may be modulated by BMI, such that the lower the BMI, the higher the gene effect. We justified for the first time that the *PTPN22* rs2476601 and the *INS* rs689 polymorphisms increase the risk for developing type 1 diabetes and the *TCF7L2* rs7903146, the *CDKN2A/2B* rs10811661 and the *PPARG* rs1801282 polymorphisms contribute to the susceptibility of type 2 diabetes in Hungarians. A phenotype-genotype interaction was found in cases of *PTPN22* and *TCF7L2* genes, the risk allele carriers had less residual β-cell function at the diagnosis of type 1 or type 2 diabetes than patients with homozygote wild genotype. In the case report the genetic results regard to the *HLA DR-DQ*, *PTPN22* and *CTLA4* variants call attention to overlapping genetic loci of human autoimmunity and the importance of interaction between major and minor genetic factors in determining the individual clinical phenotype.

9. IRODALOMJEGYZÉK

[1] Rioux JD, Abbas AK (2005) Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. Nature 435: 584-589

[2] Craig, J., (2008) *Complex diseases: Research and applications.* Nature Education, http://www.nature.com/scitable/topicpage/complex-diseases-research-and-applications-748

[3] Prohaszka, Z., (2005) *Jelezhető lesz-e a gyakori betegségekre való fogékonyság genetikai ismeretekkel?* Magyar tudomány. 166. évf. 6. sz. 645-651. old.

[4] www.genome.gov

[5] Korányi László - Pánczél Pál. (2006) A cukorbetegség (diabetes mellitus) genetikája Magyar tudomány, 167. évf. 3. sz. 295-304. old.

[6] Dauber A, Hirschhorn JN (2011) Genome-wide association studies in pediatric endocrinology. Horm Res Paediatr 75: 322-328

[7] Concannon P, Gogolin-Ewens KJ, Hinds DA, Wapelhorst B, Morrison VA, Stirling B, Mitra M, Farmer J, Williams SR, Cox NJ, Bell GI, Risch N, Spielman RS. (1998) A second-generation screen of the human genome for susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. Nat Genet 19: 292-296

[8] Himsworth, H.P., (1936) *Diabetes mellitus: its differentiation into insulin-sensitive and nsulin-insensitive types.* Lancet, p.:127–130.

[9] Gale EA (2006) Declassifying diabetes. Diabetologia 49: 1989-1995

[10] Alberti KG, Zimmet PZ (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabet Med 15: 539-553

[11] (2012) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 35 Suppl 1: S64-71

[12] Achenbach P, Bonifacio E, Koczwara K, Ziegler AG (2005) Natural history of type 1 diabetes. Diabetes 54 Suppl 2: S25-31

[13] Redondo MJ, Eisenbarth GS (2002) Genetic control of autoimmunity in Type I diabetes and associated disorders. Diabetologia 45: 605-622

[14] Zang W, Lin M, Kalache S, Zhang N, Kruger B, Waaga-Gasser AM, Grimm M, Hancock W, Heeger P, Schroppel B, Murphy B. (2008) Inhibition of the alloimmune response through the generation of regulatory T cells by a MHC class II-derived peptide. J Immunol 181: 7499-7506

[15] Liu E, Yu L, Moriyama H, Eisenbarth GS (2004) Animal models of insulin-dependent diabetes. Methods Mol Med 102: 195-212

[16] Mathis D, Vence L, Benoist C (2001) beta-Cell death during progression to diabetes. Nature 414: 792-798

[17] Achenbach P, Warncke K, Reiter J, Naserke HE, Williams AJ, Bingley PJ, Bonifacio E, Ziegler AG. (2004) Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics. Diabetes 53: 384-392

[18] Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Nierras C, Plagnol V, Pociot F, Schuilenburg H, Smyth DJ, Stevens H, Todd JA, Walker NM, Rich SS. (2009) Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. Nat Genet 41(6):703-7

[19] Lorenzen T, Pociot F, Hougaard P, Nerup J (1994) Long-term risk of IDDM in first-degree relatives of patients with IDDM. Diabetologia 37: 321-327

[20] Singal DP, Blajchman MA (1973) Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. Diabetes 22: 429-432

[21] Nerup J, Platz P, Andersen OO, Christy M, Lyngsoe J, Poulsen JE, Ryder LP, Nielsen LS, Thomsen M, Svejgaard A. (1974) HL-A antigens and diabetes mellitus. Lancet 2: 864-866

[22] Todd JA, Bell JI, McDevitt HO (1987) HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. Nature 329: 599-604

[23] Mehers KL, Gillespie KM (2008) The genetic basis for type 1 diabetes. Br Med Bull 88: 115-129

[24] Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, Bailey R, Nejentsev S, Field SF, Payne F, Lowe CE, Szeszko JS, Hafler JP, Zeitels L, Yang JH, Vella A, Nutland S, Stevens HE, Schuilenburg H, Coleman G,

