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 bizottsági tagok:
Dr. Pánczél Pál egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Fövényi József főorvos, Ph.D.

Budapest

2012

1. BEVEZETÉS

A cukorbetegség heterogenitásának felismerése óta a kórkép két fő etiológiai csoportját különítik el: a döntően autoimmun β-sejtkárosodáson alapuló **1-es típusú** (T1DM) és az inzulinrezisztencián és β-sejt szekréciózavaron nyugvó **2-es típusú diabéteszt** (T2DM). Az utóbbi évek vizsgálatai e kórképek számos új, nem várt patogenetikai vonását tárták fel, például β-sejt specifikus autoantitesteket mutattak ki 2-es típusú cukorbetegségben és inzulinrezisztenciát 1-es típusú diabéteszben. További meglepő felvetés, hogy az 1-es típusú cukorbetegség lassan progrediáló formájának tartott **felnőttkori látens autoimmun diabétesz** (LADA) kialakulásában több, 2-es típusú cukorbetegségre hajlamosító génvariáns is szerepet játszhat. A kutatási eredményeket összegezve született meg egy új, a diabétesz-spektrum folytonosságát hangsúlyozó elmélet, mely az immunrendszer β-sejt károsodásban való részvételének mértéke alapján differenciál és figyelmen kívül hagyja a betegek fenotípusos jellemzőit. Az elmélet 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.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásaim során genetikai vizsgálatokat végeztem, mert a betegségek patofiziológiai folyamatainak megértéséhez vezető egyik út a genetikai háttér pontos felderítése. Az **eset-kontroll vizsgálatok és metaanalízisek célja** a diabéteszre hajlamosító genetikai faktorok hatásának felmérése volt a magyar és az európai populációk különböző cukorbeteg-csoportjaiban. Vizsgáltam a hajlamosító genetikai variánsok geográfiai variabilitását, a génhatások erősségének egyes

diabétesz típusok közötti illetve európai népcsoportokon belüli heterogenitását. A **klinikai vizsgálatok** során a genotípus-fenotípus interakciókat, a hajlamosító génvariáns hordozás és a diabétesz progresszió közötti lehetséges összefüggést elemeztem.

1. vizsgálat: A látens autoimmun diabétesz genetikai hátterének vizsgálata

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* (transcription factor 7-like 2) 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* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A and 2B) gén rs10811661 és *PPARG* (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) 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?

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

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?

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

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* (protein tyrosine phosphatase non-receptor 22) 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?

<u>4. vizsgálat:</u> Egy autoimmun betegségtriász genetikai hátterének vizsgálata

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.

Ebben az esettanulmányban egy 1-es típusú diabéteszben, Hashimoto tireoiditiszben és juvenilis reumatoid artritiszben szenvedő gyermek esetét mutattam be. A részletes genetikai analízis során a három betegség közös rizikó faktorait, a *HLA-DR-DQ* génrégiót, a *PTPN22* gén C1858T polimorfizmusát és a *CTLA4* (cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4) gén CT60 polimorfizmusát vizsgáltam.

Feltett kérdés:

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

3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

<u>Diagnosztikai kritériumok:</u> Valamennyi betegcsoport diagnózisa az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organisation, WHO) 1998 óta érvényben levő irányelvein alapult.

- **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 <1,07 ng/ml), a diagnózis felállításától kezdve azonnal inzulin terápiát igényeltek és legalább egy szigetsejt autoimmunitási markerre [szigetsejt elleni citoplazmatikus antitest (ICA), glutaminsav-dekarboxiláz elleni antitest (GADA), inzulin elleni antitest (IAA), tirotin-foszfatáz elleni antitest (IA-2A)] pozitívnak bizonyultak.

- **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.

- **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.

- **Kontrollok:** Az *1-3. eset-kontroll vizsgálatok* magyar részéhez a kontroll populációt nem rokon, normális glükóztoleranciájú magyar véradók képezték. A vérvételek a *Budai Regionális Vérellátó Központ* (1113 Budapest, Karolina út 19-21.) által szervezett nyilvános véradások keretében történtek. Kérdőíves felmérés segítségével azokat a véradókat, akik nem európai származásúak, illetve akiknek saját, vagy első-/másodfokú rokonai anamnézisében bármilyen típusú diabétesz, autoimmun betegség vagy genetikai szindróma szerepelt kizártam a kontroll csoportból. Az *1. és 2. vizsgálat metaanalízisében* a kontrollok mindig az adott ország anyagcsere-egészséges tagjai közül kerültek ki. A *4. vizsgálathoz* nem volt szükség kontroll csoportra.

