

Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Wydział Lekarski

Jan Skupień

**Podłoże genetyczne i charakterystyka kliniczna
cukrzycy MODY3 w regionie małopolskim**

Praca doktorska

Promotor: dr hab. med. Maciej T. Małecki

Pracę wykonano w Katedrze i Klinice Chorób Metabolicznych

Kierownik Katedry: prof. dr hab. med. Jacek Sieradzki

Kraków 2007

*Pracę dedykuję
mojej Mamie i Narzeczonej*

Dziękuję

*Panu dr hab. med. Maciejowi Małeckiemu, mojemu promotorowi,
za życzliwość, inspirację, motywację i stałą stymulację do dalszych badań
oraz za pomoc i naukę okazaną podczas prac badawczych.*

*Panu Profesorowi zw. dr hab. n. med. Jackowi Sieradzkiemu,
kierownikowi Katedry i Kliniki Chorób Metabolicznych CMUJ w Krakowie
za umożliwienie mi wykonania niniejszej pracy oraz cenne uwagi dotyczące tekstu.*

*Panu Profesorowi zw. dr hab. n. med. Władysławowi Grzeszczakowi,
kierownikowi Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych, Diabetologii i Nefrologii
Śląskiej Akademii Medycznej w Zabrze
za umożliwienie przeprowadzenia sekwencjonowania DNA
w tamtejszej Pracowni Biologii Molekularnej.*

*Pani dr Sylwii Górczyńskiej-Kosiorz za niezwykle staranne i fachowe
przeprowadzenie sekwencjonowania DNA w badanej grupie pacjentów.*

*Kolegom i całemu Zespołowi Kliniki Chorób Metabolicznych
za wsparcie i cierpliwość*

WYKAZ SKRÓTÓW

A – adenina

ACR – współczynnik albumina / kreatynina (ang. *albumin / creatinine ratio*)

Ala – alanina

Arg – arginina

Asn – asparagina

apo AII – apolipoproteina AII

apo CIII – apolipoproteina CIII

apo(a) – apolipoproteina (a)

apoM – apolipoproteina M

BMI – indeks masy ciała (ang. *body mass index*)

bp – para zasad (ang. *base pair*)

C – cytozyna

CEL – esteraza cholesterolowa (ang. *carboxyl-ester lipase*)

CHOD-PAP – ang. *Cholesterol Oxidase Phenol 4-Aminoantipyrine Peroxidase*

CMUJ – Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Cys – cysteina

DNA – kwas dezoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)

ELISA – enzymatyczny test immunoadsorpcyjny (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

G – guanina

GCK – glukokinaza, gen glukokinazy (ang. *glucokinase*)

Gln – glutamina

Gly – glicyna

GOD-PAP – ang. *Glucose Oxidase-Phenol 4-Aminophenazone Peroxidase*

GPO-PAP – ang. *Glycerol Phosphate Oxidase Phenol 4-Aminoantipyrine Peroxidase*

HbA_{1c} – hemoglobina glikowana

HDL – lipoproteiny dużej gęstości (ang. *high density lipoproteins*)

HGMD – baza mutacji genów człowieka (ang. *Human Gene Mutation Database*)

His – histydyna

HNF – hepatocytowy czynnik jądrowy (ang. *hepatocyte nuclear factor*)

HPLC – wysokowydajna chromatografia cieczowa (ang. *high performance liquid chromatography*)

IFG – nieprawidłowa glikemia na czczo (ang. *impaired fasting glucose*)

IGT – upośledzona tolerancja glukozy (ang. *impaired glucose tolerance*)

IPF1 – 1 czynnik promotora insuliny (ang. *insulin promoter factor 1*)

Kir6.2 – podjednostka kanału potasowego (ang. *inwardly rectifying potassium (K⁺) channel*)

KLF11 – czynnik transkrypcyjny homologiczny z białkiem Krüppela (ang. *Kruppel-like factor 11*)

LADA – utajona autoimmunologiczna cukrzyca dorosłych (ang. *latent autoimmune diabetes of the adults*)

LDL – lipoproteiny małej gęstości (ang. *low density lipoproteins*)

Leu – leucyna

LOH – utrata heterozygotyczności (ang. *loss of heterozygosity*)

MIDD – cukrzyca z głuchotą dziedziczącą się w sposób matczyzny (ang. *maternally inherited diabetes with deafness*)

MODY – cukrzyca typu dorosłych występująca u młodzieży (ang. *maturity-onset diabetes of the young*)

mRNA – matrycowy kwas rybonukleinowy (ang. *messenger ribonucleic acid*)

NEUROD1 – 1 neurogeny czynnik różnicowania (ang. *neurogenic differentiation 1*)

OGTT – doustny test obciążenia glukozą (ang. *oral glucose tolerance test*)

ORF – otwarta ramka odczytu (ang. *open reading frame*)

PCR – polimerazowa reakcja łańcuchowa (ang. *polymerase chain reaction*)

Phe – fenyloalanina

PNDM – przetrwała cukrzyca noworodkowa (ang. *permanent neonatal diabetes mellitus*)

POU – domena wiążąca DNA, opisana w białkach Pit-1, Oct-1 i Unc-86

POU-H – homeodomena, subdomena w dominie POU

POU-S – subdomena domeny POU (ang. *POU specific*)

Pro – prolina

RCAD – torbiele nerek i cukrzyca (ang. *renal cysts and diabetes*)

RFLP – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *restriction fragment length polymorphism*)

SD – odchylenie standartowe (ang. *standart deviation*)

Ser – seryna

SUR1 – receptor sylfonylomocznika 1 (ang. *sulphonylurea receptor 1*)

T – tymina

TCF1 – czynnik transkrypcyjny 1 (ang. *transcription factor 1*)

Thr – treonina

tRNA – transportujący RNA, kwas rybonukleinowy (ang. *transfer rybonucleic acid*)

Trp – tryptofan

USG – ultrasonografia, badanie ultrasonograficzne

Val – walina

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

WHR – wskaźnik talia / biodro (ang. *waist / hip ratio*)

SPIS TABEL

Tabela 1.	Zasady diagnostyki cukrzycy i nazewnictwo stanów hiperglikemicznych.....	11
Tabela 2.	Klasyfikacja cukrzycy wg WHO, 1999.....	12
Tabela 3.	Wybrane monogenowe defekty komórek β trzustki.....	15
Tabela 4.	Objawy pozawyspowe w cukrzycy MODY.....	17
Tabela 5.	Primery użyte do amplifikacji badanych fragmentów genu HNF1 α podczas sekwencjonowania.....	26
Tabela 6.	Protokoły RFLP służące do badania występowania nowych mutacji genu HNF1 α w grupie kontrolnej.....	28
Tabela 7.	Protokoły RFLP służące do wstępnej oceny segregacji niektórych znanych mutacji genu HNF1 α	29
Tabela 8.	Charakterystyka kliniczna 47 probantów z rodzin MODY włączonych do badania.....	36
Tabela 9.	Wyniki poszukiwania mutacji genu HNF1 α u członków 13 zidentyfikowanych rodzin.....	44
Tabela 10.	Charakterystyka kliniczna nosicieli mutacji w genie HNF1 α	56
Tabela 11.	Porównanie parametrów klinicznych kobiet i mężczyzn chorujących na cukrzycę MODY3.....	57
Tabela 12.	Porównanie parametrów klinicznych i biochemicznych pacjentów z mutacjami MODY3 i grupy chorych z cukrzycą typu 2.....	59
Tabela 13.	Porównanie parametrów klinicznych i biochemicznych osób z mutacjami MODY3 i grupy ochotników z prawidłową glikemią na czczo.....	61

SPIS RYCIN

Rycina 1.	Interakcja czynników genetycznych i środowiskowych w patogenezie cukrzycy MODY i złożonej formy cukrzycy typu 2.....	14
Rycina 2.	Struktura genu HNF1 α	20
Rycina 3.	Struktura największej izoformy HNF1 α (HNF1 α (A), 631 aminokwasów).....	20
Rycina 4.	Mutacja Ser225fsdelC u pacjenta M044-4.....	38
Rycina 5.	Mutacja Ser249Pro u pacjenta M005-1.....	38
Rycina 6.	Mutacja Asn257Thr u pacjenta M014-1.....	39
Rycina 7.	Polimorfizm -153dup(TGGGGGT) u pacjenta M034-2.....	39
Rycina 8.	Poszukiwanie mutacji Ser225fsdelC metodą RFLP.....	40
Rycina 9.	Poszukiwanie mutacji Ser249Pro metodą RFLP.....	40
Rycina 10.	Poszukiwanie mutacji Asn257Thr metodą RFLP.....	40
Rycina 11.	Lokalizacja mutacji HNF1 α wykrytych w badanych rodzinach.....	42
Rycina 12.	Proporcje chorych na cukrzycę i zdrowych nosicieli mutacji w genie HNF1 α w poszczególnych grupach wiekowych.....	45

SPIS TREŚCI

1.	Wstęp.....	10
1.1	Definicja i klasyfikacja cukrzycy.....	10
1.2	Pojęcie cukrzycy MODY.....	12
1.2.1	Podłoże molekularne i obraz kliniczny cukrzycy MODY.....	13
1.2.1.1	MODY związana z mutacjami genu glukokinazy.....	16
1.2.1.2	MODY związana z mutacjami czynników transkrypcyjnych.....	16
1.2.1.3	Rozpoznanie cukrzycy MODY a praktyka kliniczna.....	18
1.2.1.4	Cukrzyca MODY3 – forma autosomalnej dominującej cukrzycy o wczesnym początku, związana z mutacjami genu HNF1 α	19
2.	Cele pracy.....	23
3.	Metodyka.....	24
3.1	Rekrutacja rodzin do badań przesiewowych w kierunku cukrzycy MODY3 w ramach tworzonego Polskiego Rejestru Rodzin MODY.....	24
3.2	Poszukiwanie, ocena częstości i charakterystyka mutacji genu HNF1 α (MODY3) w rodzinach z Polskiego Rejestru Rodzin MODY.....	25
3.3	Analiza segregacji i ocena znaczenia zidentyfikowanych mutacji genu HNF1 α w rodzinach.....	27
3.4	Metodyka badania charakterystyki klinicznej chorych z mutacjami HNF1 α	30
3.5	Poszukiwanie wad rozwojowych nerek u nosicieli mutacji genu HNF1 α	34
4.	Wyniki.....	35
4.1	Wyniki rekrutacji rodzin do badań przesiewowych w kierunku cukrzycy MODY3 w ramach tworzonego Polskiego Rejestru Rodzin MODY.....	35
4.2	Wyniki poszukiwania mutacji genu HNF1 α (MODY3), ich charakterystyka i ocena częstości w rodzinach z Polskiego Rejestru Rodzin MODY.....	36
4.3	Wyniki analizy segregacji i znaczenie zidentyfikowanych mutacji genu HNF1 α	43

4.4	Charakterystyka kliniczna nosicieli mutacji w genie HNF1 α	53
4.5	Wady rozwojowe nerek u nosicieli mutacji HNF1 α	64
5.	Dyskusja.....	66
6.	Wnioski.....	80
7.	Piśmiennictwo.....	82
8.	Streszczenie w języku polskim.....	93
9.	Streszczenie w języku angielskim.....	96
10.	Załącznik A.....	99
11.	Załącznik B.....	100

1. WSTĘP

Cukrzyca jest jednym z najpoważniejszych problemów medycznych współczesności, szczególnie w krajach uprzemysłowionych. Dotyka ona kilku procent populacji europejskich, a liczba chorych stale się zwiększa [1]. Szacuje się, że w Polsce może być nawet 2 miliony pacjentów z cukrzycą [2]. Cukrzyca jest jednym z najważniejszych czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych, główną przyczyną utraty wzroku w krajach rozwiniętych i najczęstszą przyczyną schyłkowej niewydolności nerek. Powikłania cukrzycy często powodują czasową niezdolność do pracy oraz trwałe inwalidztwo. Oczekiwana długość życia ulega istotnemu skróceniu w konsekwencji diagnozy cukrzycy. Choroba ta stanowi duże wyzwanie dla całego środowiska medycznego, pacjentów, ich rodzin oraz całych społeczeństw.

1.1 Definicja i klasyfikacja cukrzycy

Pojęcie cukrzycy obejmuje szereg schorzeń, których wspólnym mianownikiem jest przewlekłe podwyższony poziom glukozy we krwi [3]. Zgodnie z wytycznymi Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego cukrzycę można rozpoznać po dwukrotnym stwierdzeniu nieprawidłowości w następujących sytuacjach: oznaczenie glikemii na czczo, doustny test obciążenia glukozą lub oznaczenie glikemii przygodnej przy współistniejących objawach klinicznych [4]. Zasady diagnostyki cukrzycy, nazewnictwo stanów hiperglikemicznych oraz normy stężenia glukozy w osoczu przedstawia Tabela 1.

Tabela 1. Zasady diagnostyki cukrzycy i nazewnictwo stanów hiperglikemicznych.

Rodzaj pomiaru	Stężenie glukozy w osoczu	Interpretacja wyniku
Oznaczenie glikemii przygodnej	≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l)	Rozpoznanie cukrzycy przy występowaniu typowych objawów choroby
Oznaczenie glikemii na czczo	< 100 mg/dl (5,6 mmol/l)	Prawidłowa glikemia na czczo
	100 – 125 mg/dl (5,6 – 6,9 mmol/l)	Nieprawidłowa glikemia na czczo (IFG – <i>impaired fasting glucose</i>)
	≥ 125 mg/dl (7,0 mmol/l)	Cukrzyca
Oznaczenie glikemii w 120 minucie doustnego testu obciążenia glukozą (OGTT – <i>oral glucose tolerance test</i>)	< 140 mg/dl (7,8 mmol/l)	Prawidłowa tolerancja glukozy
	140 – 199 mg/dl (7,8 – 11,0 mmol/l)	Nieprawidłowa tolerancja glukozy (IGT – <i>impaired glucose tolerance</i>)
	≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l)	Cukrzyca
Do rozpoznania cukrzycy konieczne jest stwierdzenie dwóch nieprawidłowości lub dwukrotne jednej z nich		

Według: Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę, 2007. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego, Diabetologia Praktyczna 2007, tom 8 Supl. A, zmodyfikowane.

Od 1999 roku obowiązuje powszechnie akceptowana klasyfikacja cukrzycy zaproponowana przez Komitet Ekspertów Światowej Organizacji Zdrowia (WHO – *World Health Organization*), oparta na etiologii poszczególnych jednostek nozologicznych [3]. Klasyfikacja ta wyróżnia dwie tradycyjne, podstawowe formy choroby: typ 1 i typ 2. Ponadto wyodrębniono *Inne specyficzne typy cukrzycy*, bardzo heterogenną grupę zaburzeń o znanej, ściśle ustalonej etiologii oraz cukrzycę ciężarnych. Od ponad dekady grupa *Innych specyficznych typów cukrzycy* ulega stopniowej rozbudowie, dodawane są tu nowe formy choroby. Przyczynia się do tego między innymi identyfikacja i definiowanie na poziomie molekularnym kolejnych monogenowych postaci cukrzycy związanych ze znacznie upośledzonym wydzielaniem insuliny lub skrajną opornością na działanie tego hormonu [5-11]. Do takich właśnie form choroby związanych z defektem komórki β zaliczają się podtypy cukrzycy MODY [6, 7, 10, 11].

Tabela 2. Klasyfikacja cukrzycy wg WHO, 1999.

I. Cukrzyca typu 1
• Spowodowana procesem autoimmunologicznym • Idiopatyczna
II. Cukrzyca typu 2
III. Inne specyficzne typy • Genetyczne defekty czynności komórek β • Genetyczne defekty działania insuliny • Choroby zewnątrzwydzielniczej części trzustki • Endokrynopatie • Cukrzyca wywołana przez leki i inne substancje chemiczne • Zakażenia • Rzadkie postacie wywołane procesem immunologicznym • Inne zespoły genetyczne niekiedy związane z cukrzycą
IV. Cukrzyca ciężarnych

1.2 Pojęcie cukrzycy MODY

Postęp w zakresie metod biologii molekularnej w ciągu ostatnich dwóch dekad uświadomił naukowcom i klinicystom pracującym na polu diabetologii ogromną heterogenność choroby. Jednak koncepcja różnorodności cukrzycy nie jest całkowicie nowa, a różnice kliniczne między pacjentami z cukrzycą obserwuje się od stuleci. Na przykład w połowie dziewiętnastego wieku francuski lekarz Bouchardet rozróżniał dwie główne formy choroby [12]. Pierwsza, dotycząca młodych szczupłych osób cechowała się złym rokowaniem i bardzo słabo odpowiadała na jedyne dostępne w tym czasie leczenie, jakim było postępowanie dietetyczne. Z tym obrazem kontrastowały przypadki starszych otyłych osób, którzy dużo lepiej reagowali na leczenie. Jednak musiało upłynąć kolejne sto lat, aby diabetolodzy uświadomili sobie, że szczupli i młodzi pacjenci z cukrzycą także nie stanowią jednolitej grupy. Co prawda większość z nich wymaga natychmiastowego wdrożenia insuliny, która ratuje ich życie i musi być stosowana na stałe. Wśród tej dużej liczebnie grupy są jednak inni, mniej liczni pacjenci, których choroba cechuje się uderzająco łagodniejszym obrazem klinicznym i znacznie lepszą prognozą. W rodzinach tych pacjentów jest zwykle wielu chorych z cukrzycą o podobnym obrazie klinicznym, która dziedziczy się z pokolenia na pokolenie jako cecha autosomalna dominująca. W latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych w stosunku do tej cukrzycy w piśmiennictwie angielskojęzycznym przyjęto

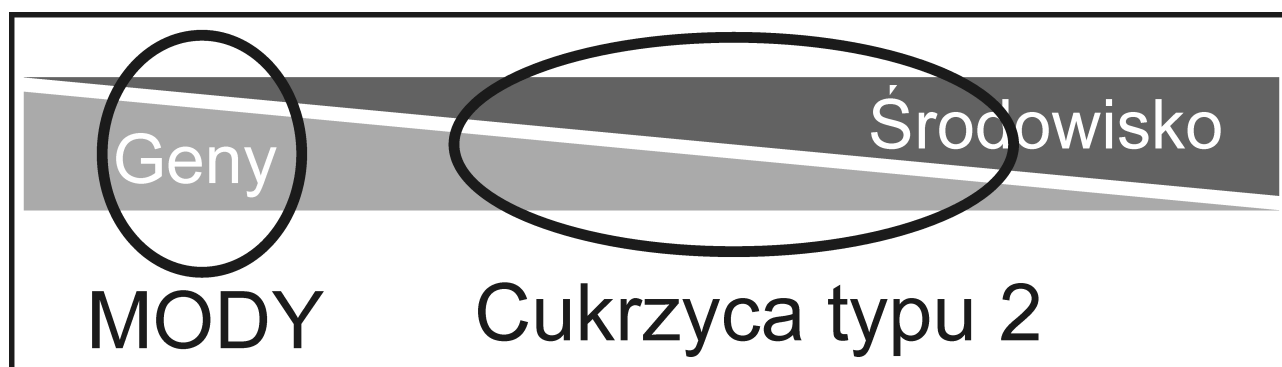
niezbyt fortunną nazwę *maturity onset diabetes of the young*, którą na język polski tłumaczyć można jako cukrzyca typu dorosłych występująca u młodzieży. Akronim jaki powszechnie przyjął się na świecie to MODY [13]. Zagadka obrazu klinicznego cukrzycy MODY została ostatnio rozwiązana dzięki postępowi wiedzy w dziedzinie biologii molekularnej.