Maisuria M, Meadows W, Smink LJ, Healy B, Burren OS, Lam AA, Ovington NR, Allen J, Adlem E, Leung HT, Wallace C, Howson JM, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Simmonds MJ, Heward JM, Gough SC, Dunger DB, Wicker LS, Clayton DG. (2007) Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. Nat Genet 39: 857-864

[25] Knip M, Veijola R, Virtanen SM, Hyoty H, Vaarala O, Akerblom HK (2005) Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. Diabetes 54 Suppl 2: S125-136

[26] Gillespie KM, Bain SC, Barnett AH, Bingley PJ, Christie MR, Gill GV, Gale EA. (2004) The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of high-risk HLA haplotypes. Lancet 364: 1699-1700

[27] Madacsy L (2011) [Prediction and prevention of type 1 diabetes mellitus: initial results and recent prospects]. Orv Hetil 152: 1916-1921

[28] Smyth DJ, Cooper JD, Bailey R, Field S, Burren O, Smink LJ, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Widmer B, Dunger DB, Savage DA, Walker NM, Clayton DG, Todd JA. (2006) A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. Nat Genet 38: 617-619

[29] Lonnrot M, Korpela K, Knip M, Ilonen J, Simell O, Korhonen S, Savola K, Muona P, Simell T, Koskela P, Hyoty H. (2000) Enterovirus infection as a risk factor for beta-cell autoimmunity in a prospectively observed birth cohort: the Finnish Diabetes Prediction and Prevention Study. Diabetes 49: 1314-1318

[30] Dotta F, Censini S, van Halteren AG, Marselli L, Masini M, Dionisi S, Mosca F, Boggi U, Muda AO, Prato SD, Elliott JF, Covacci A, Rappuoli R, Roep BO, Marchetti P. (2007) Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulitis in recent-onset type 1 diabetic patients. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 5115-5120

[31] Groop LC, Bottazzo GF, Doniach D (1986) Islet cell antibodies identify latent type I diabetes in patients aged 35-75 years at diagnosis. Diabetes 35: 237-241

[32] Tuomi T, Groop LC, Zimmet PZ, Rowley MJ, Knowles W, Mackay IR (1993) Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes

mellitus in adults with a non-insulin-dependent onset of disease. Diabetes 42: 359-362

[33] Naik RG, Brooks-Worrell BM, Palmer JP (2009) Latent autoimmune diabetes in adults. J Clin Endocrinol Metab 94: 4635-4644

[34] Hosszufalusi N, Vatay A, Rajczy K, Prohaszka Z, Pozsonyi E, Horvath L, Grosz A, Gero L, Madacsy L, Romics L, Karadi I, Fust G, Panczel P. (2003) Similar genetic features and different islet cell autoantibody pattern of latent autoimmune diabetes in adults (LADA) compared with adult-onset type 1 diabetes with rapid progression. Diabetes Care 26: 452-457

[35] Grant SF, Hakonarson H, Schwartz S (2010) Can the genetics of type 1 and type 2 diabetes shed light on the genetics of latent autoimmune diabetes in adults? Endocr Rev 31: 183-193

[36] Florez JC (2008) Newly identified loci highlight beta cell dysfunction as a key cause of type 2 diabetes: where are the insulin resistance genes? Diabetologia 51: 1100-1110

[37] Urich E (2005) [Insulin resistance: the adipose tissue in the focus]. Orv Hetil 146: 2199-2207

[38] Vándorfi, G., Urich E. (2006) *A pancreas béta-sejtjeinek diszfunkciója és protekciója 2-es típusú cukorbetegségben.* LAM, 16. évf. 5. sz. 401-409. old.

[39] Cauchi S, Nead KT, Choquet H, Horber F, Potoczna N, Balkau B, Marre M, Charpentier G, Froguel P, Meyre D. (2008) The genetic susceptibility to type 2 diabetes may be modulated by obesity status: implications for association studies. BMC Med Genet 9: 45

[40] McCarthy MI (2010) Genomics, type 2 diabetes, and obesity. N Engl J Med 363: 2339-2350

[41] Ling C, Groop L (2009) Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. Diabetes 58: 2718-2725

[42] Lin J, Zhou ZG, Wang JP, Zhang C, Huang G (2008) From Type 1, through LADA, to type 2 diabetes: a continuous spectrum? Ann N Y Acad Sci 1150: 99-102

[43] Brooks-Worrell B, Palmer JP (2011) Is diabetes mellitus a continuous spectrum? Clin Chem 57: 158-161

[44] Zavala AV, Fabiano de Bruno LE, Cardoso AI, Mota AH, Capucchio M, Poskus E, Fainboim L, Basabe JC. (1992) Cellular and humoural autoimmunity markers in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients with secondary drug failure. Diabetologia 35: 1159-1164

[45] Donath MY, Schumann DM, Faulenbach M, Ellingsgaard H, Perren A, Ehses JA (2008) Islet inflammation in type 2 diabetes: from metabolic stress to therapy. Diabetes Care 31 Suppl 2: S161-164