Valamennyi vizsgálatban szereplő beteg és kontroll személy európai származású volt.

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 Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága is engedélyezte (ETT TUKEB, engedély száma: 88/KO/2005).

1. táblázat: A vizsgálatokba bevont beteg- és kontroll csoportok

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

Klinikai adatok:

- A szérum **C-peptid** szint meghatározása a diabétesz diagnózisakor, éhomri vérmintából, radioimmunoassay segítségével történt, normális tartománynak a 0,35-1,15 nmol/l (1,05-3,45 ng/ml) 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:
    1. nem-túlsúlyos egyének: felnőtteknél BMI < 25 kg/m^2, gyermekeknél BMI < +1SD,
    2. túlsúlyos egyének: felnőtteknél BMI ≥ 25 kg/m^2, gyermekeknél BMI ≥ +1SD.

Genetikai vizsgálatok:

- A **DNS izolálás** standard kisózásos módszerrel történt, melyhez minden esetben EDTA-val vagy citráttal alvadásgátolt 4 ml perifériás vért használtam.
- A **DNS koncentráció** meghatározását Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kittel végeztem (Molecular Probes, Invitrogen USA).
- A ***PTPN22***, az ***INS***, a ***CTLA4***, a ***TCF7L2***, a ***CDKN2A/2B*** és a ***PPARG* gén** polimorfizmusainak vizsgálatához TaqMan® SNP Genotyping Assay-t használtam (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).
- A ***HLA-DRB1-DQA1-DQB1*** meghatározás lanthanoid alapú oligonukleotid hibridizálással, DELFIA módszerrel történt (PerkinElmer Life Sciences, Wallac Oy,Turku, Finnország).

Statisztikai analízis

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

Az eredmények statisztikai analízisét az **SPSS program** 17.0 verziójával végeztem (SPSS for Windows®, version 17.0; Chicago, IL, USA). 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. 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 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.

4. EREDMÉNYEK

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

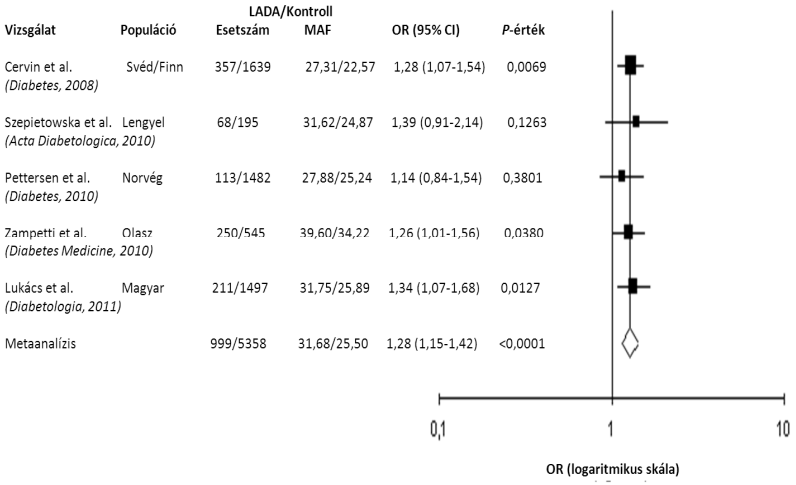
1. vizsgálat: A látens autoimmun diabétesz genetikai hátterének vizsgálata

A magyar adatok elemzése azt igazolta, hogy a *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmusa hajlamosít felnőttkori látens autoimmun diabétesz kialakulására (OR 1,34, 95% CI 1,07-1,68; *p*=0,0127), de az 1-es típusú diabétesszel nem kapcsolódik (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 növelte a felnőttkori látens autoimmun diabétesz kialakulásának kockázatát.

A magyar eredményekre és az európai tanulmányokra épülő metaanalízis során összesen 999 LADA és 5358 kontroll egyén adatainak elemzése a *TCF7L2* rs7903146 polimorfizmus *T-alléljének* szerény, de szignifikáns hajlamosító hatását bizonyította a LADA kialakulásában (OR 1,28, 95% CI 1,15-1,42; *p*<0,0001) (1. ábra). A Cochran-Q teszt eredménye szerint 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.