1.2.1 Podłoże molekularne i obraz kliniczny cukrzycy MODY

Rola podłoża molekularnego w powstawaniu cukrzycy, a także wielu innych chorób, na przykład nadciśnienia tętniczego i hipercholesterolemii, jest intensywnie badana. Z punktu widzenia udziału czynników dziedzicznych można wyróżnić dwie grupy fenotypów: formy mono- i wielogenowe [14, 15]. Obraz kliniczny częstej, złożonej, wieloczynnikowej cukrzycy, zarówno typu 1 jak i 2, jest wynikiem interakcji pomiędzy czynnikami środowiskowymi oraz wieloma różnymi genami. Ryzyko zachorowania na formy złożone cukrzycy jest modyfikowane przez częste polimorfizmy różnych genów. Te różnice sekwencji znajdować się mogą w częściach regulatorowych lub kodujących poszczególnych genów. Allele tych polimorfizmów występują zarówno u osób zdrowych jak i chorych, jednak z różną częstością. Każdy z nich tylko w niewielkim stopniu wpływa na ryzyko zachorowania, decydujące znaczenie ma wypadkowa ich oddziaływań. Zatem żaden z nich nie powinien być uznawany za czynnik jednoznacznie determinujący rozwój cukrzycy, lecz raczej za modyfikator predyspozycji do rozwoju choroby.

Choroby monogenowe, w tym pewne, niezbyt częste formy cukrzycy, są konsekwencją rzadkich mutacji pojedynczych genów [8, 14, 15]. Powodują one znaczące zmiany w strukturze, a co za tym idzie także funkcji, lub poziomie ekspresji produktu genu: białka, rzadziej tRNA. Jako decydujący czynnik etiologiczny, mutacje takie w sposób jednoznaczny determinują obraz kliniczny choroby, który jedynie w niewielkim stopniu modyfikowany być może przez czynniki środowiska, a także genetyczne polimorfizmy (Rycina 1). Nosicielstwo takiej mutacji w ogromnym stopniu wpływa zatem na stan zdrowia jednostki. Natomiast ze względu na niewielką ich częstość, z epidemiologicznego punktu widzenia oddziaływanie na zdrowotność całych populacji jest bardzo ograniczone. Inną, szczególną cechą cukrzycy monogenowej jest występowanie charakterystycznych objawów pozatrzustkowych, co wynika z plejotropowego działania genów.

Rycina 1. Interakcja czynników genetycznych i środowiskowych w patogenezie cukrzycy MODY i złożonej formy cukrzycy typu 2.



Według: Malecki MT. Genetics of type 2 diabetes mellitus. Diabetes Res Clin Pract 2005, 68: S10-S21, zmodyfikowane.

Mimo, iż z praktycznego, klinicznego punktu widzenia formy monogenowe znajdowały się przez lata raczej poza głównym nurtem diabetologii, to właśnie na tym polu dokonał się największy postęp w zrozumieniu genetycznego podłoża cukrzycy. Wynika to głównie stąd, że monogenowe formy mają jasno zdefiniowany sposób dziedziczenia i zwykle wczesny wiek diagnozy, przez co identyfikacja wielopokoleniowych rodzin obciążonych cukrzycą jest stosunkowo łatwym zadaniem [15]. Cukrzyce monogenowe związane są patofizjologicznie albo z defektem wydzielania insuliny, albo ze znacznego stopnia insulinoopornością [3, 9]. Szczególną grupą form cukrzycy będących efektem monogenowego defektu komórki β jest MODY [10, 11]. Jak zostało wspomniane powyżej, już kilkadziesiąt lat temu zaobserwowano, że cukrzyca o wczesnym początku i stosunkowo łagodnym przebiegu klinicznym w pewnych rodzinach dziedziczy się jako cecha autosomalna dominująca [13, 16]. Taki typ dziedziczenia charakteryzuje się występowaniem choroby w kolejnych pokoleniach, z taką samą częstością u obu płci, i przekazywaniem jej potomstwu zarówno przez mężczyzn, jak i kobiety [17]. Prawdopodobieństwo takiego przekazania choroby przez nosiciela mutacji wynosi 50%. Kolejną, poza autosomalnym dominującym typem dziedziczenia cechą MODY jest wczesny początek, zazwyczaj w drugiej lub trzeciej dekadzie życia, brak otyłości u chorych i wspomniany już wcześniej nasilony defekt wydzielania insuliny, jako główny czynnik patogenetyczny [7, 10, 11].

Zanim jeszcze etiologia cukrzycy MODY poznana została na poziomie molekularnym, zaobserwowano, że nie stanowi ona jednolitej fenotypowo kategorii [18]. Wśród rodzin MODY występują takie, w których cukrzyca ma wyjątkowo łagodny, stabilny przebieg, z zaznaczoną hiperglikemią na czczo i umiarkowanym wzrostem glikemii w testach obciążenia lub po posiłku oraz prawie całkowitym brakiem występowania przewlekłych powikłań [10, 18]. Inni pacjenci charakteryzują się postępującą utratą funkcji komórek β , silnie upośledzoną odpowiedzią na bodziec glikemiczny i zmienną częstością powikłań mikronaczyniowych [10, 18]. Ta heterogenność fenotypów została wyjaśniona odkryciem kolejnych genów związanych z MODY, co pozwoliło podzielić tę cukrzycę na kilka podtypów [10, 11]. Obecnie w środowisku naukowym istnieje konsensus co do 6 genów związanych z MODY, z których 5 koduje czynniki transkrypcyjne obecne w komórce β trzustki [10]. Pojęcie MODY nie znalazło się w aktualnie obowiązującej klasyfikacji cukrzycy WHO. Zamiast tego, poszczególne podtypy wymienione są w kategorii III – *Inne specyficzne typy*, w podgrupie genetycznych defektów komórki β (Tabela 3) [3].

Tabela 3. Wybrane monogenowe defekty komórek β trzustki.

• Chromosom 11, gen Kir6.2 – PNDM (<i>permanent neonatal diabetes mellitus</i>)
• Chromosom 11, gen SUR1 – PNDM (<i>permanent neonatal diabetes mellitus</i>)
• Chromosom 12, gen HNF1 α – MODY3
• Chromosom 7, gen glukokinazy – MODY2
• Chromosom 17, gen HNF1 β – MODY5
• Chromosom 20, gen HNF4 α – MODY1
• Chromosom 13, gen IPF1 – MODY4
• Chromosom 2, gen NEUROD1 – MODY6
• Chromosom 2, gen KLF11
• Chromosom 9, gen CEL
• Genom mitochondrialny – MIDD (<i>maternally inherited diabetes with deafness</i>)

Według: Skupien J, Malecki MT. Rozbudowywanie podziału cukrzycy – nowe podtypy i możliwości lecznicze. Diabetologia Praktyczna 2007, tom 8: 1-12, zmodyfikowane.

1.2.1.1 MODY związana z mutacjami genu glukokinazy

Pierwszą chronologicznie opisaną przyczyną MODY były mutacje genu GCK, kodującego enzym glukokinazę [19, 20]. Jest on kluczowym regulatorem funkcji komórek β trzustki, który katalizuje reakcję fosforylacji glukozy do glikozo-6-fosforanu [21]. Stanowi to pierwszy etap szlaku glikolizy, limitujący produkcję ATP w komórce, a w konsekwencji wydzielanie insuliny. Zmniejszona aktywność glukokinazy u nosicieli mutacji powoduje podwyższenie progowego stężenia glukozy wyzwalającego sekrecję insuliny [22]. Mutacje GCK, związane z podtypem MODY2, w odróżnieniu od mutacji czynników transkrypcyjnych, odpowiadają za opisany wcześniej łagodny fenotyp z podwyższoną, typowo do 6-8 mmol/l glikemią na czczo, poposiłkowymi wzrostami glikemii nie przekraczającymi zazwyczaj 3 mmol/l, odsetkiem hemoglobiny glikowanej najczęściej niższym od 7 % i rzadkim występowaniem przewlekłych powikłań [23]. W obrazie klinicznym mieści się również nieznaczne obniżenie insulinowrażliwości oraz zmniejszona wątrobowa produkcja glikogenu [24]. Wynika to z faktu, iż glukokinaza ulega ekspresji również w wątrobie [21]. Defekt enzymatyczny obecny jest od urodzenia, jednak wiek diagnozy może znacznie różnić się, nawet wśród członków jednej rodziny. Zależy on bowiem od momentu, w którym dokonano pomiaru glikemii. Typowo choroba u dzieci diagnozowana jest w czasie rutynowych badań diagnostycznych wykonywanych na przykład podczas infekcji, a u dorosłych w trakcie badań okresowych lub przy teście przesiewowym u ciężarnych [23, 25].

1.2.1.2 MODY związana z mutacjami czynników transkrypcyjnych

Czynniki transkrypcyjne są bardzo heterogenną grupą białek; cechą wspólną jest wiązanie się ze swoistymi sekwencjami DNA w obrębie obszarów regulatorowych genów. W ten sposób białka te modulują ich ekspresję. Czynniki transkrypcyjne, których geny związane są cukrzycą MODY, to hepatocytowe czynniki jądrowe 4α , -1α , -1β (*hepatocyte nuclear factor-4 α , -1 α , -1 β* ; HNF4 α , -1α , -1β), czynnik promotora insuliny 1α (*insulin promoter factor-1 α* ; IPF-1 α) oraz NEUROD1 (związane odpowiednio z podtypami MODY 1, 3, 4, 5 i 6) [26, 27, 28, 29, 30]. Białka te wpływają na ekspresję genu insuliny, enzymów cyklu Krebsa oraz transporterów glukozy i szeregu innych [31, 32]. Ponadto, w modelu zwierzęcym wykazano ich rolę w rozwoju wysp

trzustkowych w czasie życia płodowego [33]. W wyniku tak złożonych procesów patofizjologicznych cukrzyca związana z mutacjami genów czynników transkrypcyjnych cechuje się głębokim, złożonym, biologicznym defektem komórek β . Fenotyp jest cięższy niż w formie związanej z mutacjami glukokinazy: defekt ma charakter postępujący, choroba cechuje się występowaniem znacznej hiperglikemii poposiłkowej, a częstość przewlekłych powikłań jest znaczna [11, 23, 34]. Co ciekawe, pomiędzy podtypami MODY 1 i 3 – 6 także występuje pewna fenotypowa heterogenność. Wynika ona między innymi z plejotropizmu genów czynników transkrypcyjnych, ulegających ekspresji w innych narządach poza trzustką. U pacjentów, nosicieli mutacji w genie HNF1 β (MODY5), na przykład, opisuje się zaburzenia rozwojowe nerek, głównie w postaci torbiele części korowej, hipoplazji, czy agenezji narządu [35, 36]. Występują również wady układu moczowo-płciowego. Do opisywanego fenotypu stosuje się termin RCAD (*renal cysts and diabetes* – torbiele nerek i cukrzyca) [36]. Charakter dotychczas opisanych fenotypów pozawyspowych w poszczególnych podtypach MODY podsumowano w Tabeli 4.

Tabela 4. Objawy pozawyspowe w cukrzycy MODY.

Podtyp MODY	Objawy pozawyspowe
MODY1	• Obniżenie stężenia triglicerydów w osoczu o 50% • Obniżenie poziomu apolipoprotein apoAII, apoCIII i apo(a) o 25%
MODY2	• Obniżenie wątrobowej syntezy glikogenu • Zwiększone tempo glukoneogenezy • Wątrobowa insulinooporność o niewielkim nasileniu
MODY3	• Obniżenie progu nerkowego dla glukozy • Gruczolaki wątroby
MODY4	• Nie opisano dotychczas charakterystycznych objawów
MODY5	• Wady rozwojowe nerek • Torbiele korowe nerek • Białkomocz i spadek filtracji kłębuszkowej • Wady rozwojowe układu rozrodczego (np. macica dwurożna) • Mięśzowe uszkodzenie wątroby • Hipoplazja trzustki
MODY6	• Nie opisano dotychczas charakterystycznych objawów

Według: Malecki MT. Genetics of type 2 diabetes mellitus. Diabetes Res Clin Pract 2005, 68: S10-S21.

1.2.1.3 Rozpoznanie cukrzycy MODY a praktyka kliniczna

Pytaniem, które często pada w środowisku diabetologów, jest kwestia relacji między postępowaniem w oparciu o wiedzę genetyczną o cukrzycy MODY a praktyką lekarską. Czy diagnostyka molekularna cukrzycy monogenowych jest przydatna dla lekarza klinicysty? Czy rozpoznanie MODY niesie dla chorego korzyści terapeutyczne?

Odpowiedź na powyższe pytania jest twierdząca. Rozpoznanie cukrzycy MODY ma istotne implikacje praktyczne. Rozróżnienie między monogenowymi defektami komórki β a cukrzycą typu 1, również jej formą LADA, pozwala na zastosowanie alternatywnego postępowania w stosunku do insulinoterapii [6, 11]. W cukrzycy MODY2 leczenie dietetyczne wydaje się być strategią wystarczającą i optymalną, dopóki poziom hemoglobiny glikowanej utrzymuje się na zadowalającym poziomie [11, 22, 23]. Pojawienie się z czasem, w miarę starzenia się, pewnych elementów patogenetycznych złożonej cukrzycy typu 2, na przykład otyłości, może pogorszyć przebieg choroby. Wiązać się to wówczas musi z koniecznością wprowadzenia stosownego leczenia farmakologicznego. W podtypach MODY uwarunkowanych mutacjami w genach czynników transkrypcyjnych postępowanie dietetyczne zazwyczaj szybko okazuje się niewystarczające [11, 23]. Ze względu na defekt wydzielniczy, dominujący w patogenezie tej choroby, lekami z wyboru pozostają pochodne sulfonilomocznika [37, 38, 39]. Pogląd ten został wsparty randomizowanym badaniem klinicznym, które wykazało znaczącą przewagę jednej z pochodnych sulfonilomocznika nad metforminą u chorych z MODY3 [40]. Efekt terapeutyczny obu leków w grupie chorych z klasycznym typem 2 cukrzycy był porównywalny. Mała przydatność metforminy u chorych z MODY wynika z faktu, iż pacjenci ci mają dobrą wrażliwość na insulinę. Warto zwrócić uwagę, że pochodne sulfonilomocznika są najstarszymi, najbardziej rozpowszechnionymi, najlepiej przebadanymi i najtańszymi stymulatorami wydzielania insuliny [37].

Diagnostyka molekularna cukrzycy monogenowej ma duże znaczenie z punktu widzenia prawnego. W Polsce i w większości krajów świata doustne leki przeciwcukrzycowe nie mają rejestracji do stosowania u dzieci. W uzasadnionych sytuacjach klinicznych możliwe jest jednak ich

użycie [41]. Takim przypadkiem powinna być cukrzyca MODY zdiagnozowana na podstawie badań genetycznych.

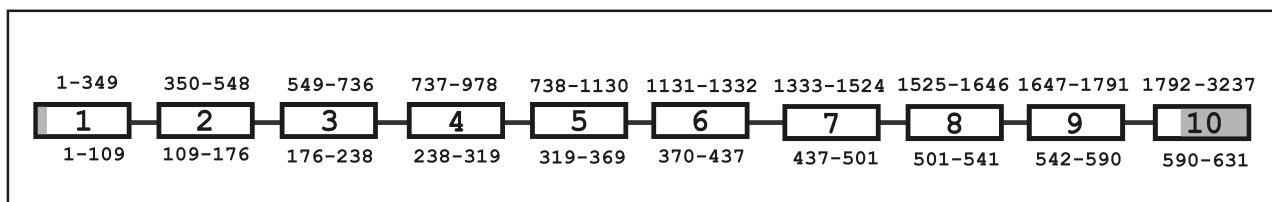
Wysokie prawdopodobieństwo przekazania cukrzycy MODY potomstwu sprawia, iż poradnictwo genetyczne jest ważnym elementem kompleksowej opieki diabetologicznej nad członkami dotkniętych chorobą rodzin. Badania genetyczne, poza charakterem diagnostycznym u pacjentów z rozpoznaną uprzednio cukrzycą, mają też znaczenie predykcyjne. Pozwalają one na jednoznaczne potwierdzenie lub wykluczenie ryzyka rozwoju cukrzycy MODY. Na podstawie badań genetycznych można zalecić bezobjawowemu nosicielowi modyfikację trybu życia, które mogą mieć pewne, choć niewielkie, znaczenie prewencyjne. Powtarzane regularnie badania diagnostyczne w kierunku cukrzycy u nosicieli mutacji MODY pozwala na wczesne rozpoczęcie właściwego leczenia, a co za tym idzie zminimalizowanie ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycy.

1.2.1.4 Cukrzyca MODY3 – forma autosomalnej dominującej cukrzycy o wczesnym początku, związana z mutacjami genu HNF1 α

W 1996 roku została opisana przez międzynarodową grupę badawczą pod kierunkiem Greama Bella najczęstsza, przynajmniej w dotychczas badanych populacjach, forma autosomalnej dominującej cukrzycy o wczesnym początku – MODY3. Jej przyczyną są mutacje genu HNF1 α (TCF1) [27]. Składa się on z 10 egzonów. Produkt genu wiąże się z DNA jako czynnik transkrypcyjny odgrywający istotną rolę w rozwoju endodermy, w tym trzustki [42]. Strukturę genu HNF1 α przedstawia Rycina 2. Produkt genu ma 631 aminokwasów. Znane są alternatywne, krótsze produkty genu, powstające wskutek alternatywnej obróbki mRNA (*splicing*) w obrębie egzonów 7 – 9. Składają się one odpowiednio z 573 lub 522 aminokwasów. Wszystkie formy białka mają identyczne pierwsze 437 aminokwasów i ostatnie 31 kodowane w 10 egzonie. W HNF1 α wyróżnić można kilka domen: dimeryzacyjną, obejmującą aminokwasy 1 – 33, kodowane przez pierwszy egzon, dwuczęściową domenę wiążącą DNA obejmującą homeodomenę (POU-H, aminokwasy 100 – 184, egzony 2 i 3), domenę POU-S (aminokwasy 198 – 281, egzony 3 i 4) oraz domenę transaktywacyjną, obejmującą aminokwasy 282 – 631 [43]. Pierwsza z domen odpowiada

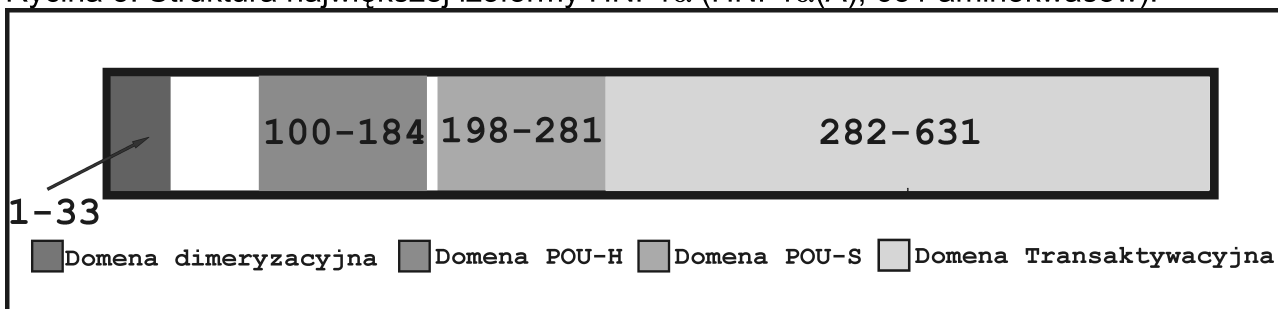
za tworzenie homodimerów lub heterodimerów (razem z HNF1 β) [27, 42]. Druga za przebieg procesu łączenia z promotorowym DNA kontrolowanych genów. Domena transaktywacyjna zaś warunkuje uruchomienie złożonego kompleksu transkrypcyjnego i syntezy mRNA. Ekspresja genu ma miejsce w trzustce, wątrobie, nerkach i jelitach. Budowę białka HNF1 α przedstawiono na Rycinie 3.