[46] Boni-Schnetzler M, Ehses JA, Faulenbach M, Donath MY (2008) Insulitis in type 2 diabetes. Diabetes Obes Metab 10 Suppl 4: 201-204

[47] Goel A, Chiu H, Felton J, Palmer JP, Brooks-Worrell B (2007) T-cell responses to islet antigens improves detection of autoimmune diabetes and identifies patients with more severe beta-cell lesions in phenotypic type 2 diabetes. Diabetes 56: 2110-2115

[48] Chiu HK, Tsai EC, Juneja R, Stoever J, Brooks-Worrell B, Goel A, Palmer JP. (2007) Equivalent insulin resistance in latent autoimmune diabetes in adults (LADA) and type 2 diabetic patients. Diabetes Res Clin Pract 77: 237-244

[49] Xu P, Cuthbertson D, Greenbaum C, Palmer JP, Krischer JP (2007) Role of insulin resistance in predicting progression to type 1 diabetes. Diabetes Care 30: 2314-2320

[50] Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, MacMurray J, Meloni GF, Lucarelli P, Pellecchia M, Eisenbarth GS, Comings D, Mustelin T. (2004) A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. Nat Genet 36: 337-338

[51] Onengut-Gumuscu S, Buckner JH, Concannon P (2006) A haplotype-based analysis of the PTPN22 locus in type 1 diabetes. Diabetes 55: 2883-2889

[52] Qu H, Tessier MC, Hudson TJ, Polychronakos C (2005) Confirmation of the association of the R620W polymorphism in the protein tyrosine phosphatase PTPN22 with type 1 diabetes in a family based study. J Med Genet 42: 266-270

[53] Saccucci P, Del Duca E, Rapini N, Verrotti A, Piccinini S, Maccari A, Canu G, Angelini F, Fontana L, Giannini C, Chiarelli F, Manca Bitti ML, Bottini N. (2008) Association between PTPN22 C1858T and type 1 diabetes: a replication in continental Italy. Tissue Antigens 71: 234-237

[54] Yu X, Sun JP, He Y, Guo X, Liu S, Zhou B, Hudmon A, Zhang ZY. (2007) Structure, inhibitor, and regulatory mechanism of Lyp, a lymphoid-specific tyrosine phosphatase implicated in autoimmune diseases. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 19767-19772

[55] Gregersen PK (2005) Gaining insight into PTPN22 and autoimmunity. Nat Genet 37: 1300-1302

[56] Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orru V, Zavattari P, Nika K, Tautz L, Tasken K, Cucca F, Mustelin T, Bottini N. (2005) Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. Nat Genet 37: 1317-1319

[57] Vang T, Miletic AV, Bottini N, Mustelin T (2007) Protein tyrosine phosphatase PTPN22 in human autoimmunity. Autoimmunity 40: 453-461

[58] Bell GI, Horita S, Karam JH (1984) A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes 33: 176-183

[59] Nakayama M, Abiru N, Moriyama H, Babaya N, Liu E, Miao D, Yu L, Wegmann DR, Hutton JC, Elliott JF, Eisenbarth GS. (2005) Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. Nature 435: 220-223

[60] Bennett ST, Lucassen AM, Gough SC, Powell EE, Undlien DE, Pritchard LE, Merriman ME, Kawaguchi Y, Dronsfield MJ, Pociot F. (1995) Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. Nat Genet 9: 284-292

[61] Kralovicova J, Gaunt TR, Rodriguez S, Wood PJ, Day IN, Vorechovsky I (2006) Variants in the human insulin gene that affect pre-mRNA splicing: is -23HphI a functional single nucleotide polymorphism at IDDM2? Diabetes 55: 260-264

[62] Pugliese A, Zeller M, Fernandez A, Jr., Zalcberg LJ, Bartlett RJ, Ricordi C, Pietropaolo M, Eisenbarth GS, Bennett ST, Patel DD. (1997) The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. Nat Genet 15: 293-297

[63] Vafiadis P, Bennett ST, Todd JA, Nadeau J, Grabs R, Goodyer CG, Wickramasinghe S, Colle E, Polychronakos C. (1997) Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. Nat Genet 15: 289-292

[64] Skyler JS, Krischer JP, Wolfsdorf J, Cowie C, Palmer JP, Greenbaum C, Cuthbertson D, Rafkin-Mervis LE, Chase HP, Leschek E. (2005) Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial--Type 1. Diabetes Care 28: 1068-1076

[65] Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, Giovannini C, Bosi E, Larrad MT, Rios MS, Chow CC, Cockram CS, Jacobs K, Mijovic C, Bain SC, Barnett AH, Vandewalle CL, Schuit F, Gorus FK, Tosi R, Pozzilli P, Todd JA. (1996) The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. Hum Mol Genet 5: 1075-1080

[66] Oaks MK, Hallett KM, Penwell RT, Stauber EC, Warren SJ, Tector AJ (2000) A native soluble form of CTLA-4. Cell Immunol 201: 144-153

[67] Green JM (2000) The B7/CD28/CTLA4 T-cell activation pathway. Implications for inflammatory lung disease. Am J Respir Cell Mol Biol 22: 261-264