1. ábra: A *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmus és a felnőttkori látens autoimmun diabétesz közötti kapcsolat az európai populációkban (MAF: minor allél frekvencia)

A metaanalízis alátámasztotta, hogy a *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmusa nem hajlamosít 1-es típusú diabétesz kialakulására az európai származású egyénekben (OR 1,09, 95% CI 0,98-1,22; *p*=0,0788)

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).

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). Nem volt hasonló kapcsolat sem a kontroll, sem az 1-es típusú diabéteszes csoportban. 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).

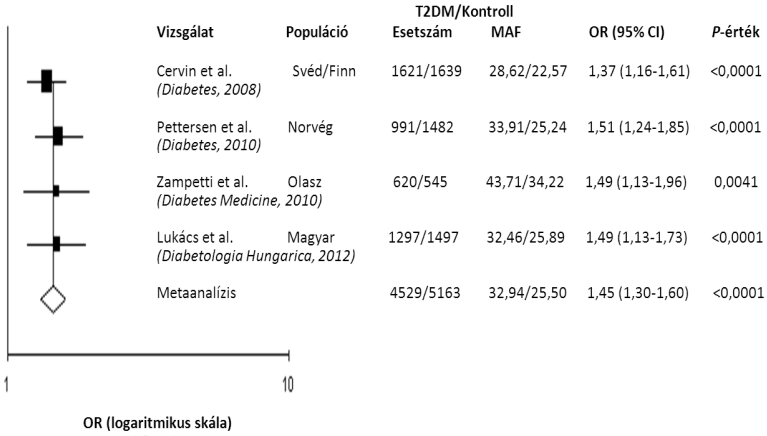
<u>2. vizsgálat:</u> A 2-es típusú diabétesz genetikai hátterének vizsgálata

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

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 polimorfizmusa 2-es típusú diabéteszesekben összefüggést mutatott a betegség diagnózisakor mért éhomi szérum C-peptid szinttel és a betegek testtömeg-indexével. 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. 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). 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.

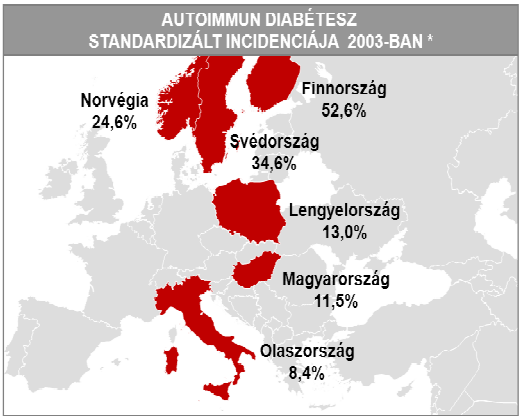
A metaanalízis azt igazolta, hogy a *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmus a 2-es típusú diabétesz kialakulása szempontjából egységes és jelentős rizikótényező az európai származású egyénekben (OR 1,42, 95% CI 1,29-1,56; *p*<0,0001) (2. ábra). A Cochran-Q teszt eredménye szerint az egyes tanulmányok között nem volt heterogenitás (*p*=0,8391).



2. ábra: a *TCF7L2* gén rs7903146 polimorfizmus és a 2-es típusú diabétesz kapcsolata az európai populációkban (MAF: minor allél frekvencia)

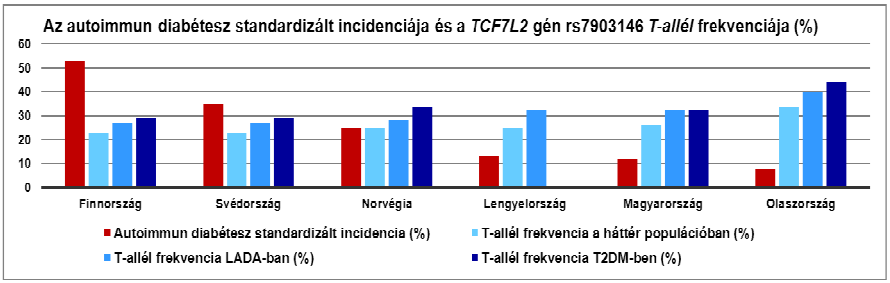
Az európai származásúakban a *TCF7L2* gén rs7903146 *T-alléljének* tulajdonítható átlagos populációs járulékos kockázati hányad 2-es típusú diabéteszre 18,45%-ra volt becsülhető.