Rycina 2. Struktura genu HNF1 α .



Numerowane od 1 do 10 prostokąty oznaczają egzony. Liczby ponad schematem odpowiadają numerom nukleotydów cDNA w poszczególnych egzonach. Liczby poniżej schematu oznaczają numery aminokwasów kodowanych przez poszczególne egzony. Szarym kolorem zaznaczono niekodujące części genu po stronie 3' i 5'. Opracowano według bazy danych www.ensembl.org.

Rycina 3. Struktura największej izoformy HNF1 α (HNF1 α (A), 631 aminokwasów).



Liczby oznaczają numery aminokwasów budujących poszczególne domeny. Opracowano według: Harries LW, Ellard S, Stride A, The European MODY consortium, Morgan NG, Hattersley AT. Isomers of the TCF1 gene encoding hepatocyte nuclear factor-1 alpha show differential expression in the pancreas and define the relationship between mutation position and clinical phenotype in monogenic diabetes. Hum Mol Genet 2006, 15: 2216-2224.

Dotychczasowe publikacje charakteryzują MODY3 jako stosunkowo ciężką, progresywną formę choroby, która rozpoczyna się najczęściej w drugiej lub trzeciej dekadzie życia [10, 11, 27]. W jej obrazie klinicznym opisywanym w różnych populacjach nie mieściły się typowo otyłość, nadciśnienie tętnicze, czy zaburzenia lipidowe. U pacjentów z MODY3 obserwowano znacznie zmniejszoną odpowiedź na bodziec glikemiczny w testach obciążeniowych [23, 34]. Mimo faktu, iż glikemia na czczo może przez stosunkowo długi czas pozostawać w granicach normy, typowe są wysokie poziomy glukozy po posiłku. Choroba przez pewien czas może być klinicznie bezobjawowa, jednak po wielu latach częstość przewlekłych powikłań cukrzycy jest znaczna [10, 11, 44]. Opisano pełne spektrum mikro- i makronaczyniowych powikłań, również w ich

najcięższych stadiach zaawansowania. Leczenie wyłącznie dietetyczne było skuteczne jedynie na początku choroby. Większość pacjentów wymagała farmakoterapii, najpierw pochodnymi sulfonilomocznika, po latach zaś insuliną. To ostatnie bywa konieczne ze względu na pogłębienie się defektu komórek β , jak i progresję przewlekłych powikłań.

Plejotropizm genu $HNF1\alpha$ powoduje, iż hiperglikemii towarzyszą czasem objawy pozatrzustkowe, niejednokrotnie o dużych implikacjach klinicznych. Wiąże się to z faktem, iż gen ten ulega ekspresji w kilku innych narządach. Jednym z nich są nerki [27]. Do charakterystycznych objawów MODY3 zaliczono obniżenie progu wydalania z moczem glukozy, co powoduje, że nawet przy dobrym wyrównaniu metabolicznym u chorego może pojawić się cukromocz [45]. Wynika to najprawdopodobniej z upośledzonej cewkowej reabsorpcji glukozy i może mieć związek ze zmniejszoną ekspresją transporterów glukozy w cewkach nerkowych. Objaw ten wraz z charakterystycznym wywiadem rodzinnym może być silną przesłanką do poszukiwania mutacji $HNF1\alpha$. Jak wspomniano wyżej $HNF1\alpha$ może występować w aktywnej formie jako heterodimer wraz z $HNF1\beta$ [42]. Takie powiązanie funkcjonalne może być dobrym argumentem uzasadniającym poszukiwanie zaburzeń rozwojowych układu moczowo-płciowego w MODY3. Dodatkowy powód to ekspresja $HNF\alpha$ na wczesnym etapie rozwoju embrionalnego nerek, aczkolwiek nieco późniejszym niż w przypadku $HNF1\beta$ [43]. W dobrze scharakteryzowanych kolekcjach rodzin MODY, takich jak brytyjska, francuska i amerykańska oraz kilku innych nie donoszono jednak o występowaniu wad nerek u nosicieli mutacji w $HNF1\alpha$. Sprawa ta wymaga jednak dalszych badań. $HNF1\alpha$ u ludzi ulega ekspresji także w hepatocytach. Stanowi potężny regulator metabolizmu wątrobowego oraz bierze udział w rozwoju embrionalnym tego narządu [42, 47]. Najcięższą, lecz jednocześnie rzadką cechą fenotypową MODY3 dotyczącą wątroby, są opisane w dwóch dużych rodzinach mnogie gruczolaki wątroby, mogące zagrażać ciężkimi krwotokami [48]. Powstawanie gruczolaków uwarunkowane jest dwualleliczną inaktywacją genu $HNF1\alpha$, która u pacjentów z MODY3 zachodzi w mechanizmie utraty heterozygotyczności (LOH – *loss of heterozygosity*). Zatem $HNF1\alpha$ spełnia kryteria genu supresorowego onkogenezy. Częstość występowania tego nowotworu w cukrzycy MODY3, związane z tym ryzyko i rokowanie pozostają

nieznane. Mutacje genu HNF1 α mogą również upośledzać funkcję syntetyczną wątroby. Zjawisko to można tłumaczyć bardzo rozległym, wielokierunkowym oddziaływaniem tego czynnika transkrypcyjnego na metabolizm hepatocyta. Przykładem takiego zaburzenia jest około 30 % obniżenie osoczowego stężenia apolipoproteiny M (apoM), składnika lipoprotein HDL [49, 50]. Doniesienie to nie znalazło jednak potwierdzenia w innym badaniu [51].

Polska jest jednym z niewielu dużych krajów europejskich nie posiadających rejestru rodzin MODY. W populacji polskiej nie prowadzono także skoordynowanych systematycznych badań pod kątem podłoża molekularnego cukrzycy MODY. Zmiana tego stanu rzeczy miałaby duże znaczenie zarówno naukowe oraz praktyczne, ze względu na możliwość zoptymalizowania leczenia chorych.

2. CELE PRACY

Celem projektu jest badanie podłoża molekularnego i wybranych zagadnień klinicznych cukrzycy MODY3 w regionie małopolskim. Cele szczegółowe pracy obejmowały:

1. Rekrutację rodzin do badań przesiewowych w kierunku cukrzycy MODY3 w ramach tworzonego Polskiego Rejestru Rodzin MODY.
2. Poszukiwanie, ocenę częstości i charakterystykę mutacji genu $HNF1\alpha$ (MODY3) w rodzinach z cukrzycą MODY włączonych do Polskiego Rejestru Rodzin MODY.
3. Analizę segregacji i ocenę znaczenia zidentyfikowanych mutacji genu $HNF1\alpha$ w rodzinach.
4. Charakterystykę kliniczną nosicieli mutacji w genie $HNF1\alpha$.
5. Poszukiwanie wad rozwojowych nerek u nosicieli mutacji genu $HNF1\alpha$.

3. METODYKA

3.1. Rekrutacja rodzin do badań przesiewowych w kierunku cukrzycy MODY3 w ramach tworzonego Polskiego Rejestru Rodzin MODY

Określenie jednoznacznych zasad rekrutacji rodzin jest kwestią podstawową w badaniach nad cukrzycą MODY. Brak jest jednolitych kryteriów, akceptowanych przez całość międzynarodowego środowiska zajmującego się badaniami nad cukrzycą MODY. Generalnie przyjęcie ostrzejszych kryteriów dotyczących wieku zachorowania, liczby pokoleń z cukrzycą w rodzinach prowadzi do większej ilości pozytywnych wyników, czyli zidentyfikowanych mutacji w genach MODY w badanej grupie [10]. Na odwrót, liberalna definicja zmniejsza odsetek rodzin ze zidentyfikowanym podłożem molekularnym. W niniejszej pracy doktorskiej przyjęto pierwszą z dwóch wspomnianych strategii, co w założeniu miało pozwolić na bardziej ekonomiczne zużytkowanie środków finansowych, aspekt szczególnie ważny w polskich warunkach. Rekrutacja rodzin MODY opierała się więc na następujących kryteriach klinicznych:

- a) autosomalny dominujący sposób dziedziczenia cukrzycy w rodzinie, cukrzyca obecna co najmniej w 3 pokoleniach;
- b) dwie lub więcej osób w rodzinie, u których cukrzyca została rozpoznana przed 30. rokiem życia i miała cechy klinicznej insulinoniezależności (brak terapii insuliną przez kilka lat po diagnozie lub niewielka dawka, $<0,5 \text{ j./kg}$ masy ciała, w przypadku, gdy insulinoterapia została wprowadzona).

Celem zdefiniowania, czy rodzina spełnia założone kryteria, probant, czyli osoba chorująca na cukrzycę, przez którą nawiązany został kontakt z rodziną, wypełniała dwie standartowe ankiety (Załącznik A i B). Pierwsza z nich, o charakterze przesiewowym, pozwalała wstępnie zakwalifikować rodzinę do dalszego postępowania rekrutacyjnego. Druga ankieta miała charakter szczegółowy i dostarczała szczegółowych informacji klinicznych (dotyczących sposobu leczenia, współistniejących chorób, itd.).

Rekrutacja probantów rodzin prowadzona była na terenie województwa małopolskiego będącego terenem działania Oddziału Małopolskiego Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego

i stanowiła podstawę tworzonego Polskiego Rejestru Rodzin MODY. Wstępnej analizie poddano także dane z niewielkiego, pilotażowego badania przeprowadzonego w Katedrze i Klinice Chorób Metabolicznych CMUJ w latach 2000-2001 [52]. Z 15 badanych podówczas rodzin jedynie trzy (M001, M002, M044) spełniały aktualne zastrzone, zdefiniowane powyżej kryteria włączenia do Rejestru, w tym jedyna uprzednio opisana pierwsza polska rodzina MODY3 z mutacją Ser225fsdelC. Wszystkie te rodziny zostały formalnie włączone do Polskiego Rejestru Rodzin MODY. W trakcie realizacji niniejszego badania wszystkie te 3 rodziny poddano ponownie kontrolnemu sekwencjonowaniu w kierunku mutacji w genie HNF1 α . W rodzinie z opisaną mutacją przeprowadzono rekrutację nowych osób, zaś u wszystkich jej członków przeprowadzono aktualne badania kliniczne i biochemiczne.

3.2. Poszukiwanie, ocena częstości i charakterystyka mutacji genu HNF1 α (MODY3) w rodzinach z Polskiego Rejestru Rodzin MODY

Do wstępnych badań poszukiwawczych mutacji (*screening*) w genie HNF1 α zostało użyte wyizolowane standardową metodą genomowe DNA [53] jednej chorej osoby z każdej rodziny włączonej do badania. Poszukiwanie mutacji przeprowadzone zostało metodą bezpośredniego sekwencjonowania i obejmowało promotor oraz 10 egzonów wraz z przylegającymi częściami intronów genu HNF1 α . Wspomniane odcinki genu były amplifikowane za pomocą polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR) przy użyciu primerów o sekwencji przedstawionej w Tabeli 5. Oczyszczone produkty amplifikacji DNA były sekwencjonowane przy zastosowaniu urządzenia ABI Prism 377 DNA Sequencer, zgodnie z protokołem i przy użyciu odczynników zalecanych przez producenta (Applied Biosystems). Procedurę automatycznego sekwencjonowania wykonywano w Laboratorium Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych, Diabetologii i Nefrologii, Śląskiej Akademii Medycznej w Zabrze. Za referencyjny punkt odniesienia posłużyła sekwencja opublikowana w bazie danych Ensembl (*European Bioinformatics Institute, European Molecular Biology Laboratory, www.ensembl.org*) pod numerem ENSG00000135100. Do analizy wykrytych zmian w sekwencji nukleotydów wykorzystano bazę polimorfizmów Ensembl, bazę dbSNP z NCBI (*National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov*), bazę HGMD (*Human*

Gene Mutation Database, Institute of Medical Genetics, Cardiff, www.hgmd.cf.ac.uk), bazę danych Medline oraz opublikowane uprzednio zbiory mutacji i polimorfizmów genu HNF1 α [54].

Tabela 5. Primery użyte do amplifikacji badanych fragmentów genu HNF1 α podczas sekwencjonowania.

Fragment genu	Primery	Długość produktu
Promotor	Primer F: TCCCATCGCAGGCCATAGCTC Primer R: CCGTCTGCAGCTGGCTCAGTT	385 bp
Egzon 1	Primer F: GGCAGGCAAACGCAACCCACG Primer R: GAAGGGGGGCTCGTTAGGAGC	483 bp
Egzon 2	Primer F: CATGCACAGTCCCCACCCTCA Primer R: TCCCACTGACTTCCTTTCC	441 bp
Egzon 3	Primer F: GGGCAAGGTCAGGGGAATGGA Primer R: CAGCCCAGACCAAACCAGCAC	304 bp
Egzon 4	Primer F: CAGAACCCTCCCCTTCATGCC Primer R: GGTGACTGCTGTCACTGGGAC	397 bp
Egzon 5	Primer F: GGCAGACAGGCAGCTGGCCTA Primer R: GCCTCCCTAGGGACTGCTCCA	346 bp
Egzon 6	Primer F: TGGAGCAGTCCCTAGGGAGGC Primer R: GTTGCCCCATGAGCCTCCCAC	322 bp
Egzon 7	Primer F: GGTCTTGGGCAGGGGTGGGAT Primer R: CCCCTGCATCCATTGACAGCC	321 bp
Egzon 8	Primer F: GAGGCCTGGGACTAGGGCTGT Primer R: CTCTGTCACAGGCCAAGGGAG	229 bp
Egzon 9	Primer F: CAGAGCCCCTCACCCCCACAT Primer R: GCCTGCCAGTGCTTCCTCACAG	339 bp
Egzon 10	Primer F: GTACCCCTAGGGACAGGCAGG Primer R: ACCCCCCAAGCAGGCAGTACA	248 bp

Po przeprowadzeniu poszukiwania mutacji w genie HNF1 α u wszystkich probantów rodzin dokonane zostało podsumowanie częstości i charakteru mutacji w genie HNF1 α . Oceniono:

- a) odsetek wszystkich probantów z mutacją w genie HNF1 α (MODY3) w zebranej grupie;
- b) charakter opisanych mutacji tzn. zaklasyfikowanie ich jako zmiany sensu, nonsensownych, zmieniających ramkę odczytu, zmieniających miejsca wycinania intronów (*splicing sites*) lub strukturę promotora;
- c) lokalizację mutacji w odniesieniu do poszczególnych egzonów genu i domen białka.

3.3 Analiza segregacji i ocena znaczenia zidentyfikowanych mutacji genu HNF1 α w rodzinach

Mutacje w promotorze potencjalnie zmieniające miejsca przyłączania czynników transkrypcyjnych (tzw. *binding sites*), wpływające na strukturę aminokwasową produktu genu lub wpływające na tzw. *splicing sites* (miejsca wycinania intronów) były badane pod kątem segregowania z cukrzycą w rodzinie. Przez segregację mutacji genu HNF1 α z MODY rozumiano dziedziczenie poszczególnych zmian w sekwencji razem z cukrzycą, a w konsekwencji obecność fenotypu choroby u ich nosicieli i jednocześnie brak cukrzycy u osób od nich wolnych.

Celem badania segregacji sekwencjonowano fragment genu, w którym zidentyfikowano mutację u pozostałych członków rodziny. Jeżeli segregacja została stwierdzona, w przypadku zmian sekwencji, które nie były wcześniej opisywane celem dalszego potwierdzenia jej patogenicznego charakteru przeprowadzono ich poszukiwanie w grupie kontrolnej liczącej 100 osób bez cukrzycy. W tym celu zaprojektowano protokoły zmiennej długości fragmentów restrykcyjnych (*restriction fragment length polymorphism* – RFLP). Brak występowania mutacji w grupie kontrolnej przyjmowano jako ostateczne potwierdzenie patogenicznego znaczenia mutacji. Opisaną analizę RFLP przeprowadzono również dla wcześniej opublikowanej mutacji Ser225fsdelC z populacji polskiej. Ponadto celem ułatwienia i przyspieszenia analizy segregacji zaprojektowano protokoły RFLP dla niektórych opisanych wcześniej mutacji. Metoda ta została wykorzystana równolegle z badaniem za pomocą bezpośredniego sekwencjonowania. Protokoły RFLP przedstawiono w Tabelach 6 i 7. Wpływ mutacji na strukturę białka oraz ich lokalizacja w obrębie poszczególnych domen oceniana była na podstawie analizy sekwencji genu HNF1 α (TCF1) opublikowanych w bazach danych NCBI

oraz Ensembl. Podział białka na domeny strukturalno – funkcjonalne, tak jak opisano we wstępie, przyjęto według publikacji francuskiej grupy badaczy [55]. Dla mutacji zmieniających ramkę odczytu ustalano nową sekwencję aminokwasów oraz poszukiwano lokalizacji miejsca przedwczesnej terminacji translacji przy użyciu programu *ORF Finder* (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html). Skutki mutacji zmieniających miejsca wycinania intronów badano przy pomocy programu *GENSCAN Web Server* (Stanford University) [56, 57]. Znaczenie funkcjonalne mutacji zmiany sensu oceniano badając międzygatunkową konserwatywność zmienionych aminokwasów. Do analizy przeprowadzonej w programie *ClustalW 1.83* [58] użyto sekwencji aminokwasowych następujących gatunków: myszy (*Mus musculus*), szczura (*Rattus norvegicus*), dzika (*Sus scrofa*), oposa (*Monodelphis domestica*), kury (*Gallus gallus*) i ryby danio pręgowanego (*Danio rerio*, ang. *zebrafish*, rodzina karpiowatych); pochodzących z baz danych Ensembl oraz NCBI.

Tabela 6. Protokoły RFLP służące do badania występowania nowych mutacji genu HNF1 α w grupie kontrolnej.

Mutacja	Protokół PCR	Protokół trawienia
Ser225fsdelC	Primer F: CCAGGCCTATGAGAGGCAGAAGAACCTTAG Primer R: TTACAGGACCTAGAGTCACCTTCCCCTTCC Temperatura annealingu: 58 °C	Enzym restrykcyjny: Bpu10I (Fermentas) Temperatura trawienia: 37 °C Trawiony allel: dziki (C)
Ser249Pro	Primer F: AGGACAGGGTTCCTCTGAGC Primer R: CATGAATGGAATGGAACCAA Temperatura annealingu: 55 °C	Enzym restrykcyjny: BccI (New England Biolabs) Temperatura trawienia: 37 °C Trawiony allel: dziki (Ser)
Asn257Thr	Primer F: CCAGGCCTATGAGAGGCAGAAGAACCTTAG Primer R: TTACAGGACCTAGAGTCACCTTCCCCTTCC Temperatura annealingu: 58 °C	Enzym restrykcyjny: BspI (Fermentas) Temperatura trawienia: 37 °C Trawiony allel: mutacja (Thr)

Tabela 7. Protokoły RFLP służące do wstępnej oceny segregacji niektórych znanych mutacji genu HNF1 α .