[68] Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, Rainbow DB, Hunter KM, Smith AN, Di Genova G, Herr MH, Dahlman I, Payne F, Smyth D, Lowe C, Twells RC, Howlett S, Healy B, Nutland S, Rance HE, Everett V, Smink LJ, Lam AC, Cordell HJ, Walker NM, Bordin C, Hulme J, Motzo C, Cucca F, Hess JF, Metzker ML, Rogers J, Gregory S, Allahabadia A, Nithiyananthan R, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Bingley P, Gillespie KM, Undlien DE, Ronningen KS, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Savage DA, Maxwell AP, Carson DJ, Patterson CC, Franklyn JA, Clayton DG, Peterson LB, Wicker LS, Todd JA, Gough SC. (2003) Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. Nature 423: 506-511

[69] Anjos SM, Polychronakos C (2006) Functional evaluation of the autoimmunity-associated CTLA4 gene: the effect of the (AT) repeat in the 3'untranslated region (UTR). J Autoimmun 27: 105-109

[70] Lambert AP, Gillespie KM, Thomson G, Cordell HJ, Todd JA, Gale EA, Bingley PJ. (2004) Absolute risk of childhood-onset type 1 diabetes defined by human leukocyte antigen class II genotype: a population-based study in the United Kingdom. J Clin Endocrinol Metab 89: 4037-4043

[71] Cucca F, Lampis R, Congia M, Angius E, Nutland S, Bain SC, Barnett AH, Todd JA. (2001) A correlation between the relative predisposition of MHC class II alleles to type 1 diabetes and the structure of their proteins. Hum Mol Genet 10: 2025-2037

[72] Brand O, Gough S, Heward J (2005) HLA , CTLA-4 and PTPN22 : the shared genetic master-key to autoimmunity? Expert Rev Mol Med 7: 1-15

[73] Bjornvold M, Undlien DE, Joner G, Dahl-Jorgensen K, Njolstad PR, Akselsen HE, Gervin K, Ronningen KS, Stene LC. (2008) Joint effects of HLA, INS, PTPN22 and CTLA4 genes on the risk of type 1 diabetes. Diabetologia 51: 589-596

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

[75] Zeggini E, McCarthy MI (2007) TCF7L2: the biggest story in diabetes genetics since HLA? Diabetologia 50: 1-4

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

[77] Zhang C, Qi L, Hunter DJ, Manson JE, van Dam RM, Hu FB. (2006) Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and the risk of type 2 diabetes in large cohorts of U.S. women and men. Diabetes 55: 2645-2648

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

[79] Chandak GR, Janipalli CS, Bhaskar S, Kulkarni SR, Mohankrishna P, Hattersley AT, Frayling TM, Yajnik CS. (2007) Common variants in the TCF7L2 gene are strongly associated with type 2 diabetes mellitus in the Indian population. Diabetologia 50: 63-67

[80] Horikoshi M, Hara K, Ito C, Nagai R, Froguel P, Kadowaki T (2007) A genetic variation of the transcription factor 7-like 2 gene is associated with risk of type 2 diabetes in the Japanese population. Diabetologia 50: 747-751

[81] Cauchi S, El Achhab Y, Choquet H, Dina C, Krempler F, Weitgasser R, Nejjari C, Patsch W, Chikri M, Meyre D, Froguel P. (2007) TCF7L2 is reproducibly associated with type 2 diabetes in various ethnic groups: a global meta-analysis. J Mol Med 85: 777-782

[82] Shu L, Sauter NS, Schulthess FT, Matveyenko AV, Oberholzer J, Maedler K (2008) Transcription factor 7-like 2 regulates beta-cell survival and function in human pancreatic islets. Diabetes 57: 645-653

[83] da Silva Xavier G, Loder MK, McDonald A, Tarasov AI, Carzaniga R, Kronenberger K, Barg S, Rutter GA. (2009) TCF7L2 regulates late events in insulin secretion from pancreatic islet beta-cells. Diabetes 58: 894-905

[84] Gloyn AL, Braun M, Rorsman P (2009) Type 2 diabetes susceptibility gene TCF7L2 and its role in beta-cell function. Diabetes 58: 800-802

[85] Jin T, Liu L (2008) The Wnt signaling pathway effector TCF7L2 and type 2 diabetes mellitus. Mol Endocrinol 22: 2383-2392

[86] Liu Z, Habener JF (2008) Glucagon-like peptide-1 activation of TCF7L2-dependent Wnt signaling enhances pancreatic beta cell proliferation. J Biol Chem 283: 8723-8735

[87] Nauck MA, Meier JJ (2007) The enteroinsular axis may mediate the diabetogenic effects of TCF7L2 polymorphisms. Diabetologia 50: 2413-2416

[88] Schafer SA, Tschritter O, Machicao F, Thamer C, Stefan N, Gallwitz B, Holst JJ, Dekker JM, t Hart LM, Nijpels G, van Haeften TW, Haring HU, Fritsche A.