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).



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



3. ábra: A *TCF7L2* gén rs7903146 *T-allél* frekvenciája és az autoimmun diabétesz standardizált incidenciája a vizsgált európai országokban

A 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%) (3. ábra).

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

Az allélfrekvenciák vizsgálata szerint a *PTPN22* gén *T-allél* erősen hajlamosít 1-es típusú diabéteszre (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* esetén: OR 1,86, 95% CI 1,27-2,71; p=1,26x10^{-3}).

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. 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).

Az inzulin gén -23HphI polimorfizmusa esetén 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 *T-allél* dominánsan protektív hatását igazolta (AT genotípus esetén: OR 0,43, 95% CI 0,26-0,70; p=7,42x10^{-4}).

Az inzulin gén -23HphI polimorfizmusának hordozása a betegek nemétől és a diabétesz diagnózisakor betöltött életkorától függetlennek bizonyult.

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 Hashimoto tireoiditisz nyomán fellépő autoimmun hipotireózist diagnosztizáltak. A betegnél 15 éves korában a juvenilis reumatoid artritisz szeronegatív poliartikuláris formája alakult ki.

2. táblázat: Az autoimmun betegségek diagnózisát megalapozó vizsgálati eredmények

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	1,1-3,6 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	-

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 – beleegyezésük hiányában – nem került sor.

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.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A felnőttkori látens autoimmun diabétesszel kapcsolatban tett megállapítások:

1. 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.
2. A *TCF7L2* gén betegség-asszociált *T-alléljének* előfordulási gyakorisága Európában észak-déli irányban nő a háttér- és a LADA 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.
3. 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.

4. 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.

Az 1-es típusú diabétesszel kapcsolatban tett megállapítások:

1. 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 életkorával. Közvetlen kapcsolat mutatható ki a *PTPN22* gén C1858T polimorfizmusa és a klinikai fenotípus között: a *T-allélhordozók* szignifikánsan alacsonyabb éhgyomri szérum C-peptid szinttel, azaz kisebb reziduális β-sejt kapacitással bírnak az 1-es típusú diabétesz manifesztációjakor.
2. 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.
3. 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:

1. 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 összhangban van az európai populációkra vonatkozó irodalmi adatokkal.
2. 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.
3. 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.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

1. **Lukacs K**, Hosszufalusi N, Dinya E, Bakacs M, Madacsy L, Panczel 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**

2. Katalin H Nagy*/**Krisztina Lukács***, Péter Sipos, Róbert Hermann, László Madácsy, Gyula Soltész: *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**

3. **Lukács Krisztina**, Szatmári Ildikó, Jermendy Ágnes, Krikovszky Dóra, Körner Anna, Pánczél Pál, Madácsy László, Hermann Róbert: *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.

4. **Lukács Krisztina**, Szatmári Ildikó, Hosszúfalusi Nóra, Pánczél Pál: *A TCF7L2 gén rs7903146 polimorfizmusának összefüggése a 2-es típusú diabétesszel a magyar populációban*
   Diabetologia Hungarica. 2010; 18(1): 29-37

A disszertációtól független közlemények:

1. **Lukács Krisztina,** Hermann Róbert: *Az 1-es típusú diabétesz genetikai hátterei, pathogenesise, és a legújabb prevenciós kutatások státusza*
   Gyermekgyógyászati Továbbképző Szemle. 2007.12 (2): p.51-62.

2. Jermendy A, Szatmári I, Laine AP, **Lukács K**, Horváth KH, 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**

3. **Lukács Krisztina**: *A szüléssel nincs vége a teendőknek: a terhességi cukorbetegségben szenvedő nők utánkövetése*
   Nőgyógyászati és Szülészeti Továbbképző Szemle. 2010; 12(4): p. 146-151

4. **Lukács Krisztina**: *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

5. **Lukács Krisztina**, Pánczél Pál, Bakacs Márta, Madácsy László, Hosszúfalusi Nóra, Pánczél Pál: *A felnőttkori látens autoimmun diabétesz és a 2-es típusú diabétesz közös genetika hátterének vizsgálata*
   Diabetologia Hungarica. 2012; közlésre elfogadva