Mutacja	Protokół PCR	Protokół trawienia
Arg131Gln	Primer F: CCCTGTGTCCTGGCATAAAT Primer R: GTTGAGGTGTTGGGACAGGT Temperatura przyłączania: 54 °C	Enzym restrykcyjny: Smul (Fermentas) Temperatura trawienia: 37 °C Trawiony allel: dziki (Arg)
Arg171X	Primer F: CACAGCGGGAGGTGGTCGATAC Primer R: CGGGGTAGGGTCATTACTTACACTG Temperatura przyłączania: 56 °C	Enzym restrykcyjny: BseXI (Fermentas) Temperatura trawienia: 65 °C Trawiony allel: dziki (Arg)
IVS2nt+1G>A	Primer F: CGTGTGGCGAAGATGGTCAAGTCCT Primer R: AGGGAAGATGCGGGGTAGGGTCATTACGTA Temperatura przyłączania: 60 °C	Enzym restrykcyjny: Pfl23II (Fermentas) Temperatura trawienia: 37 °C Trawiony allel: dziki (G)
Arg263His	Primer F: TTCTCAGAACCCTCCCCTTC Primer R: CCTTGTCCCCACATACTACT Temperatura przyłączania: 56 °C	Enzym restrykcyjny: Xcel (Fermentas) Temperatura trawienia: 37 °C Trawiony allel: mutacja (His)

W przypadku nie stwierdzenia mutacji u żadnego z rodziców nosiciela, u tych osób (nosiciel mutacji i rodzice) zgenotypowano 16 częstych polimorfizmów i analizowano ich dziedziczenie pod kątem potwierdzenia relacji pokrewieństwa, w pierwszym rzędzie ojcostwa. Badano następujące polimorfizmy:

- gen PBX1 (*Pre-B cell leukemia transcription factor-1*): rs1686195
- gen USF1 (*upstream stimulatory factor-1*): rs3737787
- gen CHP2D (cytochrom P450 2D):*4
- gen LCT (laktaza): rs2322659
- gen ATPA1 (podjednostka α Na^+/K^+ ATP-azy): rs1998447
- gen PRNP (główne białko prionowe): rs1799990
- gen ACE (konwertaza angiotensyny): I/D
- gen GLP1R (receptor glukagonopodobnego peptydu-1): rs1042044
- gen CAPN10 (kalpaina 10): SNP 19
- gen DBP (*albumin D-box binding protein*): rs386551
- gen NEUROD1 (*neurogenic differentiation factor 1*): rs1801262
- gen F13B (polipeptyd B czynnika XIII krzepnięcia):rs6003
- gen MMP9 (gelatynaza B): rs13969
- gen ITGA2B (glikoproteina IIb trombocytów): rs5911
- gen A1AT (serpina 1): rs709932
- gen PTGS1 (cyklooksygenaza 1): rs3842789

3.4. Metodyka badania charakterystyki klinicznej chorych z mutacjami HNF1 α

Charakterystyka kliniczna grupy chorych z cukrzycą MODY3 została przeprowadzona na podstawie ankiet, dostępnej dokumentacji medycznej, badania podmiotowego i przedmiotowego chorych oraz analiz biochemicznych i badań dodatkowych.

Do analizy włączono wszystkie osoby z mutacjami MODY3 (chorujące i nie chorujące na cukrzycę), które ukończyły 16 lat (50 osób). U wszystkich zostało przeprowadzone badanie ankietowe. Ankiety zawierały pytania dotyczące między innymi wieku rozpoznania cukrzycy,

wywiadu rodzinnego, masy ciała, obecności nadciśnienia tętniczego, chorób nerek i oczu (Załącznik B). Ponadto dokonana została analiza dostępnej dokumentacji medycznej, a w uzasadnionych przypadkach nawiązany został kontakt z lekarzem prowadzącym. Oprócz tego przeprowadzono podstawowe badanie fizykalne obejmujące między innymi pomiar wzrostu, wagi, wyznaczenie wskaźnika BMI (*Body Mass Index*), wskaźnika talia / biodro (WHR – *waist / hip ratio*) oraz pomiar ciśnienia tętniczego.

U osób z rodzin MODY3 w warunkach na czczo pobrana została krew dla potrzeb ekstrakcji DNA, oznaczenia poziomu glukozy, HbA_{1c}, peptydu C, lipidogramu, kreatyniny. Ponadto pobrana została próbka moczu dla oceny wydalania albumin z moczem i wyznaczenia wskaźnika albumina / kreatynina (ACR – *albumin / creatinine ratio*). Oznaczenia biochemiczne wykonano w Zakładzie Biochemii Klinicznej Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Poziom kreatyniny w surowicy oraz w moczu oznaczano metodą Jaffego z kompensacyjną próbą ślepą, stężenie glukozy oznaczano metodą enzymatyczną GOD-PAP (*Glucose Oxidase-Phenol 4-Aminophenazone Peroxidase*) z materiału pobranego do naczynia zawierającego fluorek sodu jako inhibitor glikolizy, oznaczenie cholesterolu całkowitego wykonano metodą enzymatyczną CHOD-PAP (*Cholesterol Oxidase Phenol 4-Aminoantipyrine Peroxidase*), a poziom triglicerydów metodą GPO-PAP (*Glycerol Phosphate Oxidase Phenol 4-Aminoantipyrine Peroxidase*), natomiast stężenie LDL-cholesterolu w surowicy wyliczano przy użyciu formuły Friedewalda:

$$\text{LDL-cholesterol} = \text{cholesterol całkowity} - \text{HDL-cholesterol} - \text{Triglicerydy} / 5$$

Powyższe pomiary wykonywano przy pomocy analizatora Hitachi 917 lub Modular P. Stężenie albuminy w moczu oznaczano metodą immunonefelometryczną aparatem Nephelometer II. Poziom peptydu C oznaczano metodą immunoenzymatyczną (ELISA, Dako Cytomation). U chorych z poziomem kreatyniny > 150 µmol/l stężenie peptydu C nie było brane pod uwagę. Odsetek hemoglobiny glikowanej (HbA_{1c}) oznaczano w Pracowni Biochemicznej Katedry i Kliniki Chorób Metabolicznych CMUJ przy zastosowaniu metody wysokowydajnej chromatografii cieczowej (HPLC, *high-performance liquid chromatography*) aparatem Variant, BioRad.

Oceniano także obecność przewlekłych powikłań cukrzycy. Obecność retinopatii cukrzycowej weryfikowano na podstawie wyniku badania dna oka dostępnego w dokumentacji medycznej. W przypadku braku takiego badania w ciągu poprzedzającego roku, chorzy kierowani byli do rejonowej poradni okulistycznej lub Pracowni Okulistycznej przy Katedrze i Klinice Chorób Metabolicznych. Obecność nefropatii cukrzycowej definiowano na podstawie stwierdzenia przynajmniej jednej z następujących nieprawidłowości:

- a) wartości wskaźnika albumina / kreatynina w moczu $> 2,26$ mg/mmol,
- b) poziomu kreatyniny w surowicy krwi > 97 μ mol/l (górną granicę normy referencyjnej dla stosowanej metody oznaczenia)

Diagnozę choroby niedokrwiennej serca potwierdzano na podstawie wywiadu oraz uprzedniej dokumentacji medycznej. Ponadto obecność nadciśnienia tętniczego diagnozowano na podstawie:

- a) uprzednio postawionej diagnozy lekarskiej;
- b) stosowania leków nadciśnieniowych;
- c) wartości skurczowego ciśnienia tętniczego ≥ 140 mmHg i/lub wartości ciśnienia rozkurczowego ≥ 90 mmHg.

Grupę porównawczą w odniesieniu do wybranych parametrów klinicznych i biochemicznych (wiek, masa ciała, BMI, obwód pasa, WHR, sposób leczenia, występowanie przewlekłych mikronaczyniowych powikłań cukrzycy, choroby niedokrwiennej serca i nadciśnienia tętniczego, poziom glukozy na czczo, poziom peptydu C, parametry lipidowe, odsetek hemoglobiny glikowanej) stanowiła kohorta z typową, wieloczynnikową cukrzycą typu 2. Osoby te zostały przyporządkowane w stosunku 1:1 do pacjentów chorujących na MODY3 powyżej 16. roku życia (44 osoby) na podstawie płci oraz czasu trwania cukrzycy, celem zachowania jednorodności grup pod względem tych parametrów. Przyporządkowania dokonano w sposób dokładny dla płci natomiast dla czasu trwania cukrzycy zastosowano algorytm genetyczny wykorzystujący maksymalizację wartości p (błąd pierwszego rodzaju) obliczonej dla różnic między grupami w teście Kołmogorowa – Smirnowa oraz teście t dla par powiązanych. W tym celu wykorzystano

funkcję *GenMatch* z modułu *Matching* w wersji 4.2-4 języka i środowiska *R* (wersja 2.4.1, *The R Foundation for Statistical Computing, Statistics Department of the University of Auckland*, oraz *Bell Laboratories*) [59]. Pacjenci rekrutowani byli z grupy 546 osób zgromadzonych w bazie danych Pracowni Genetycznej Katedry i Kliniki Chorób Metabolicznych CMUJ dla potrzeb badań nad podłożem genetycznym cukrzycy typu 2 [60, 61]. Z powodu wcześniej występującego początku cukrzycy MODY i dłuższego czasu trwania choroby w porównaniu z wieloczynnikową cukrzycą typu 2 nie udało się przyporządkować osób z tej grupy kontrolnej sześciu pacjentom w wieku od 46 do 81 lat, chorujących od co najmniej 30 lat, maksymalnie przez 43 lata, co zredukowało liczebność porównywanych grup do 38 osób.

Wybrane parametry biochemiczne: poziom peptydu C oraz parametry lipidowe, a także częstość występowania nadciśnienia tętniczego porównano także z liczącą 50 osób grupą osób bez cukrzycy. Ochotników do tej grupy kontrolnej rekrutowano z kohorty 494 osób bez cukrzycy zgromadzonych w opisaney wyżej bazie danych, a także spośród współmałżonków pacjentów z MODY. Niniejsza grupa kontrolna została przyporządkowana pod względem płci i wieku do 50-osobowej grupy z mutacjami MODY3 po ukończeniu 16. roku życia, z wykorzystaniem opisanego wcześniej algorytmu.

Obliczenia statystyczne przeprowadzono dla cech ilościowych przy pomocy testu t Studenta dla par powiązanych (funkcja *t.test* z modułu *stats* języka i środowiska *R*), po uprzednim testowaniu normalności testem Shapiro-Wilka (funkcja *shapiro.test*) i jednorodności wariancji testem F (funkcja *var.test*). Dla zmiennych ilościowych nie mających rozkładu normalnego zastosowano test nieparametryczny U Manna-Whitneya (funkcja *wilcox.test*). Natomiast dla cech jakościowych zastosowano test χ^2 (funkcja *chisq.test*). W analizach wieloczynnikowych korzystano z funkcji *lm* i *anova* (analiza wariancji), jako test *post hoc* wykorzystując test Tukey'a (funkcja *TukeyHSD*). Regresję logistyczną obliczano przy pomocy funkcji *lrm* i *anova.Design* z modułu *Design* w wersji 2.0-12 (*Department of Biostatistics, Vanderbilt University, Nashville, USA*) [62].

Przyjęto 5 % poziom istotności.

3.5. Poszukiwanie wad rozwojowych nerek u nosicieli mutacji genu HNF1 α

W ramach niniejszej pracy doktorskiej zaplanowano u wszystkich nosicieli mutacji genu MODY3 poszukiwanie obecności zaburzeń rozwojowych nerek. Argumenty stanowiące uzasadnienie podjęcia niniejszego celu zostały przedstawione we wstępie rozprawy. W skrócie, stanowią je obecność HNF1 α w nerkach w trakcie rozwoju embrionalnego tego narządu oraz występowanie wad morfologicznych nerek w cukrzycy MODY5 związanej z genem pokrewnego czynnika HNF1 β , który tworzy heterodimery z białkiem HNF1 α . Podstawą rozpoznania wad rozwojowych nerek były wyniki badania USG jamy brzusznej dostępne w dokumentacji medycznej lub, w przypadku braku takiego badania, ultrasonografia wykonana w ramach opieki ambulatoryjnej lub hospitalizacji w Oddziale Klinicznym Kliniki Chorób Metabolicznych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie albo też w warunkach poradni rejonowej.

4. WYNIKI

4.1. Wyniki rekrutacji rodzin do badań przesiewowych w kierunku cukrzycy MODY3 w ramach tworzonego Polskiego Rejestru Rodzin MODY

Na podstawie przyjętych kryteriów diagnostycznych cukrzycy MODY do badania zakwalifikowano 47 rodzin. Charakterystykę kliniczną 47 probantów oraz rodzin przedstawia Tabela 8. Dane uzyskano na podstawie ankiet wypełnianych przez chorych oraz dostępnej dokumentacji medycznej. W grupie tej przeważały kobiety (74 %), średni wiek probantów w momencie badania wynosił 33,7 lat, średni czas trwania cukrzycy wynosił 12,4 lat. Grupa probantów charakteryzowała się zróżnicowanym sposobem terapii w chwili badania, co jest fenomenem typowym dla cukrzycy MODY. Stosowanie insulinoterapii u niektórych osób wynikało z pierwotnie postawionego rozpoznania typu 1 cukrzycy w momencie diagnozy. Badani cechowali się prawidłową masą ciała (średnie BMI 24.0). U 14 (30 %) zdiagnozowano nadciśnienie tętnicze. Przewlekłe mikronaczyniowe powikłania cukrzycy w postaci retinopatii lub nefropatii cukrzycowej stwierdzono u 9 osób (19 %). Probandci informowali o posiadaniu średnio 5,3 krewnych chorujących na cukrzycę (od 3 do 13 osób), co w sumie dało liczbę 248 pacjentów z cukrzycą. Wywiad rodzinny w kierunku cukrzycy był najczęściej trzypokoleniowy, w 6 rodzinach czteropokoleniowy.

Tabela 8. Charakterystyka kliniczna 47 probantów z rodzin MODY włączonych do badania.

Płeć (kobiety / mężczyźni)	35 / 12
Liczba chorych na cukrzycę w wywiadzie rodzinnym	5,3 (3-13)
Liczba pokoleń, w których występuje cukrzyca	3,1 (3-4)
Wiek w momencie badania [lata]	33,7; 14,4
Wiek rozpoznania cukrzycy [lata]	21,2; 9,0
BMI (<i>body mass index</i>) [kg/m ²]	24,0; 5,0
Sposób leczenia:	Ilość probantów:
dieta:	9
leki doustne:	13
insulina:	25

W tabeli dane dotyczące płci i sposobu leczenia podano jako ilość pacjentów. Liczbę chorych na cukrzycę w wywiadzie rodzinnym oraz liczbę pokoleń z cukrzycą przedstawiono jako średnią, w nawiasie podano zakres wartości. Dla pozostałych danych przedstawiono średnią i odchylenie standardowe.

4.2. Wyniki poszukiwania mutacji genu HNF1 α (MODY3), ich charakterystyka i ocena częstości w rodzinach z Polskiego Rejestru Rodzin MODY

Wśród 47 probantów mutację genu HNF1 α , która mogła być przyczyną cukrzycy, stwierdzono u 13, co stanowiło 27,6 % całej grupy. Zidentyfikowano 10 opisanych uprzednio mutacji:

- 4 mutacje zmiany sensu: Arg131Gln (stwierdzona dwukrotnie), Arg263His, Arg271Trp, Pro447Leu,
- 3 mutacje zmiany ramki odczytu: Ser225fsdelC, Pro291fsinsC, Pro379fsdelT
- 1 mutacja nonsensowna Arg171X
- 2 mutacje zmieniające miejsca wycinania intronów: IVS2nt+1G>A i IVS7nt-6G>A.

Zidentyfikowano nowe mutacje:

- 2 mutacje zmiany sensu Ser249Pro i Asn257Thr

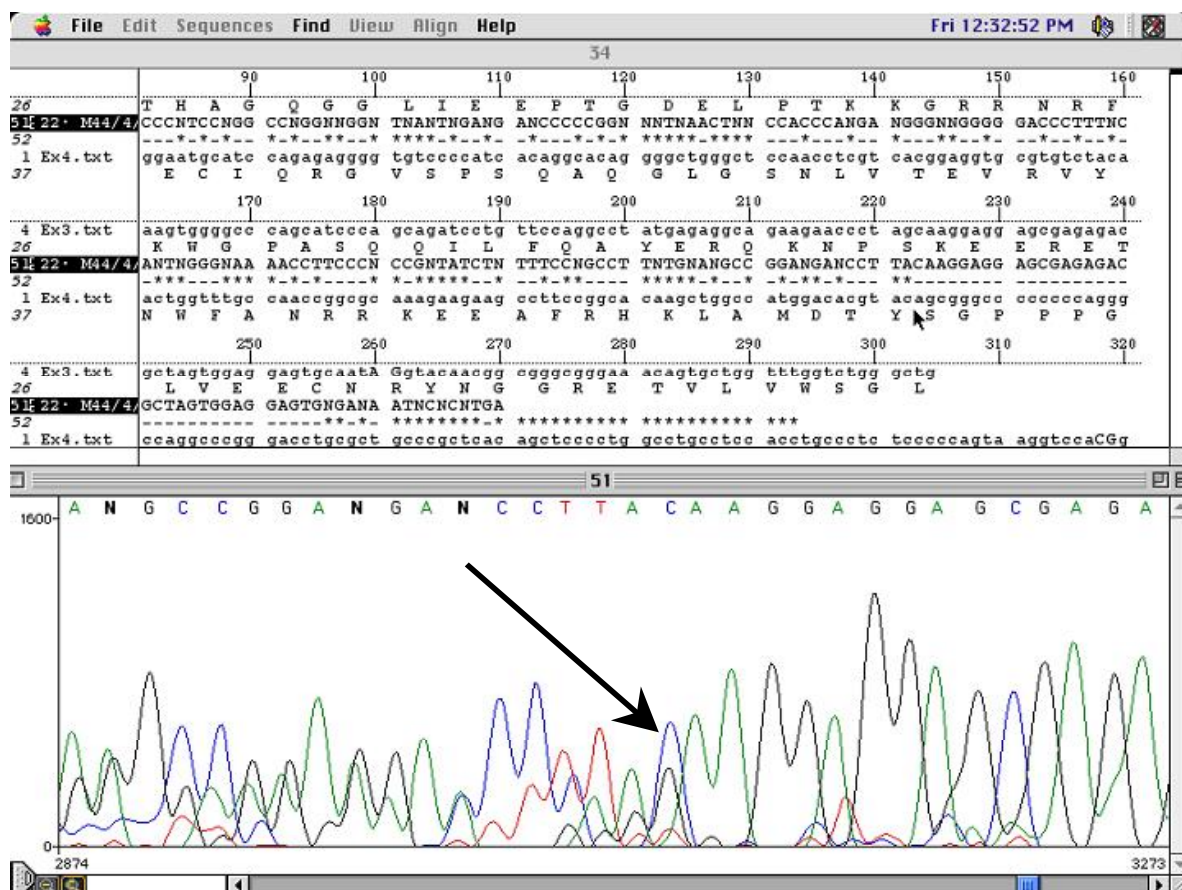
Ponadto zidentyfikowano także uprzednio opisywaną [63] zmianę promotora polegającą na duplikacji sekwencji TGGGGGT w pozycji -153 licząc od ATG, w obrębie sekwencji

(TGGGGGT)₂ występującą w populacji w populacji fińskiej zarówno chorych na cukrzycę, jak i zdrowych, z częstością < 1%. Mutacja ta stwierdzona w jednej z 50 rodzin (M034) nie segregowała z cukrzycą. Nie zmieniała ona także żadnego ze znanych miejsc przyłączania (*binding sites*). Ponadto w trakcie bezpośredniego sekwencjonowania stwierdzono uprzednio opisywane częste polimorfizmy genu HNF1 α , nie mające związku z cukrzycą.

Poszukiwanie wymienionych powyżej nowych mutacji Ser249Pro i Asn257Thr, a także opisanej uprzednio po raz pierwszy w populacji polskiej delecji Ser225fsdelC [52], w 100-osobowej grupie kontrolnej składającej się z osób bez cukrzycy dało negatywny rezultat.