(2007) Impaired glucagon-like peptide-1-induced insulin secretion in carriers of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene polymorphisms. Diabetologia 50: 2443-2450

[89] Lyssenko V, Lupi R, Marchetti P, Del Guerra S, Orho-Melander M, Almgren P, Sjogren M, Ling C, Eriksson KF, Lethagen AL, Mancarella R, Berglund G, Tuomi T, Nilsson P, Del Prato S, Groop L. (2007) Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. J Clin Invest 117: 2155-2163

[90] Pearson ER (2009) Translating TCF7L2: from gene to function. Diabetologia 52: 1227-1230

[91] Shu L, Matveyenko AV, Kerr-Conte J, Cho JH, McIntosh CH, Maedler K (2009) Decreased TCF7L2 protein levels in type 2 diabetes mellitus correlate with downregulation of GIP- and GLP-1 receptors and impaired beta-cell function. Hum Mol Genet 18: 2388-2399

[92] Cauchi S, Choquet H, Gutierrez-Aguilar R, Capel F, Grau K, Proenca C, Dina C, Duval A, Balkau B, Marre M, Potoczna N, Langin D, Horber F, Sorensen TI, Charpentier G, Meyre D, Froguel P. (2008) Effects of TCF7L2 polymorphisms on obesity in European populations. Obesity (Silver Spring) 16: 476-482

[93] Stumvoll M, Haring H (2002) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism. Diabetes 51: 2341-2347

[94] Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L, Lander ES. (2000) The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. Nat Genet 26: 76-80

[95] Florez JC (2008) Clinical review: the genetics of type 2 diabetes: a realistic appraisal in 2008. J Clin Endocrinol Metab 93: 4633-4642

[96] Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, Stringham HM, Chines PS, Jackson AU, Prokunina-Olsson L, Ding CJ, Swift AJ, Narisu N, Hu T, Pruim R, Xiao R, Li XY, Conneely KN, Riebow NL, Sprau AG, Tong M, White PP, Hetrick KN, Barnhart MW, Bark CW, Goldstein JL, Watkins L, Xiang F, Saramies J, Buchanan TA, Watanabe RM, Valle TT,

Kinnunen L, Abecasis GR, Pugh EW, Doheny KF, Bergman RN, Tuomilehto J, Collins FS, Boehnke M. (2007) A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. Science 316: 1341-1345

[97] Rane SG, Dubus P, Mettus RV, Galbreath EJ, Boden G, Reddy EP, Barbacid M. (1999) Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. Nat Genet 22: 44-52

[98] Tsutsui T, Hesabi B, Moons DS, Pandolfi PP, Hansel KS, Koff A, Kiyokawa H. (1999) Targeted disruption of CDK4 delays cell cycle entry with enhanced p27(Kip1) activity. Mol Cell Biol 19: 7011-7019

[99] Grarup N, Rose CS, Andersson EA, Andersen G, Nielsen AL, Albrechtsen A, Clausen JO, Rasmussen SS, Jorgensen T, Sandbaek A, Lauritzen T, Schmitz O, Hansen T, Pedersen O. (2007) Studies of association of variants near the HHEX, CDKN2A/B, and IGF2BP2 genes with type 2 diabetes and impaired insulin release in 10,705 Danish subjects: validation and extension of genome-wide association studies. Diabetes 56: 3105-3111

[100] Billings LK, Florez JC (2010) The genetics of type 2 diabetes: what have we learned from GWAS? Ann N Y Acad Sci 1212: 59-77

[101] Puavilai G, Chanprasertyotin S, Sriphrapradaeng A (1999) Diagnostic criteria for diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance: 1997 criteria by the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (ADA), 1998 WHO consultation criteria, and 1985 WHO criteria. World Health Organization. Diabetes Res Clin Pract 44: 21-26

[102] Gallagher SR, Desjardins PR (2006) Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M Ausubel Appendix 3: Appendix 3D

[103] AppliedBiosystems (2006) Costom Taqman® SNP Genotyping Assay, www.appliedbiosystems.com

[104] UIOWA www.stat.uiowa.edu

[105] Bax L, Yu LM, Ikeda N, Tsuruta H, Moons KG (2006) Development and validation of MIX: comprehensive free software for meta-analysis of causal research data. BMC Med Res Methodol 6: 50

[106] Cervin C, Lyssenko V, Bakhtadze E, Lindholm E, Nilsson P, Tuomi T, Cilio CM, Groop L. (2008) Genetic similarities between latent autoimmune diabetes in adults, type 1 diabetes, and type 2 diabetes. Diabetes 57: 1433-1437

[107] Pettersen E, Skorpen F, Kvaloy K, Midthjell K, Grill V (2010) Genetic heterogeneity in latent autoimmune diabetes is linked to various degrees of autoimmune activity: results from the Nord-Trondelag Health Study. Diabetes 59: 302-310

[108] Tong Y, Lin Y, Zhang Y, Yang J, Liu H, Zhang B (2009) Association between TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis. BMC Med Genet 10: 15

[109] Field SF, Howson JM, Smyth DJ, Walker NM, Dunger DB, Todd JA (2007) Analysis of the type 2 diabetes gene, TCF7L2, in 13,795 type 1 diabetes cases and control subjects. Diabetologia 50: 212-213

[110] Lukacs K, Hosszufalusi N, Dinya E, Bakacs M, Madacsy L, Panczel P (2011) The type 2 diabetes-associated variant in TCF7L2 is associated with latent autoimmune diabetes in adult Europeans and the gene effect is modified by obesity: a meta-analysis and an individual study. Diabetologia 2012 Mar;55(3):689-93.