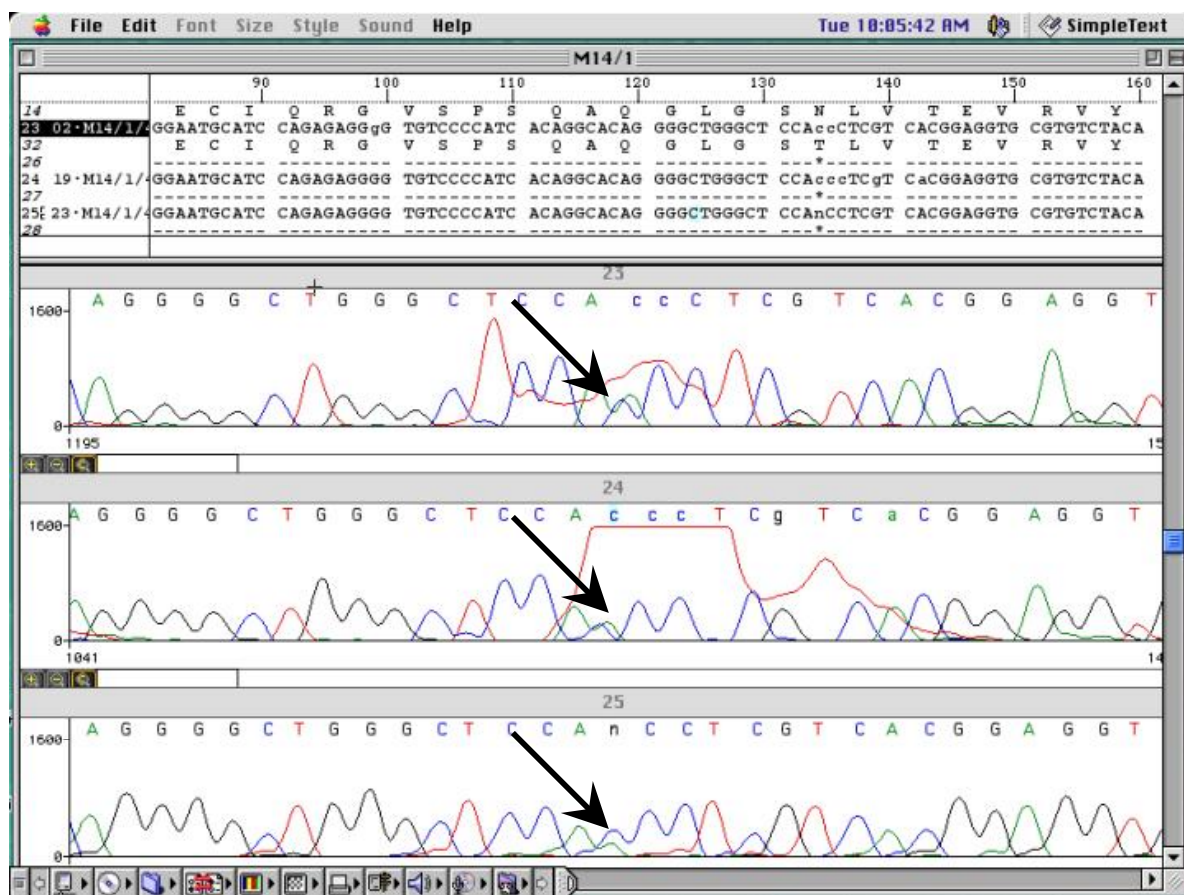
Wszystkie mutacje zmiany sensu, w tym dwie nowe, zlokalizowane były w ewolucyjnie konserwatywnych obszarach genu HNF1 α . W miejscach, w których stwierdzono mutacje u wszystkich analizowanych w niniejszej pracy sześciu gatunków kręgowców występowały takie same aminokwasy.

Rycina 4. Mutacja Ser225fsdelC u pacjenta M044-4. Wydruk z sekwenatora.



Rycina 5. Mutacja Ser249Pro u pacjenta M005-1. Wydruk z sekwenatora.

Rycina 6. Mutacja Asn257Thr u pacjenta M014-1. Wydruk z sekwenatora.



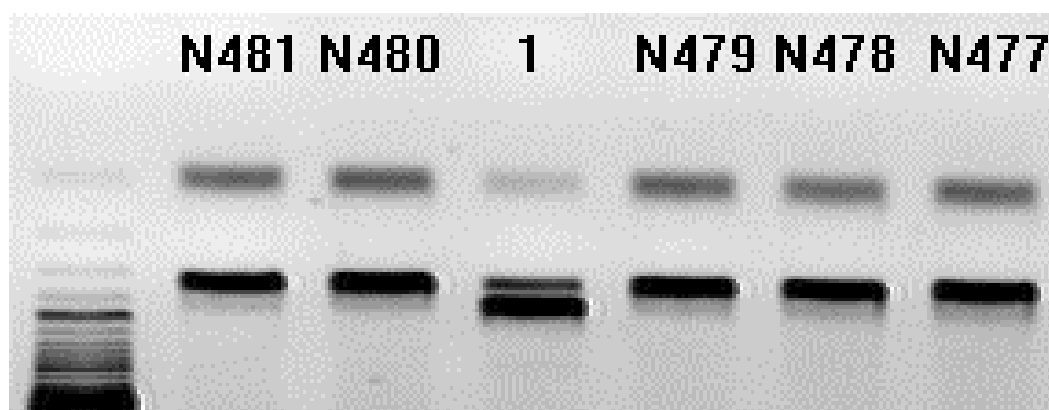
Rycina 7. Polimorfizm –153dup(TGGGGGT) u pacjenta M034-2. Wydruk z sekwenatora.

Rycina 8. Poszukiwanie mutacji Ser225fsdelC metodą RFLP. Numery poprzedzone literą N oznaczają osoby bez cukrzycy z grupy kontrolnej. Marker długości DNA co 100 bp.



Prążek o długości 126 bp odpowiada allelowi Ser, prążek o długości 154 bp odpowiada allelowi z delecją

Rycina 9. Poszukiwanie mutacji Ser249Pro metodą RFLP. Numery poprzedzone literą N oznaczają osoby bez cukrzycy z grupy kontrolnej. Marker długości DNA co 100 bp.



Prążek o długości 324 bp odpowiada allelowi Ser, prążek o długości 416 bp odpowiada allelowi Pro

Rycina 10. Poszukiwanie mutacji Asn257Thr metodą RFLP. Numery poprzedzone literą N oznaczają osoby bez cukrzycy z grupy kontrolnej. Marker długości DNA co 100 bp.

Prążek o długości 169 bp odpowiada allelowi Asn, prążek o długości 140 bp odpowiada allelowi Thr

Mutacja Arg131Gln jako jedyna została stwierdzona w dwóch rodzinach. Nie posiadają one na podstawie wywiadu wspólnych krewnych. Mutacja powstaje przez zamianę drugiej zasady kodonu G na A. Zlokalizowana jest w homeodomenie (POU-H), proksymalnej części domeny wiążącej DNA.

Mutacja Ser249Pro spowodowana jest tranzycją T na C w pierwszej pozycji kodonu, Asn257Thr transwersją A na C w drugiego nukleotydu kodonu, Arg263His wiązała się z zamianą G na A w drugiej pozycji kodonu, natomiast Arg271Trp powstaje przez tranzycję C na T w pierwszym nukleotydzie kodonu. Wymienione cztery mutacje zlokalizowane są w drugiej części domeny wiążącej DNA – POU-S.

Ostatnia z wykrytych mutacji zmian sensu Pro447Leu znajduje się w obrębie dużej domeny transaktywacyjnej, związana jest z tranzycją C na T w drugim nukleotydzie kodonu.

Mutacja nonsensowna Arg171X wynika ze zamiany kodonu CGA na TGA (opal). Kodon terminacyjny powstaje w obrębie domeny POU-H, zatem produkt zmutowanego genu pozbawiony jest większości domeny wiążącej DNA i całej domeny transaktywacyjnej.

Mutacja zmiany ramki odczytu związana z delecją cytozyny w kodonie 225 (AGC) prowadzi do powstania białka pozbawionego domen transaktywacyjnej i dystalnej części domeny POU-S. Analiza skutków delecji przy pomocy narzędzia *ORF Finder* ujawniła, że w skutek mutacji dochodzi do powstania siedmioaminokwasowej sekwencji nonsensownej Arg-Arg-Arg-Ser-Glu-Arg-Arg w pozycjach 225-231 i terminacji translacji kodonem TAG (amber) w pozycji 232.

Insercja cytozyny w obrębie tzw. „*poly-C tract*”, odpowiedzialna za mutację Pro291fsinsC w znaczący sposób zmienia domenę transaktywacyjną. Mutacja prowadzi do powstania produktu o długości 315 aminokwasów. Symulacja programem *ORF Finder* ujawniła sekwencję w pozycjach od 292 do 315: Arg-Ala-Arg-Pro-Gly-Thr-Cys-Ala-Ala-Arg-Ser-Gln-Leu-Pro-Trp-Pro-Ala-Ser-Thr-Cys-Pro-Leu-Pro-Gln. W pozycji 316 następuje kodon terminacyjny TAA (ochre).

Mutacja Pro379fsdelT powstaje przez delecję końcowej tyminy w zawierającej powtórzenia sekwencji (C)₅T(C)₆T, co prowadzi do powstania białka pozbawionego większej, dystalnej części

domeny transaktywacyjnej. W skutek mutacji w pozycjach od 380 do 382 powstaje sekwencja Ser-Ala-Pro, a w pozycji 383 ulega terminacji kodonem TGA (opal).

Mutacja intronowa, zmieniająca miejsce donorowe, IVS2nt+1G>A, zgodnie z symulacją wykonaną programem GENSCAN, prowadzi do pominięcia 10 aminokwasów (Val-Ala-Gln-Gln-Phe-Thr-His-Ala-Gly-Gln, pozycja 173-182), z których 5 (Gln-Gln-Phe-Thr oraz Ala) jest ewolucyjnie konserwatywnych. Aminokwasy te budują końcową część homeodomeny. Kolejna mutacja zmieniająca obróbkę mRNA, IVS7nt-6G>A, tworzy nowe miejsce akceptorowe w 7 intronie, co prowadzi do głębokich zaburzeń struktury produktu genu. W skutek mutacji ulega pominięciu 7 egzon, w połączenie między 6 i 8 egzonem wbudowane zostają 4 nukleotydy, co prowadzi do zmiany ramki odczytu i przedwczesnej terminacji translacji w pozycji 485. Produkt zmutowanego allelu pozbawiony jest zatem większej części domeny transaktywacyjnej.

W trzech rodzinach mutacja znajdowała się w 2 egzonie, u jednego probanta – w 3 egzonie, pięć innych mutacji wystąpiło w 4 egzonie, po jednej w 6 i 7. Dwie mutacje intronowe znajdowały się odpowiednio w proksymalnej części drugiego intronu i w dystalnej części siódmego. Większość mutacji zlokalizowana była w domenie wiążącej DNA: trzy w POU-H i sześć w POU-S. Trzy mutacje znajdowały się w domenie transaktywacyjnej. Nie stwierdzono mutacji domeny dimeryzacyjnej. Lokalizację mutacji w genie przedstawia Rycina 11.

Rycina 11. Lokalizacja mutacji HNF1 α wykrytych w badanych rodzinach

4.3. Wyniki analizy segregacji i znaczenie zidentyfikowanych mutacji genu HNF1 α

Przez segregację mutacji genu HNF1 α z cukrzycą MODY rozumiano obecność fenotypu choroby u ich nosicieli i jednoczesny brak cukrzycy u osób od nich wolnych.

W grupie 114 zgenotypowanych osób z 13 rodzin u 9 występowała cukrzyca przy nieobecności mutacji genu HNF1 α występującej w rodzinie. W rodzinie M016 osoba M016-5 miała zdiagnozowaną cukrzycę typu 1, która wystąpiła w 2. roku życia wśród ostrych objawów klinicznych. W rodzinie M028 u osoby M028-11 nie spokrewnionej z nosicielami mutacji miało miejsce rozpoznanie cukrzycy typu 1. Cukrzycę typu 2 stwierdzono u małżonków nosicieli z rodzin M014 i M018 (odpowiednio M014-4 i M018-3). Natomiast w rodzinie M006 nie stwierdzono mutacji u 2 chorych – matki i syna (M006-4 i M006-5), a w rodzinie M026 i M044 u jednej osoby (odpowiednio M026-4 i M044-9). Późniejszy wiek zachorowania niż u innych członków rodzin z potwierdzoną molekularnie MODY3 (odpowiednio 45, 33, 70 oraz 43 lata), przy średnim wieku zachorowania dla całej polskiej populacji MODY3 wynoszącym 23,8 lat oraz występowanie cech zespołu metabolicznego w postaci nadwagi, nadciśnienia tętniczego i dyslipidemii przemawia za rozpoznaniem u tych chorych typu 2 cukrzycy o złożonej patogenezie. Występująca w rodzinie M006 mutacja Pro379fsdelT i w M026 mutacja Pro447Leu były już opisywane jako związane z cukrzycą MODY3 w innych populacjach. W tych okolicznościach opisane 8 przypadków należy traktować jako fenokopie, co było już uprzednio opisywane w rodzinach z autosomalną dominującą cukrzycą o wczesnym początku.

Osobnego omówienia wymaga rodzina M019. U żadnego z rodziców (M019-5 i M019-6) probantki (M019-1) nie stwierdzono mutacji Arg271Trp. Badanie dziedziczenia 16 częstych polimorfizmów wymienionych w metodyce pracy nie pozwoliło na wykluczenie ojcostwa. Mamy więc najpewniej do czynienia z rzadko obserwowanym w rodzinach MODY zjawiskiem powstania mutacji *de novo*. Cukrzyca rozpoznana w wieku 73 lat u otyłej pacjentki M019-6 sprawia, że stanowi ona kolejną fenokopię.

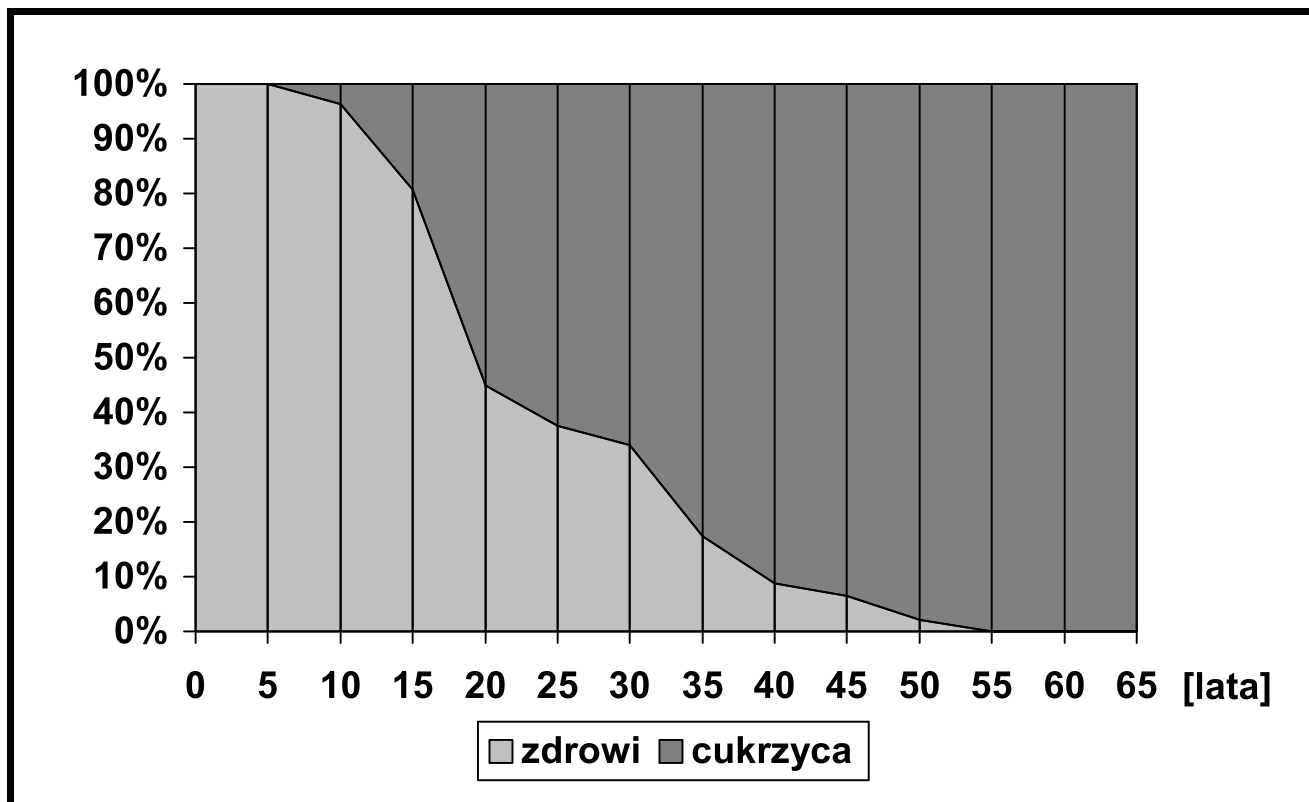
W wyniku poszukiwania mutacji u członków rodzin probantów zidentyfikowano 56 nosicieli, z czego 46 (82,1 %) chorowało na cukrzycę, a 10 (17,9 %) nie rozwinęło jej objawów. Wyniki poszukiwań mutacji przedstawia Tabela 9.

Tabela 9. Wyniki poszukiwania mutacji genu HNF1 α u członków 13 zidentyfikowanych rodzin.

Liczba rodzin MODY3	13
Liczba osób przebadanych w rodzinach	114
Liczba nosicieli mutacji	56
Średnia liczba nosicieli w rodzinie	4,3
Liczba nosicieli z cukrzycą	46
Liczba nosicieli bez cukrzycy	10
Liczba chorych na cukrzycę bez mutacji w HNF1 α	9

Średni wiek nie chorujących nosicieli wynosił 16,9 lat, przy średnim wieku zachorowania 23,8 lat w badanej grupie. Najstarsza osoba z tej grupy miała 34 lata. Dwie osoby miały ponad 20 lat, pozostałych 7 było w pierwszej lub drugiej dekadzie życia. Wśród nosicieli mutacji starszych niż 30 lat chorowało 96,7 %, wśród osób powyżej 20. roku życia – 93,3 %, natomiast powyżej 10 roku życia – 85,2 %. W badanej populacji przed 20. rokiem życia cukrzycę rozpoznano u 55,1 % nosicieli, przed 30. rokiem życia – u 66,0 %, a przed 40. rokiem życia – u 91,3 %. Proporcje chorujących na cukrzycę i zdrowych nosicieli w poszczególnych grupach wiekowych przedstawia Rycina 12.

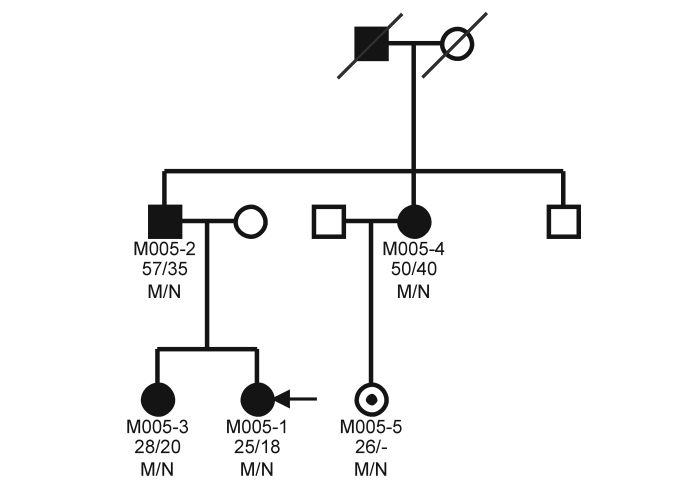
Rycina 12. Proporcje chorujących na cukrzycę i zdrowych nosicieli mutacji w genie $HNF1\alpha$ w poszczególnych grupach wiekowych. Wykres opracowano na podstawie wieku rozpoznania cukrzycy.