[111] Szepietowska B, Moczulski D, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Grzeszczak W, Gorska M, Szelachowska M (2010) Transcription factor 7-like 2-gene polymorphism is related to fasting C peptide in latent autoimmune diabetes in adults (LADA). Acta Diabetol 47: 83-86

[112] Zampetti S, Spoletini M, Petrone A, Capizzi M, Arpi ML, Tiberti C, Di Pietro S, Bosi E, Pozzilli P, Giorgino F, Buzzetti R. (2010) Association of TCF7L2 gene variants with low GAD autoantibody titre in LADA subjects (NIRAD Study 5). Diabet Med 27: 701-704

[113] Welters HJ, Kulkarni RN (2008) Wnt signaling: relevance to beta-cell biology and diabetes. Trends Endocrinol Metab 19: 349-355

[114] Shu L, Matveyenko AV, Kerr-Conte J, Cho JH, McIntosh CH, Maedler K (2009) Decreased TCF7L2 protein levels in type 2 diabetes mellitus correlate

with downregulation of GIP- and GLP-1 receptors and impaired beta-cell function. Hum Mol Genet 18: 2388-2399

[115] Cauchi S, Choquet H, Gutierrez-Aguilar R, Capel F, Grau K, Proenca C, Dina C, Duval A, Balkau B, Marre M, Potoczna N, Langin D, Horber F, Sorensen TI, Charpentier G, Meyre D, Froguel P. (2008) Effects of TCF7L2 polymorphisms on obesity in European populations. Obesity (Silver Spring) 16: 476-482

[116] Ruchat SM, Elks CE, Loos RJ, Vohl MC, Weisnagel SJ, Rankinen T, Bouchard C, Perusse L. (2009) Association between insulin secretion, insulin sensitivity and type 2 diabetes susceptibility variants identified in genome-wide association studies. Acta Diabetol 46: 217-226

[117] Saxena R, Gianniny L, Burtt NP, Lyssenko V, Giuducci C, Sjogren M, Florez JC, Almgren P, Isomaa B, Orho-Melander M, Lindblad U, Daly MJ, Tuomi T, Hirschhorn JN, Ardlie KG, Groop LC, Altshuler D. (2006) Common single nucleotide polymorphisms in TCF7L2 are reproducibly associated with type 2 diabetes and reduce the insulin response to glucose in nondiabetic individuals. Diabetes 55: 2890-2895

[118] Spiegelman BM (1998) PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. Diabetes 47: 507-514

[119] Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J. (1998) A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. Nat Genet 20: 284-287

[120] Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, Green A, Soltesz G (2009) Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. Lancet 373: 2027-2033

[121] Barrett JC, Lee JC, Lees CW, Prescott NJ, Anderson CA, Phillips A, Wesley E, Parnell K, Zhang H, Drummond H, Nimmo ER, Massey D, Blaszczyk K, Elliott T, Cotterill L, Dallal H, Lobo AJ, Mowat C, Sanderson JD, Jewell DP, Newman WG, Edwards C, Ahmad T, Mansfield JC, Satsangi J, Parkes M, Mathew CG, Donnelly P, Peltonen L, Blackwell JM, Bramon E, Brown MA, Casas JP, Corvin A, Craddock N, Deloukas P, Duncanson A, Jankowski J, Markus HS, McCarthy

MI, Palmer CN, Plomin R, Rautanen A, Sawcer SJ, Samani N, Trembath RC, Viswanathan AC, Wood N, Spencer CC, Bellenguez C, Davison D, Freeman C, Strange A, Langford C, Hunt SE, Edkins S, Gwilliam R, Blackburn H, Bumpstead SJ, Dronov S, Gillman M, Gray E, Hammond N, Jayakumar A, McCann OT, Liddle J, Perez ML, Potter SC, Ravindrarajah R, Ricketts M, Waller M, Weston P, Widaa S, Whittaker P, Attwood AP, Stephens J, Sambrook J, Ouwehand WH, McArdle WL, Ring SM, Strachan DP. (2009) Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. Nat Genet 41: 1330-1334

[122] Petrone A, Spoletini M, Zampetti S, Capizzi M, Zavarella S, Osborn J, Pozzilli P, Buzzetti R. (2008) The PTPN22 1858T gene variant in type 1 diabetes is associated with reduced residual beta-cell function and worse metabolic control. Diabetes Care 31: 1214-1218

[123] Palmer JP, Fleming GA, Greenbaum CJ, Herold KC, Jansa LD, Kolb H, Lachin JM, Polonsky KS, Pozzilli P, Skyler JS, Steffes MW. (2004) C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve beta-cell function: report of an ADA workshop, 21-22 October 2001. Diabetes 53: 250-264

[124] Steffes MW, Sibley S, Jackson M, Thomas W (2003) Beta-cell function and the development of diabetes-related complications in the diabetes control and complications trial. Diabetes Care 26: 832-836

[125] Hermann R, Lipponen K, Kiviniemi M, Kakko T, Veijola R, Simell O, Knip M, Ilonen J. (2006) Lymphoid tyrosine phosphatase (LYP/PTPN22) Arg620Trp variant regulates insulin autoimmunity and progression to type 1 diabetes. Diabetologia 49: 1198-1208

[126] Nielsen C, Hansen D, Husby S, Lillevang ST (2007) Sex-specific association of the human PTPN22 1858T-allele with type 1 diabetes. Int J Immunogenet 34: 469-473

[127] Kahles H, Ramos-Lopez E, Lange B, Zwermann O, Reincke M, Badenhoop K (2005) Sex-specific association of PTPN22 1858T with type 1 diabetes but not with Hashimoto's thyroiditis or Addison's disease in the German population. Eur J Endocrinol 153: 895-899

[128] Vafiadis P, Ounissi-Benkalha H, Palumbo M, Grabs R, Rousseau M, Goodyer CG, Polychronakos C. (2001) Class III alleles of the variable number of tandem repeat insulin polymorphism associated with silencing of thymic insulin predispose to type 1 diabetes. J Clin Endocrinol Metab 86: 3705-3710

[129] Hermann R, Laine AP, Veijola R, Vahlberg T, Simell S, Lahde J, Simell O, Knip M, Ilonen J. (2005) The effect of HLA class II, insulin and CTLA4 gene regions on the development of humoral beta cell autoimmunity. Diabetologia 48: 1766-1775

[130] Agrawal S, Desai MP (2003) Simultaneous occurrence of type I diabetes mellitus and juvenile rheumatoid arthritis. Indian Pediatr 40: 568-571

[131] Fisher M, Nussbaum M, Abrams CA, Shenker IR (1980) Diabetes mellitus, Hashimoto's thyroiditis, and juvenile rheumatoid arthritis. Am J Dis Child 134: 93-94

[132] Rudolf MC, Genel M, Tamborlane WV, Jr., Dwyer JM (1981) Juvenile rheumatoid arthritis in children with diabetes mellitus. J Pediatr 99: 519-524

[133] Valerio G, Franzese A, Iovino AF, Tanga M, Alessio M, Pignata C (2000) Simultaneous peripubertal onset of multireactive autoimmune diseases with an unusual long-lasting remission of type 1 diabetes mellitus. Clin Endocrinol (Oxf) 53: 649-653

[134] Howson JM, Dunger DB, Nutland S, Stevens H, Wicker LS, Todd JA (2007) A type 1 diabetes subgroup with a female bias is characterised by failure in tolerance to thyroid peroxidase at an early age and a strong association with the cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 gene. Diabetologia 50: 741-746

[135] Criswell LA, Pfeiffer KA, Lum RF, Gonzales B, Novitzke J, Kern M, Moser KL, Begovich AB, Carlton VE, Li W, Lee AT, Ortmann W, Behrens TW, Gregersen PK. (2005) Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection: the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes. Am J Hum Genet 76: 561-571

[136] Hermann R, Mijovic CH, Rayner M, Croft N, Kelly MA, Jenkins D, Soltesz G, Barnett AH. (2001) HLA alleles and IDDM in children in Hungary: a comparison with Finland. Hum Immunol 62: 391-398

[137] Hermann R, Knip M, Veijola R, Simell O, Laine AP, Akerblom HK, Groop PH, Forsblom C, Pettersson-Fernholm K, Ilonen J. (2003) Temporal changes in the frequencies of HLA genotypes in patients with Type 1 diabetes--indication of an increased environmental pressure? Diabetologia 46: 420-425

[138] Polychronakos C (2010) Zeroing in on the target. Pediatr Diabetes 11: 2-3

[139] Prahalad S (2004) Genetics of juvenile idiopathic arthritis: an update. Curr Opin Rheumatol 16: 588-594

[140] Pazar B, Gergely P, Jr., Nagy ZB, Gombos T, Pozsonyi E, Rajczy K, Balogh Z, Sevcic K, Orban I, Szodoray P, Poor G. (2008) Role of HLA-DRB1 and PTPN22 genes in susceptibility to juvenile idiopathic arthritis in Hungarian patients. Clin Exp Rheumatol 26: 1146-1152