Rodowody rodzin z mutacjami genu $HNF1\alpha$ związanymi z MODY3

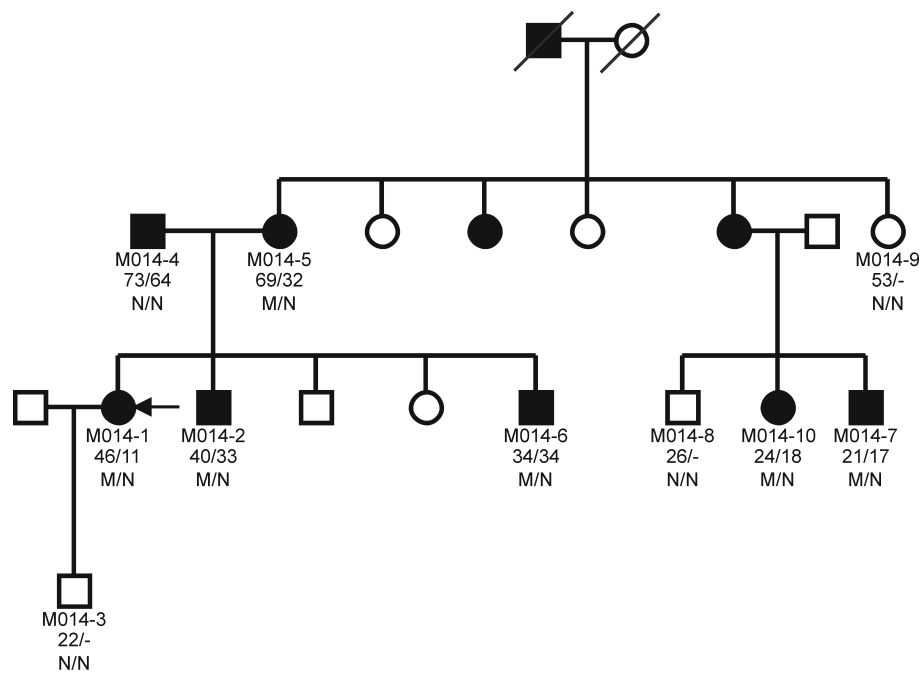
Pełne i puste symbole oznaczają odpowiednio osoby chore na cukrzycę i bez cukrzycy. Kropka wewnątrz symbolu wskazuje nosiciela mutacji nie chorującego na cukrzycę. Strzałka wyróżnia probanta. Osoby, które wzięły udział w badaniu opisane są w następujący sposób: w pierwszej linii znajduje się numer porządkowy z Polskiego Rejestru MODY, w drugiej linii podano aktualny wiek w trakcie badania i wiek rozpoznania cukrzycy (w latach), ostatnia linia zawiera genotyp: M – mutacja, N – prawidłowa sekwencja genu $HNF1\alpha$.

Rodzina M005. Mutacja Ser249Pro



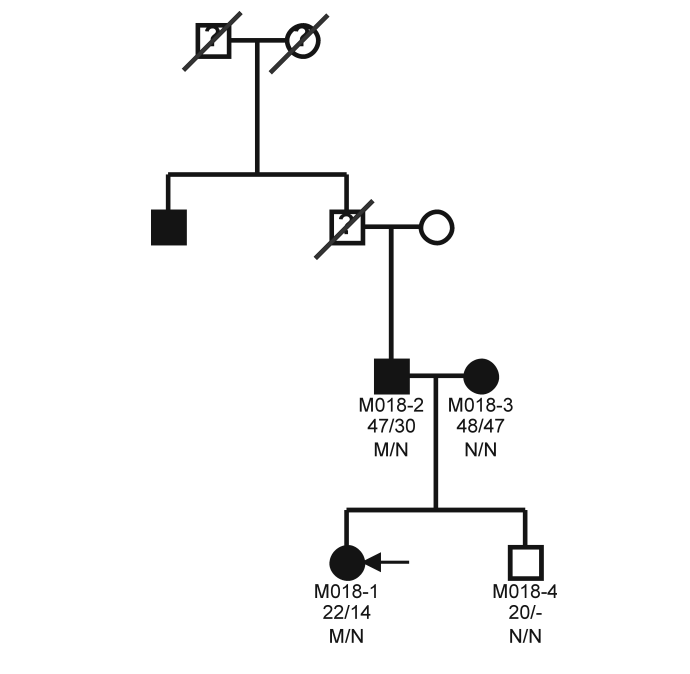
Rodzina M006. Mutacja Pro379fsdelT

Rodzina M014. Mutacja Asn257Thr



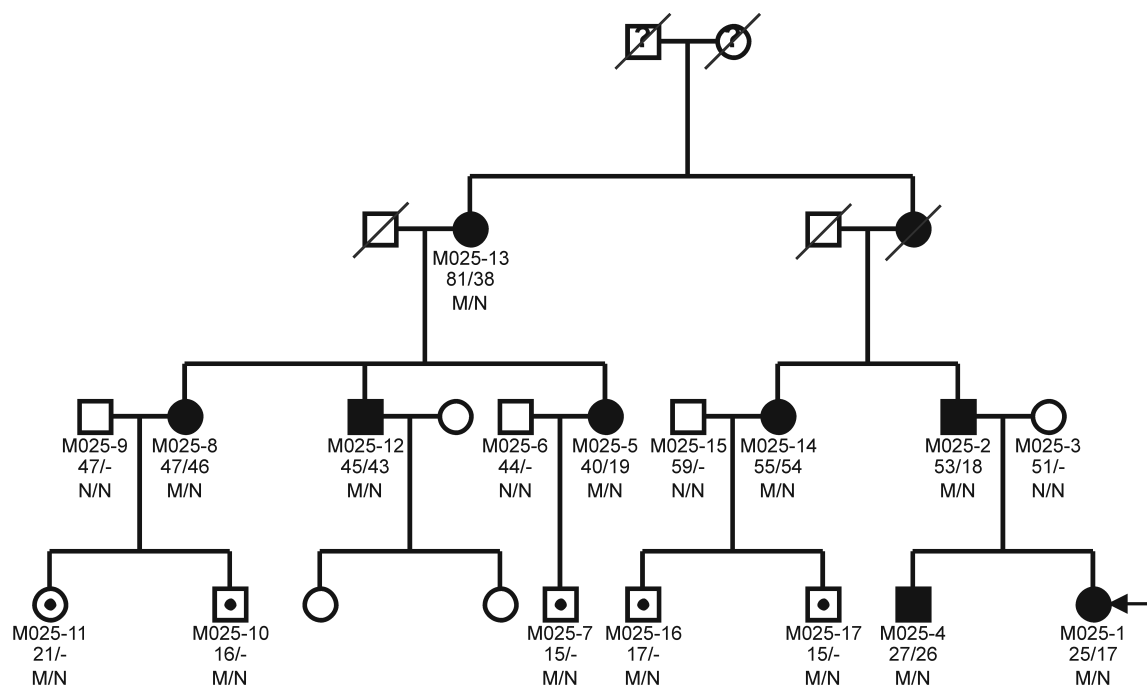
Rodzina M016. Mutacja IVS7nt-6G>A

Rodzina M018. Mutacja Arg131Gln



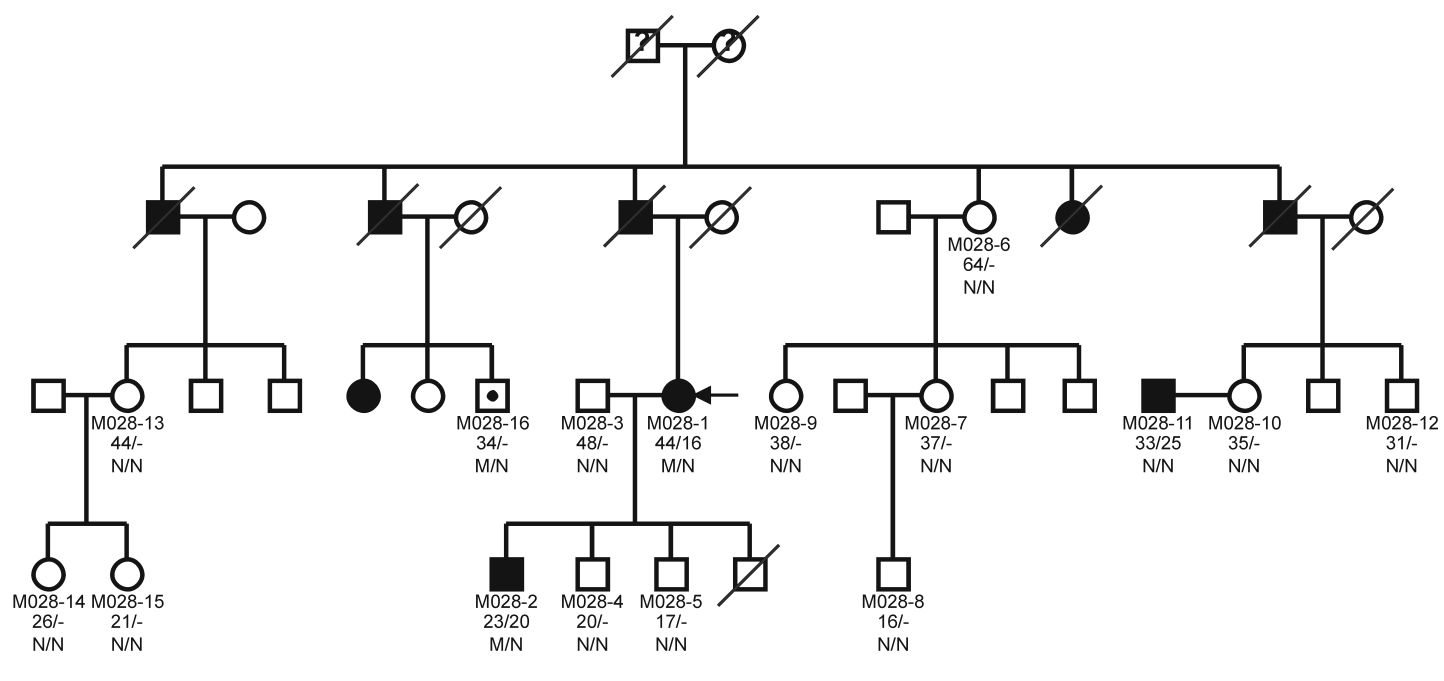
Rodzina M019. Mutacja Arg271Trp

Rodzina M025. Mutacja IVS2nt+1G>A



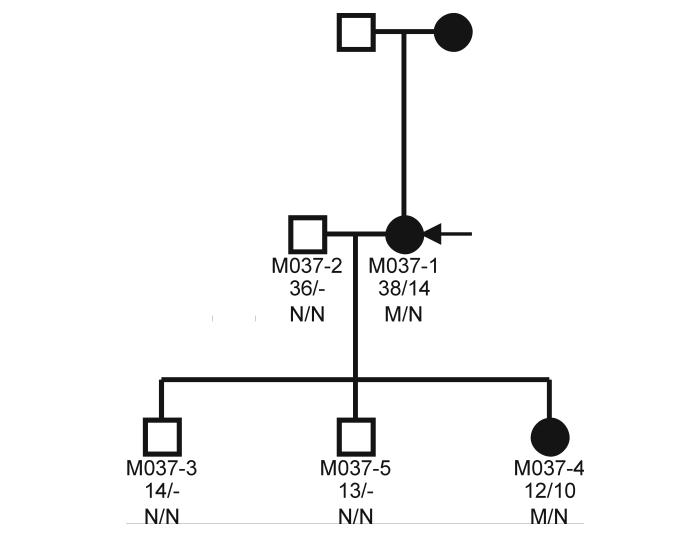
Rodzina M026. Mutacja Pro447Leu

Rodzina M028. Mutacja Arg131Gln



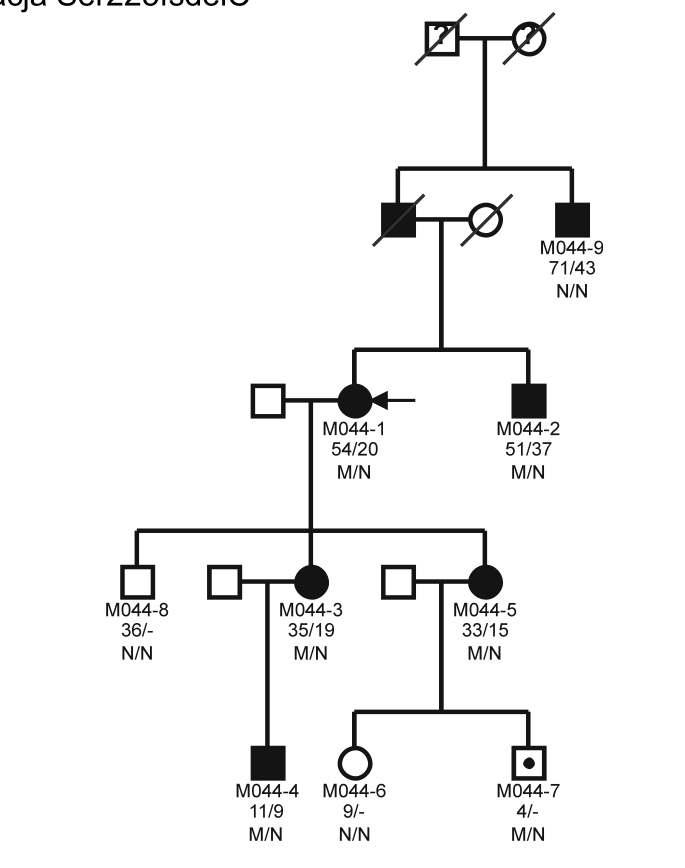
Rodzina M033. Mutacja Arg171X

Rodzina M037. Mutacja Pro291fsinsC



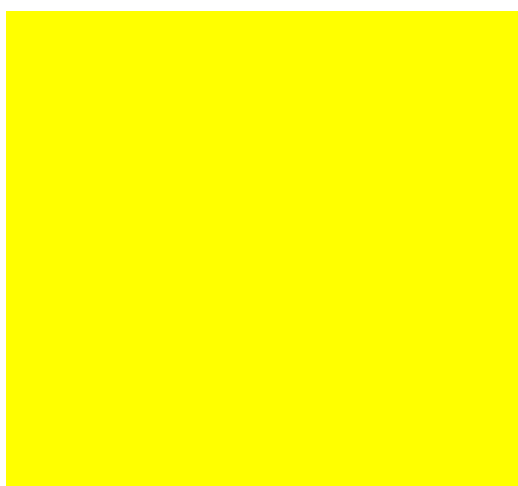
Rodzina M039. Mutacja Arg263His

Rodzina M044. Mutacja Ser225fsdelC



Rodowód rodziny M034 z insercją w 5'UTR: -153dup(TGGGGGT)

Pełne i puste symbole oznaczają odpowiednio osoby chore na cukrzycę i bez cukrzycy. Strzałka wyróżnia probanta. Osoby, które wzięły udział w badaniu opisane są w następujący sposób: w pierwszej linii znajduje się numer porządkowy z Polskiego Rejestru MODY, w drugiej linii podano aktualny wiek w trakcie badania i wiek rozpoznania cukrzycy (w latach), ostatnia linia zawiera genotyp: D – duplikacja, N – sekwencja genu *HNF1α* zgodna z sekwencją referencyjną.



4.4 Charakterystyka kliniczna nosicieli mutacji w genie HNF1 α

Zidentyfikowano 56 nosicieli mutacji genu HNF1 α , z czego 21 (37,5 %) stanowili mężczyźni. Średni wiek badanych wynosił 35,4 lat (od 3 do 81). Jak wspomniano w części dotyczącej analizy segregacji, u 10 nosicieli nie rozwinęła się cukrzyca – osoby te miały prawidłową wartość glikemii na czczo. Tylko troje z nich miało w momencie badania ponad 20 lat. Średni wiek rozpoznania cukrzycy wynosił 23,8 lat, mediana 20 lat. Objawy kliniczne cukrzycy wystąpiły najwcześniej u 9-letniego nosiciela mutacji Ser225fsdelC. U tego pacjenta dodatkowo stwierdzono otyłość, co mogło wpłynąć na wcześniejsze ujawnienie się MODY3. Najpóźniejszy wiek postawienia diagnozy w badanej grupie wynosił 54 lata. Do 30 roku życia zachorowało 70,8 % nosicieli. Najstarszy nosiciel mutacji (Arg131Gln), u którego nie wystąpiła cukrzyca miał 34 lata w momencie badania. Nie zaobserwowano nosicieli z nieprawidłową glikemią na czczo.

Średni wiek rozpoznania cukrzycy u chorych w wieku poniżej 30 lat w momencie włączenia do badania (n = 17) wynosił 16,3 lat, w grupie chorych w wieku od 30 do 49 lat (n = 16) średnia ta wynosiła 25,9 lat, a u pacjentów powyżej 50. roku życia (n = 13) średni wiek rozpoznania wynosił 31,1 lat. Znamienne różnice między średnimi stwierdzono pomiędzy pierwszą (najmłodszymi), a drugą i trzecią grupą wiekową (odpowiednio p=0,03 i p=0,0008). Różnica między średnimi 26,1 i 31,1 nie była znamienna. Istotną statystycznie różnicę między średnimi wieku rozpoznania (p=0,0002) stwierdzono między grupami osób w wieku do 40 roku życia (n = 23, średnia wynosi 17,7 lat) i ponad 40 lat (n = 23, średnia = 30,0 lat).

Do analizy cech klinicznych i biochemicznych zakwalifikowano nosicieli powyżej 16 roku życia (n = 50) wykluczając 2 osoby chore i 4 nie chorujące na cukrzycę. Średnia wieku w badanej grupie wynosiła 38,5 lat, proporcja kobiet do mężczyzn 33 / 17. W grupie tej znajdowało się 44 chorych na cukrzycę i 6 bezobjawowych nosicieli.

Wśród 50 osób z mutacjami, spośród cech zespołu metabolicznego nadciśnienie tętnicze występowało u 12 osób (24,0 %). U 11 osób (22,0 %) stwierdzono BMI przekraczające wartość 25, wśród nich była jedna osoba z BMI przekraczającym 30. Stosunek obwodu talii i bioder wyższy niż 0,8 występował u 10 kobiet (30,3 %), natomiast u mężczyzn wskaźnik ten o wartości

przekraczającej 0,9 wystąpił czterokrotnie (23,5 %). Triglicerydemia $> 1,7$ mmol/l występowała u 6 badanych (12 %), natomiast obniżone stężenie cholesterolu-HDL $< 1,0$ mmol/l u mężczyzn i 1,3 mmol/l u kobiet występowało u 9 (18 %) osób. U 25 badanych (50 %) stężenie cholesterolu całkowitego przekraczało 4,5 mmol/l, w tym u 20 przekraczało 5,0 mmol/l. U żadnej osoby w momencie kwalifikacji do badania nie stosowano leczenia hipolipemizującego. Rozpoznanie choroby niedokrwiennej serca postawiono u 4 osób (8 %).

Porównując grupę 44 chorych na cukrzycę MODY3 z sześcioma zdrowymi nosicielami mutacji genu HNF1 α , stwierdzono znamienne statystycznie różnice pomiędzy średnimi stężeniami glukozy na czczo ($p=0,0009$) i odsetka hemoglobiny glikowanej ($p=0,000001$), co wynika z samej definicji cukrzycy, oraz średnimi wiekiem ($p=0,004$). Grupy te nie różniły się wynikami pomiarów antropometrycznych (wskaźnik BMI, obwód pasa, wskaźnik WHR), a także poziomem peptydu C na czczo. Stwierdzono natomiast znamienne różnice w parametrach gospodarki lipidowej: stężeniu cholesterolu całkowitego ($p=0,000002$), cholesterolu LDL ($p=0,001$), HDL ($p=0,02$) i triglicerydów ($p=0,04$). Powyższe dane przedstawiono w Tabeli 10.

Wśród 44 chorych na cukrzycę u 21 (47,7 %) osób zdiagnozowano zmiany na dnie oczu związane z retinopatią cukrzycową. Średni czas trwania choroby u pacjentów z retinopatią wynosił 24,3 lat, u chorych bez retinopatii wynosił 8,7 lat ($p<0,0001$). Średni odsetek hemoglobiny glikowanej wynosił 8,0 % i był wyższy niż u pacjentów bez retinopatii (6,9 % $p=0,04$). U 7 pacjentów z retinopatią wykonywano zabiegi laserowe. W tej grupie średni czas trwania cukrzycy wynosił 26,1 lat, natomiast średni odsetek hemoglobiny glikowanej – 7,9 %.

Częstość nefropatii cukrzycowej wynosiła 25,0 % (11 pacjentów). U siedmiu z nich stwierdzono mikroalbuminurię. Trzech kolejnych chorych, poza białkomoczem, wykazywało podwyższone wartości kreatyniny (98,1 – 143,5 mmol/l). Jeden pacjent był dializowany z powodu schyłkowej niewydolności nerek. Czas trwania cukrzycy w grupie z nefropatią wynosił średnio 20,2 lat w porównaniu z 14,8 lat w grupie pacjentów bez tego powikłania ($p=0,2$). Średni odsetek hemoglobiny glikowanej wynosił odpowiednio 8,2 % i 7,3 % ($p=0,1$). Brak znamienności

statystycznej przy poziomie istotności 5% jest najpewniej związany ze zbyt małą liczbą chorych z nefropatią cukrzycową.

U dwóch chorych stwierdzono zespół stopy cukrzycowej. U kobiety M016-1 rozwinęła się osteoartropatia Charcota oraz zakażone owrzodzenie stopy. Występowała u niej również retinopatia proliferacyjna i mikroalbuminuria. U mężczyzny M025-2 doszło do konieczności amputacji kończyny dolnej na poziomie uda w związku z zespołem stopy cukrzycowej o charakterze mieszanym, naczyniowo – neuropatycznym. Pacjent ten miał również retinopatię proliferacyjną i schyłkową niewydolność nerek..

23 chorych (52,3 %) leczonych było przy pomocy insuliny w monoterapii lub modelu skojarzonym, u pozostałych chorych stosowano leki doustne. Dwóch pacjentów w czasie włączenia do badania nie stosowało leczenia hipoglikemizującego. Chorzy leczeni insuliną częściej ($p=0,02$) mieli retinopatię cukrzycową (70,0 %) niż pozostali chorzy (29,2 %). Różnica w częstości nefropatii cukrzycowej nie była statystycznie znamienna (odpowiednio 40,0 % i 12,5 %, $p=0,08$). Pacjenci leczeni insuliną nie różnili się znamiennie wiekiem rozpoznania cukrzycy od pozostałych (średnie odpowiednio 22,2 i 26,5 lat, $p=0,2$), byli natomiast starsi (odpowiednio 45,1 i 37,1 lat, $p=0,02$) i dłużej chorowali (odpowiednio 22,9 i 10,6 lat $p=0,0004$). Nie stwierdzono istotnych różnic między średnimi odsetkami hemoglobiny glikowanej i BMI (odpowiednio 7,7 i 7,3 %, $p=0,6$ oraz 23,9 i 22,3, $p=0,1$). Chorzy leczeni insuliną mieli natomiast niższe stężenie peptydu C (1,18 w porównaniu z 1,61 ng/ml, $p=0,008$).

W Tabeli 10 podsumowano charakterystykę kliniczną pacjentów z MODY3.

Tabela 10. Charakterystyka kliniczna nosicieli mutacji w genie HNF1 α .

Cecha	Chorzy (n=44)	Nosiciele bez cukrzycy (n=6)
Odsetek kobiet [%]	70,5	33,3
Wiek w momencie badania [lata]: średnia; SD	40,7** ; 16,0	22,0** ; 6,3
Wiek rozpoznania cukrzycy [lata]: średnia; SD	24,5; 10,9	Nie dotyczy
Czas trwania cukrzycy [lata]: średnia; SD	16,2; 12,7	Nie dotyczy
Insulinoterapia [%]	52,3	Nie dotyczy
Retinopatia [%]	47,7	Nie dotyczy
Nefropatia [%]	25,0	Nie dotyczy
Nadciśnienie [%]	27,3	0,0
Choroba niedokrwienna serca [%]	9,1	0,0
BMI [kg/m ²]: średnia; SD	23,0; 3,2	20,8; 1,4
WHR: średnia; SD	0,83; 0,08	0,79; 0,05
Obwód pasa [cm]: średnia; SD	78,5; 12,8	71,0; 7,9
Glukoza na czczo [mmol/l]: średnia; SD	7,8*** ; 3,1	4,4*** ; 0,7
HbA _{1c} [%]:średnia; SD	7,5*** ; 1,8	5,6*** ; 0,2
Peptyd C na czczo [ng/ml]: średnia; SD	1,45; 0,47	1,5; 0,5
Cholesterol całkowity [mmol/l]: średnia; SD	5,0*** ; 1,1	3,3*** ; 0,4
Cholesterol LDL [mmol/l]: średnia; SD	2,9** ; 0,9	1,6** ; 0,4
Cholesterol HDL [mmol/l]: średnia; SD	1,6* ; 0,5	1,3* ; 0,2
Triglicerydy [mmol/l]: średnia; SD	1,2* ; 0,7	0,7* ; 0,2

SD – odchylenie standardowe, BMI – indeks masy ciała, WHR – wskaźnik talia / biodra. Pogrubionym drukiem oznaczono parametry, których różnice były znamienne.

* - $p \in (0,05; 0,01]$, ** - $p \in (0,01; 0,001]$, *** - $p < 0,001$.

Tabela 11. Porównanie parametrów klinicznych kobiet i mężczyzn chorujących na cukrzycę MODY3.

Cecha	Kobiety (n=31)	Mężczyźni (n=13)
Wiek w momencie badania [lata]: średnia; SD	41,7; 17,0	38,5; 16,3
Wiek rozpoznania cukrzycy [lata]: średnia; SD	23,7; 11,5	26,6; 9,1
Czas trwania cukrzycy [lata]: średnia; SD	18,0; 12,8	11,8; 11,2
Insulinoterapia [%]	54,8	46,2
Retinopatia [%]	48,4	46,2
Nefropatia [%]	16,1	46,2
Nadciśnienie [%]	25,8	30,8
Choroba niedokrwienna serca [%]	12,9	0,0
BMI [kg/m ²]: średnia; SD	22,8; 3,4	23,5; 2,5
WHR: średnia; SD	0,81**; 0,06	0,91**; 0,07
Obwód pasa [cm]: średnia; SD	73,7***; 9,6	92,1***; 10,8
Glukoza na czczo [mmol/l]: średnia; SD	7,7; 3,2	8,1; 2,6
HbA _{1c} [%]:średnia; SD	7,3; 1,6	8,2; 2,2
Peptyd C na czczo [ng/ml]: średnia; SD	1,42; 0,45	1,53; 0,52
Cholesterol całkowity [mmol/l]: średnia; SD	5,0; 1,2	5,2; 0,7
Cholesterol LDL [mmol/l]: średnia; SD	2,9; 1,0	3,1; 0,7
Cholesterol HDL [mmol/l]: średnia; SD	1,7; 0,4	1,5; 0,6
Triglicerydy [mmol/l]: średnia; SD	1,1; 0,6	1,4; 0,7

SD – odchylenie standardowe, BMI – indeks masy ciała, WHR – wskaźnik talia / biodra. Pogrubionym drukiem oznaczono parametry, których różnice były znamienne.

* - $p \in (0,05; 0,01]$, ** - $p \in (0,01; 0,001]$, *** - $p < 0,001$.

Populacja kobiet z MODY3 różniła się od mężczyzn wynikami pomiarów antropometrycznych, co wynika z konstytucjonalnych różnic budowy. Kobiety były niższe ($p < 0,0000004$), miały mniejszą masę ciała ($p = 0,0003$), obwód talii ($p = 0,00009$) i bioder ($p = 0,006$). Różniły się także współczynnikiem WHR ($p = 0,007$). Nie stwierdzono natomiast znamiennej różnicy we współczynniku BMI. Podobnie, nie stwierdzono również znamiennych różnic w wieku, wieku rozpoznania cukrzycy, czasie trwania choroby, stężeniu lipidów, glukozy na czczo, peptydu C i odsetku hemoglobiny glikowanej. Kobiety nie różniły się istotnie od mężczyzn także częstością retinopatii cukrzycowej, nefropatii, nadciśnienia tętniczego i choroby niedokrwiennej serca. Powyższe dane przedstawiono w Tabeli 11.

W porównaniu z grupą pacjentów cierpiących na typową, uwarunkowaną wieloczynnikowo cukrzycę typu 2, dobranych pod względem płci oraz czasu trwania choroby ($n = 38$), osoby chorujące na MODY3 różniły się zarówno parametrami biochemicznymi, jak i klinicznymi. Pacjenci z cukrzycą typu 2 mieli znacznie wyższy wskaźnik BMI ($p = 7 \times 10^{-12}$), charakteryzowali się także brzuszny typem otyłości, o czym świadczy wskaźnik WHR ($p = 0,001$), przyjmujący większe, bardziej niekorzystne wartości w porównaniu z grupą z MODY3, a także obwód pasa ($p = 0,03$). Obie grupy nie różniły się pod względem poziomu glukozy na czczo ($p = 0,6$) i hemoglobiny glikowanej ($p = 0,06$). Poziom peptydu C był wyższy w grupie chorych z cukrzycą typu 2 ($p = 0,001$), nawet pomimo znacznie rzadszego stosowania pochodnych sulfonylomocznika w farmakoterapii cukrzycy u tych chorych. Dominującym lekiem doustnym w tej grupie była metformina, natomiast częstość stosowania insulinoterapii była w obu grupach podobna ($p = 0,6$). Nie stwierdzono różnic w częstości występowania mikronaczyniowych powikłań cukrzycy. Chorzy z cukrzycą typu 2 charakteryzowali się natomiast wyższą częstością choroby niedokrwiennej serca ($p = 0,007$). Znacznie częstsze w tej grupie było również nadciśnienie tętnicze ($p = 0,004$). W zakresie parametrów gospodarki lipidowej chorzy z cukrzycą typu 2 charakteryzowali się znamienne wyższym poziomem triglicerydów ($p = 0,00001$) i niższym poziomem HDL-cholesterolu ($p = 0,003$). Nie stwierdzono znamiennych różnic między średnimi stężenia cholesterolu całkowitego ($p = 0,4$) i LDL-cholesterolu ($p = 0,7$). Podkreślić jednak należy, że około 60% pacjentów z cukrzycą typu 2

przyjmowała leki hipolipemizujące, tymczasem u żadnego chorego na cukrzycę MODY3 lub nosiciela mutacji nie stosowano farmakoterapii dyslipidemii. Wyniki porównania grupy chorych z cukrzycą typu 2 z pacjentami MODY3 zebrano w Tabeli 12.

Tabela 12. Porównanie parametrów klinicznych i biochemicznych pacjentów z mutacjami MODY3 i grupy chorych z cukrzycą typu 2. Porównywane grupy liczyły po 38 osób.

Cecha	Cukrzyca typu 2	MODY3	Wartość p
Odsetek kobiet [%]	65,8	65,8	Nie dotyczy
Czas trwania cukrzycy [lata]: średnia; SD	12,8; 10,2	12,9; 10,2	Nie dotyczy
Wiek rozpoznania cukrzycy [lata]: średnia; SD	46,6; 8,5	24,7; 11,2	0,0000004
Wiek w momencie badania [lata]: średnia; SD	59,4; 10,9	37,6; 14,3	0,0000005
Insulinoterapia [%]	63,2	47,4	0,6 *
Retinopatia [%]	28,1	39,5	0,6 *
Nefropatia [%]	21,6	23,7	0,9 *
Nadciśnienie [%]	94,4	26,3	0,004
Choroba niedokrwienna serca [%]	43,3	5,3	0,007
BMI [kg/m ²]: średnia; SD	35,1; 7,8	22,5; 2,8	7×10⁻¹²
WHR: średnia; SD	0,92; 0,07	0,83; 0,08	0,001
Obwód pasa [cm]: średnia; SD	112,8; 15,0	78,0; 12,5	0,03
Glukoza na czczo [mmol/l]: średnia; SD	7,5; 2,1	7,9; 3,0	0,7 *
HbA _{1c} [%]:średnia; SD	8,2; 1,8	7,5; 1,8	0,06 *
Peptyd C na czczo [ng/ml]: średnia; SD	2,68; 1,70	1,50; 0,48	0,001
Cholesterol całkowity [mmol/l]: średnia; SD	5,3; 1,4	5,0; 1,0	0,4 *
Cholesterol LDL [mmol/l]: średnia; SD	3,0; 1,4	2,9; 0,9	0,7 *
Cholesterol HDL [mmol/l]: średnia; SD	1,2; 0,3	1,6; 0,5	0,003
Triglicerydy [mmol/l]: średnia; SD	2,3; 1,4	1,1; 0,6	0,00001

* – brak znamienności statystycznej, SD – odchylenie standardowe, BMI – indeks masy ciała, WHR – wskaźnik talia / biodra. Pogrubionym drukiem zaznaczono wartości p < 0,05.

W celu przeanalizowania wzajemnego wpływu poszczególnych parametrów zastosowano metodę regresji logistycznej. W konstrukcji modelu wzięto pod uwagę cechy wykazujące znamienne statystycznie różnice między grupami. Stabilny model, w którym różnice między chorymi z cukrzycą MODY i cukrzycą typu 2 były statystycznie znamienne ($p=0,02$, $R^2=0,86$) obejmował wiek w momencie badania, BMI oraz poziom peptydu C na czczo, przy czym istotne statystycznie różnice dotyczyły jedynie BMI ($p=0,02$). Po wyłączeniu BMI, różnice wieku i poziomu peptydu C były znamienne statystycznie (odpowiednio $p=0,001$ i $p=0,02$) przy $R^2=0,66$. Oba te parametry nie były jednak predyktorami niezależnymi od BMI.

Porównanie 50 nosicieli mutacji genu $HNF1\alpha$ powyżej 16. roku życia z grupą kontrolną składającą się z ochotników z prawidłową glikemią na czczo, przyporządkowaną pod względem płci i wieku w stosunku 1:1 wykazało znamienne statystycznie różnice w zakresie BMI oraz poziomu peptydu C. Analizę tę podsumowano w Tabeli 13. Grupy nie różniły się częstością nadciśnienia tętniczego i choroby niedokrwiennej serca. Nie stwierdzono także różnic pomiędzy średnimi parametrów gospodarki lipidowej, a także obwodów pasa i WHR. Średni BMI w grupie MODY3 był znamienne niższy i wynosił 22,8, natomiast w grupie kontrolnej – 24,3 ($p=0,02$). Nie stwierdzono natomiast istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami w częstości BMI przekraczającego 25 ($n=20$, 40,0 %, $p=0,08$) i 30 ($n=7$, 14,0 %, $p=0,06$). Poziom peptydu C w grupie MODY3 wynosił średnio 1,46 ng/ml i był niższy niż w grupie kontrolnej ($p=0,002$), gdzie wynosił 2,05 ng/ml. Istotna statystycznie różnica ($p=0,0000002$) w średnim stężeniu glukozy na czczo była oczywista, zważywszy, iż porównywano osoby z prawidłową glikemią i grupę, której większość stanowiły osoby chorujące na cukrzycę. Wykluczenie z analizy 6 nosicieli mutacji $HNF1\alpha$ nie chorujących na cukrzycę i odpowiadających im ochotników z grupy kontrolnej nie wpłynęło na wyniki analizy.

Tabela 13. Porównanie parametrów klinicznych i biochemicznych osób z mutacjami MODY3 i grupy ochotników z prawidłową glikemią na czczo. Porównywane grupy liczyły po 50 osób.

Cecha	Bez cukrzycy	MODY3	Wartość p
Odsetek kobiet [%]	66,0	66,0	Nie dotyczy
Wiek w momencie badania [lata]: średnia; SD	38,4; 16,3	38,5; 17,1	Nie dotyczy
Nadciśnienie [%]	10,0	24,0	0,1 *
Choroba niedokrwienna serca [%]	4,0	8,0	0,7 *
BMI [kg/m ²]: średnia; SD	24,3; 4,6	22,8; 3,1	0,02
WHR: średnia; SD	0,82; 0,10	0,83; 0,08	0,4 *
Obwód pasa [cm]: średnia; SD	80,5; 13,6	77,3; 12,4	0,06 *
Glukoza na czczo [mmol/l]: średnia; SD	7,3; 3,1	4,6; 0,5	0,0000002
Peptyd C na czczo [ng/ml]: średnia; SD	2,05; 0,89	1,46; 0,47	0,002
Cholesterol całkowity [mmol/l]: średnia; SD	4,8; 1,0	4,8; 1,2	0,7 *
Cholesterol LDL [mmol/l]: średnia; SD	2,7; 0,9	2,8; 1,0	0,5 *
Cholesterol HDL [mmol/l]: średnia; SD	1,6; 0,4	1,6; 0,4	0,7 *
Triglicerydy [mmol/l]: średnia; SD	1,1; 0,6	1,1; 0,6	0,9 *

* – brak znamienności statystycznej, SD – odchylenie standardowe, BMI – indeks masy ciała, WHR – wskaźnik talia / biodra. Pogrubionym drukiem zaznaczono wartości $p < 0,05$.

W celu ustalenia wpływu różnicy BMI między pacjentami MODY3 a grupą kontrolną na poziom peptydu C przeprowadzono analizę metodą regresji logistycznej uwzględniając wielkości, których różnice były statystycznie istotne. Model obejmujący stężenie glukozy na czczo, BMI oraz stężenie peptydu C w sposób statystycznie istotny ($p=0,002$) różnicował grupę MODY3 i grupę kontrolną przy $R^2=0,70$. BMI w modelu utraciło znamienność statystyczną przy p dla stężenia peptydu C i glukozy odpowiednio 0,02 i 0,0004. Różnice indeksów masy ciała były znamienne statystycznie po wyłączeniu z modelu poziomu peptydu C ($p=0,009$), ale nie po wyłączeniu stężenia glukozy ($p=0,8$).