[141] Jacobson EM, Huber A, Tomer Y (2008) The HLA gene complex in thyroid autoimmunity: from epidemiology to etiology. J Autoimmun 30: 58-62

doi:10.14753/SE.2013.1801

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

10.1. A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

- **Lukács K.**, Hosszúfalusi N., Dinya E., Bakacs M., Madácsy L., Pánczél P.: *The type 2 diabetes-associated variant in TCF7L2 is associated with latent autoimmune diabetes in adult Europeans and the gene effect is modified by obesity: a meta-analysis and an individual study*

  Diabetologia. 2012 Mar;55(3):689-93. **IF: 6,973**

- H. Nagy K.*/**Lukács K.***, Sipos P., Hermann R., Madácsy L., Soltész Gy.: *Type 1 diabetes associated with Hashimoto's thyroiditis and juvenile rheumatoid arthritis: a case report with clinical and genetic investigations*

  (*These authors contributed equally to the work.)

  Pediatric Diabetes. 2010 Dec;11(8):579-82. **IF: 2,177**

- **Lukács K.**, Szatmári I., Jermendy Á., Krikovszky D., Körner A., Pánczél P., Madácsy L., Hermann R.: *A PTPN22 gén C1858T és az inzulin génrégió – 23HphI polimorfizmusának összefüggése az 1-es típusú diabétesszel magyar populációban*

  Gyermekgyógyászat: gyermek- és ifjúság-egészségügyi szaklap. 2009. (60. évf.) 1. sz. 42-47. old.

- **Lukács K.**, Szatmári I., Hosszúfalusi N., Pánczél P.: *A TCF7L2 gén rs7903146 polimorfizmusának összefüggése a 2-es típusú diabétesszel a magyar populációban*

  Diabetologia Hungarica. 2010; 18(1): 29-37

doi:10.14753/SE.2013.1801

10.2. A DISSZERTÁCIÓTÓL FÜGGETLEN KÖZLEMÉNYEK

- **Lukács K.**, Hermann R.: *Az 1-es típusú diabétesz genetikai hátterei, pathogenesise, és a legújabb prevenciós kutatások státusza*

  Gyermekgyógyászati Továbbképző Szemle. 2007.12 (2): p.51-62.

- Jermendy Á., Szatmári I., Laine AP., **Lukács K.**, Horváth K. H., Körner A., Madácsy L., Veijola R., Simell O., Knip M., Ilonen J, Hermann R.; Finnish Paediatric Diabetes Registry; HUNT1DGENES Programme: *The interferon-induced helicase IFIH1 Ala946Thr polymorphism is associated with type 1 diabetes in both the high-incidence Finnish and the medium-incidence Hungarian populations*

  Diabetologia. 2010 Jan;53(1):98-102. **IF: 6,973**

- **Lukács K.**: *A szüléssel nincs vége a teendőknek: a terhességi cukorbetegségben szenvedő nők utánkövetése*

  Nőgyógyászati és Szülészeti Továbbképző Szemle. 2010; 12(4): p. 146-151

- **Lukács K.**: *Az orális antidiabetikumok alkalmazása terhesség alatt a 2-es típusú diabetes és a terhességi cukorbetegség kezelésére*

  Nőgyógyászati és Szülészeti Továbbképző Szemle. 2010; 12(5): p. 196-200

- **Lukács K.**, Pánczél P., Bakacs M., Madácsy L., Hosszúfalusi N., Pánczél P.: *A felnőttkori látens autoimmun diabétesz és a 2-es típusú diabétesz közös genetika hátterének vizsgálata*

  Diabetologia Hungarica. 2012; 20(3): 207-215

doi:10.14753/SE.2013.1801

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként köszönetet szeretnék mondani témavezetőimnek *Madácsy László* Professzor Úrnak és *Dr. Hosszúfalusi Nóra* tanárnőnek a szakmai támogatásért és a folyamatos biztatásért, amellyel munkámat mindvégig rendületlenül segítették.

Külön köszönettel tartozom *Dr. Pánczél Pál* tanár úrnak, hogy áldozatos munkával a III. Sz. Belgyógyászati Klinikán egy hatalmas betegadatbázist hozott létre, amely biztos klinikai alapot jelentett a munkámhoz. Emellett tudományos ötletei és anyagi támogatása több nehéz helyzeten átsegítettek.

Köszönetemet szeretném kifejezni *Tulassay Tivadar* és *Karádi István* Professzor Uraknak, hogy tudományos munkám klinikai és laboratóriumi hátterét az I. sz. Gyermekgyógyászati és a III. Sz. Belgyógyászati Klinika is biztosította.

Külön köszönöm *Dr. Körner Annának* és *Szilvágyi Mártának*, hogy az I. sz. Gyermekgyógyászati Klinika betegeinek adataihoz való hozzáférést biztosították.

Végül köszönet a volt CellScreen Immungenomika Laboratórium munkatársainak, *Dr. Jermendy Ágnesnek*, *Dr. Szatmári Ildikónak*, *Dr. Horváth Kornélia Hédinek*, *Kovács Bogátának* és *Szabó Zsuzsannának* a pótolhatatlan segítségükért.