Analiza wieloczynnikowa przeprowadzona we wszystkich trzech badanych grupach, obejmująca predyktory ciągłe: BMI, wiek w momencie badania, stężenie HDL-cholesterolu, triglicerydów oraz predyktory jakościowe: obecność i typ cukrzycy, płeć, rozpoznanie nadciśnienia tętniczego i choroby niedokrwiennej serca wykazała związek poziomu peptydu C z BMI ($p=3\times 10^{-10}$) oraz z obecnością i typem cukrzycy ($p=0,04$). Obliczenia przy użyciu modelu obejmującego czas trwania cukrzycy, BMI, płeć, odsetek hemoglobiny glikowanej, stężenia HDL-cholesterolu i triglicerydów, oraz rozpoznanie nadciśnienia tętniczego i choroby niedokrwiennej serca, przeprowadzone w samej grupie chorych z MODY3 wykazały znamiennej statystycznie związek poziomu peptydu C z czasem trwania cukrzycy ($p=0,04$), ale nie z BMI, natomiast zastąpienie czasu trwania cukrzycy wiekiem w momencie badania lub wiekiem rozpoznania cukrzycy spowodowało utratę istotności statystycznej. Podobna analiza stężenia HDL-cholesterolu i triglicerydów, obejmująca wszystkie trzy badane grupy, gdzie wśród wymienionych wcześniej predyktorów ciągłych znalazło się również stężenie peptydu C na czczo, wykazała, że niezależnymi predyktorami dla poziomu HDL-cholesterolu były: wiek ($p=0,05$) i stężenie triglicerydów ($p=0,0004$), natomiast dla stężenia triglicerydów niezależnymi predyktorami były wiek ($p=0,006$), stężenie HDL-cholesterolu ($p=0,0004$) oraz obecność i typ cukrzycy ($p=0,0007$). Z kolei analiza statystyczna czynników związanych z otyłością, w której zmienną zależną był wskaźnik BMI, przeprowadzona łącznie w trzech badanych grupach, wykazała istotny statystycznie związek z następującymi niezależnymi predyktorami: poziomem peptydu C na czczo ($p=2\times 10^{-16}$) i wiekiem ($p=3\times 10^{-10}$), a także predyktorami jakościowymi określającymi obecność i typ cukrzycy ($p=6\times 10^{-9}$) oraz występowanie choroby niedokrwiennej serca ($p=0,03$). Diagnoza nadciśnienia tętniczego była jednak w tym modelu predyktorem o nieznamiennym związku z BMI ($p=0,06$). Obliczenia dokonane metodą regresji logistycznej (dla modelu $p=0,02$, $R^2=0,70$) wykazały, że niezależnymi czynnikami ryzyka nadciśnienia tętniczego były: obecność i typ cukrzycy ($p=0,01$), BMI ($p=0,009$) oraz stężenie triglicerydów ($p=0,03$). Analogiczne obliczenia dotyczące choroby niedokrwiennej serca nie pozwoliły na stworzenie modelu wykazującego statystyczną znamienność, najpewniej z powodu zbyt małej częstości występowania

choroby w stosunku do liczebności badanych grup. Najlepszym predyktorem choroby niedokrwiennej serca okazał się wiek pacjentów ($p=0,01$).

4.5 Wady rozwojowe nerek u nosicieli mutacji HNF1 α

W trzech rodzinach MODY3 na podstawie ankiet, odstępniej dokumentacji medycznej oraz badań obrazowych wykazano obecność zaburzeń rozwojowych nerek.

Pierwszą rodziną, w której zidentyfikowano osobę z zaburzeniami rozwojowymi nerek i mutacją powodującą cukrzycę MODY jest rodowód M014. U 23-letniej pacjentki (M014-8) z dwuletnim wywiadem cukrzycowym w dokumentacji medycznej znaleziono informację o prawostronnej nefrektomii wykonanej w roku 1994 z powodu hipoplazji i związanych z nią nawracających ciężkich infekcji. W obecnie wykonanym badaniu USG potwierdzono stan po usunięciu prawej nerki oraz obecność przerośniętej kompensacyjnie lewej nerki. U innych badanych osób z tej rodziny nie stwierdzono cech zaburzeń rozwojowych układu moczowego.

Ponadto u probanta z rodziny M016 z mutacją IVS7nt-6G>A, kobiety lat 31 obecna była agenezja lewej nerki. Po raz pierwszy została ona udokumentowana w roku 1993 podczas ultrasonografii, a następnie potwierdzona w tym samym okresie przez badanie urograficzne. U pacjentki zdiagnozowano cukrzycę w wieku lat 17. Do okresu włączenia do obecnego badania rozwinęła retinopatię proliferacyjną, masywną proteinurię oraz zespół stopy cukrzycowej. W badaniu ginekologicznym stwierdzono u niej zaburzenia rozwojowe układu płciowego (dwurożna macica). Pomimo zaburzeń rozwojowych i powikłań cukrzycy w roku 2004 kobieta urodziła córkę z niską masą urodzeniową, poza tym jednak zdrową. W rodzinie M016 zidentyfikowano jeszcze czterech nosicieli mutacji, w tym wspomniane dziecko pacjentki, które w kilkunastu pomiarach miało prawidłowe wartości glikemii. Pozostali nosiciele mutacji IVS7nt-6G>A w tej rodzinie byli chorzy na cukrzycę. U wszystkich przeprowadzono badanie ultrasonograficzne jamy brzusznej. U brata kobiety będącej probantem (osoba M016-4) opisano położoną ektopowo w miednicy lewą nerkę, która miała cechy dysmorficzne i hypoplastyczne (wymiary 96 × 40 mm). U pozostałych nosicieli mutacji w tej rodzinie nie stwierdzono w badaniu ultrasonograficznym zaburzeń rozwojowych nerek.

Wady rozwojowe stwierdzono także w rodzinie M019. Zidentyfikowano w niej jedynie dwóch nosicieli mutacji Arg271Trp: matkę i córkę (osoby M019-1 i M019-3). U córki (M019-3),

która rozwinęła cukrzycę w wieku lat 15 zdiagnozowano agenezję prawej nerki w roku 2000 w badaniu ultrasonograficznym. Diagnozę tą potwierdzono wówczas badaniem urograficznym oraz scyntygraficznym, których wyniki były dostępne w dokumentacji medycznej. Ponadto u jej matki, probanta tej rodziny, wykazano w USG obecność licznych drobnych cyst w prawej nerce. Największa z nich miała wymiar 27×31 mm. U innych członków tej rodziny nie wykazano wrodzonych zaburzeń rozwojowych nerek.

W pozostałych rodzinach wywiad ankietowy, dokumentacja medyczna oraz przeprowadzane badania nie wykazały agenezji nerek, torbieli ani innych wrodzonych anomalii. Tak więc różnego stopnia zaburzenia rozwojowe stwierdzono w 3 rodzinach MODY3, co stanowiło prawie jedną czwartą wszystkich zidentyfikowanych rodzin. Odsetek nosicieli mutacji z opisanymi anomaliami wynosił 8,9 % (5 / 56 osób).

5. DYSKUSJA

Niniejsza rozprawa doktorska stanowi kompleksowy projekt naukowy związany z cukrzycą MODY w Polsce, który obejmował kilka etapów. Po pierwsze, przeprowadzono rekrutację rodzin z autosomalną dominującą cukrzycą o wczesnym początku do badań przesiewowych w kierunku MODY3 w ramach tworzonego Polskiego Rejestru Rodzin MODY. Kolejne części projektu obejmowały poszukiwanie i charakterystykę mutacji genu *HNF1 α* (MODY3) u probantów rodzin włączonych do badania, połączone z analizą ich segregacji z cukrzycą. Następny etap stanowiło opracowanie charakterystyki klinicznej nosicieli mutacji genu *HNF1 α* obejmujące między innymi ocenę przewlekłych powikłań choroby oraz poszukiwanie wad rozwojowych nerek. Mimo faktu, że badania nad molekularnym podłożem cukrzycy MODY trwają na świecie od około 15 lat niniejszy projekt stanowi pierwsze w naszym kraju systematyczne badanie naukowe na tym polu. Na przełomie poprzedniej dekady w Katedrze i Klinice Chorób Metabolicznych CMUJ w Krakowie przeprowadzono niewielki pilotażowy projekt zakończony identyfikacją zaledwie jednej niewielkiej rodziny z mutacją w genie *HNF1 α* [52]. Rodzina ta obejmowała jedynie 4 nosicieli mutacji w badanym genie. Warto w tym miejscu zestawić powyższą liczbę z 56 nosicielami opisanymi w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej. Doświadczenie z tamtego badania zostały uwzględnione w fazie projektowania niniejszej pracy, co znalazło swoje odzwierciedlenie w obniżeniu progu dla wieku zachorowania na cukrzycę w rodzinie z 35 lat do 30 lat oraz wprowadzeniu klinicznego kryterium niezależności od insuliny. Należy ponadto stwierdzić, że pomimo faktu, iż niniejsze badanie ze względów logistycznych i finansowych koncentrowało się na regionie Małopolski, poczynione obserwacje i wyciągnięte wnioski można próbować uogólnić na homogeną etnicznie i genetycznie populację polską. Tego rodzaju podejście zastosowano w poniżej przeprowadzonej dyskusji.

Pierwszym z wyznaczonych celów projektu była rekrutacja rodzin do badania w kierunku cukrzycy MODY. Warto w tym miejscu wyjaśnić przyczynę, dla której postępowanie rekrutacyjne stało się jednym z formalnych celów pracy. Po pierwsze, w przeciwieństwie do szeregu innych badań o charakterze genetycznym rekrutacja rodzin spełniających kryteria cukrzycy MODY toczyła

się równolegle z innymi procedurami badawczymi stanowiącymi cele projektu. Po drugie, należy wziąć pod uwagę złożoność kryteriów rekrutacyjnych, które odnoszą się zarówno do pojedynczych osób jak i całych rodzin. Obejmują one sposób dziedziczenia choroby w rodzinie oraz różne elementy jej obrazu klinicznego, na przykład wiek zachorowania i zależność od insuliny. Właściwe ustalenie wspomnianych kryteriów oraz poprawne przeprowadzenie rekrutacji skutkujące włączeniem odpowiednich rodzin stanowi niezbędny element sukcesu badań nad cukrzycą MODY. Powyższe fakty stanowią uzasadnienie umieszczenia omawianego punktu w celach badania oraz przedstawienie charakterystyki włączonych do pracy rodzin w rozdziale wyników. Należy zaznaczyć, że jest to podejście dość powszechne stosowane w pracach oryginalnych dotyczących podłoża molekularnego cukrzycy mono- i wielogenowej [64, 65]. Wynikiem pracy rekrutacyjnej włożonej w niniejsze badanie jest powstanie znaczącej liczebnie w wymiarze międzynarodowym kolekcji rodzin MODY. Można ją zestawzić z kolekcją zgromadzoną przez Prof. Andrzeja Krolewskiego w Sekcji Genetyki i Epidemiologii Joslin Diabetes Center w Bostonie, USA, która obejmuje podobną liczbę rodzin MODY i jedynie nieznacznie większą liczbę zidentyfikowanych nosicieli mutacji genu $HNF1\alpha$ [66]. W Europie kilkakrotnie większy zbiór rodzin został zgromadzony przez prof. Andrew Hattersleya z Peninsula Medical School z Exeter w Wielkiej Brytanii, jednak warto zaznaczyć, że wspomniany ośrodek ma charakter centrum koordynacyjnego w badaniach nad MODY nie tylko dla Wielkiej Brytanii, ale także znacznej części Europy [23, 34, 40, 66]. Inny, liczący się, duży zbiór rodzin został zebrany we Francji [20, 61, 68, 69]. Wielkość Polskiego Rejestru Rodzin z Cukrzycą MODY jest natomiast porównywalna z podobnymi kolekcjami zgromadzonymi w Czechach oraz Norwegii [70, 71].

We wspomnianych powyżej grupach oraz kilku innych zbiorach rodzin z cukrzycą MODY prowadzono w czasie ostatniej dekady systematyczne badania przesiewowe w kierunku mutacji w kolejno odkrywanych genach odpowiedzialnych za cukrzycę MODY. Warto zaznaczyć, że poszczególni badacze posługiwali się różnymi kryteriami włączając kolejne rodziny do badań nad cukrzycą MODY. Niewątpliwie skutkowało to, obok rzeczywistych różnic genetycznych, odmiennymi proporcjami poszczególnych form MODY w opisywanych populacjach. Dla przykładu

grupa francuska gromadziła rodziny, w których cukrzyca występowała w co najmniej dwóch pokoleniach, dziedziczyła się autosomalnie dominująco, a u minimum dwóch osób z cukrzycą klinicznie niezależną od insuliny chorobę zdiagnozowano przed 25 rokiem życia [23, 68, 69]. Zbliżone, choć nieco bardziej liberalne, kryterium diagnostyczne stosowane jest przez grupę Brytyjczyków kierowanych przez Hattersleya [23, 34, 67]. Wymagają oni bowiem jednej osoby zdiagnozowanej przed 25 rokiem życia. Grupa badawcza kierowana przez prof. Andrzeja Krolewskiego włączała do swojej kolekcji rodziny z cukrzycą autosomalną dominującą niezależną od insuliny występującą w 3 kolejnych pokoleniach, w których probant oraz co najmniej jeden jego krewny pierwszego stopnia miał cukrzycę niezależną od insuliny rozpoznaną przed 35 rokiem życia [30, 66]. Właśnie te ostatnie kryteria stanowiły podstawę do przeprowadzenia niniejszego badania, jednak biorąc pod uwagę wyniki cytowanego wcześniej polskiego badania pilotażowego zaostrożono kryterium wiekowe rozpoznania cukrzycy u dwóch osób z rodziny obniżając je do 30 lat [52].

Warto zwrócić uwagę, że poszczególne ośrodki różniły się w swoim postępowaniu rekrutacyjnym sposobem docierania do rodzin z autosomalną dominującą cukrzycą o wczesnym początku. Grupa francuska swoje działania opierała w znacznym stopniu na apelach kierowanych poprzez media [22]. Brytyjczycy prowadzili i nadal prowadzą kampanię informacyjną wśród lekarzy opiekujących się chorymi na cukrzycę [23, 34, 67]. W Joslin Diabetes Center docierano do pacjentów poprzez informację wizualną umieszczoną w poradniach wyspecjalizowanych ośrodków diabetologicznych. Po uzyskaniu wstępnej informacji dotyczącej poszczególnych rodzin rekrutacja była prowadzona przez wyspecjalizowane osoby zatrudnione w sekcji [65, 66]. Rekrutacja prowadzona w ramach niniejszej pracy doktorskiej była prowadzona, jak to zostało wspomniane w części dotyczącej metodyki, poprzez informację przekazywaną lekarzom diabetologom w trakcie zjazdów, konferencji i szkoleń podyplomowych. Nie prowadzono w ramach działań rekrutacyjnych akcji informacyjnej kierowanej bezpośrednio do chorych, jak to miało miejsce w koordynowanych przez Katedrę i Klinikę Chorób Metabolicznych badaniach niektórych innych form monogenowych cukrzycy [72].

Opisane w dwóch powyższych paragrafach odmienności w kryteriach rekrutacyjnych rodzin z cukrzycą MODY oraz w sposobie prowadzenia rekrutacji przyczyniły się do różnic w częstości mutacji w poszczególnych genach MODY, w pierwszym rzędzie dwóch najczęstszych: glukokinazie (MODY2) i HNF1 α (MODY3). W populacji francuskiej dominowała liczebnie postać MODY2 związana z glukokinazą, gdzie stanowiła ona około 50 % wszystkich rodzin MODY [73, 74]. Nie można wykluczyć, że jedną z przyczyn był sposób rekrutacji odwołujący się bezpośrednio do pacjentów. Wydaje się, że zaowocować to mogło wzbogaceniem tej grupy w rodziny ze stosunkowo łagodną formą cukrzycy. Odmienne, w grupie brytyjskiej MODY najczęściej związana była z mutacjami w genie HNF1 α (MODY3) stanowiącymi do około 70 % całości [67]. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że co prawda w szeregu innych populacji forma MODY3 była częsta, to w żadnej nie osiągnęła tak znacznego odsetka, jak w populacji brytyjskiej, gdzie wyraźnie przekroczyła połowę zgromadzonej kolekcji. Powyższa uwaga odnosi się na przykład do badań niemieckich [75, 76], norweskich [71], hiszpańskich [77] oraz chińskich [78]. W badaniu rodzin z Joslin Diabetes Center odsetek rodzin z MODY wynosił około 20% [67]. Należy zauważyć, że wynik dotyczący odsetka rodzin z cukrzycą MODY3 uzyskany w niniejszej rozprawie doktorskiej jest bardzo zbliżony do opisanych w populacji francuskiej, [69] a także hiszpańskiej [77].

Innym ważnym aspektem niniejszego badania była charakterystyka mutacji w genie HNF1 α związanych z rozwojem cukrzycy MODY w populacji polskiej. Warto podsumować wyniki w kontekście rodzaju mutacji oraz ich lokalizacji w odniesieniu do poszczególnych egzonów genu i domen funkcjonalnych białka. Najczęstszy charakter mutacji odnotowany w omawianych polskich rodzinach MODY3 to zmiana sensu, czyli podstawienie jednego aminokwasu przez inny. Taki charakter zmian był obecny w 7 rodzinach, co stanowiło ponad połowę wszystkich mutacji genu HNF1 α . Większość z nich była uprzednio opisana, niemniej jednak dwie z nich, Ser249Pro i Asn257Thr, zostały zaobserwowane po raz pierwszy. Za patogennym charakterem nowych mutacji przemawia po pierwsze segregacja w rodzinach, w których zostały odnotowane, po drugie brak ich występowania w grupie 100 kontroli (200 chromosomów) z populacji polskiej, po trzecie

konserwatywność miejsc aminokwasowych, których dotyczyły. Mutacje zmiany sensu występowały raczej w proksymalnej części genu, w domenie odpowiedzialnej za łączenie z DNA (Arg131Gln obecna w dwóch rodzinach oraz Arg263His, Arg271Trp, Ser249Pro, Asn257Thr). Warto zauważyć, że jest to zgodne z wcześniejszymi obserwacjami. W dużej analizie wszystkich opublikowanych mutacji genu Ellard i Colclough podsumowali, że wśród 413 rodzin MODY3 stanowiły one 52,6 % [54]. Mutacje zmiany sensu w innych grupach etnicznych także lokalizowały się raczej przy N-końcu białka, natomiast zmiany o charakterze przesunięcia ramki odczytu w jego bardziej dystalnych częściach. Tych ostatnich w opisywanym polskim materiale było około 23 % (3 mutacje- Ser225fsdelC, Pro291fsinsC, Pro379fsdelT). We wspomnianym podsumowaniu obejmującym różne populacje [54] insercje / delecje stanowiły 24,2 %, a więc były zbliżone do uzyskanych w niniejszej rozprawie doktorskiej. Wszystkie mutacje zmiany ramki odczytu były wcześniej wykrywane w innych populacjach. Ciekawą obserwację stanowi fakt, iż mutacja w miejscu aminokwasowym 291 w tzw. *hot-spot* zlokalizowanym w szeregu siedmiu cytozyn była obecna tylko w jednej rodzinie. Stanowi to dość wyraźny kontrast z obserwacjami z innych populacji, gdzie stanowiły one do 25% wszystkich rodzin z mutacjami w genie MODY3 [67, 75, 79]. Listę odnotowanych mutacji uzupełnia jedna mutacja nonsensowna (Arg171X) oraz dwie mutacje zmieniające miejsca wycinania intronów (IVS2nt+1G>A i IVS7nt-6G>A), wszystkie trzy już uprzednio opisywane [34, 71, 80]. Trzeba powiedzieć, że w kilku uprzednich publikacjach analizujących duże grupy chorych nie udało się znaleźć związku między lokalizacją mutacji odnoszoną do poszczególnych egzonów lub domen funkcjonalnych a fenotypem cukrzycy MODY, w tym z wiekiem rozpoznania choroby. Dopiero niedawno udało się zidentyfikować związek między lokalizacją mutacji odnoszoną do trzech opisywanych izoform genu, HNF1 α (A),(B) i (C), a wiekiem zachorowania u nosicieli mutacji [44]. U osób, które miały mutacje zmiany sensu upośledzające funkcję jedynie największej formy HNF1 α (A), cukrzyca rozpoznawana była w nieco późniejszym wieku niż u nosicieli mutacji w bardziej proksymalnych lokalizacjach (25 lat vs 18 lat). Na podstawie lokalizacji mutacji zmiany sensu w opisywanej polskiej grupie można przewidywać, że upośledzały one funkcję wszystkich trzech izoform HNF1 α u człowieka. Taka

sytuacja uniemożliwia próbę potwierdzenia wcześniejszych obserwacji w niniejszej rozprawie doktorskiej. W badanej grupie mutacje najczęściej występowały w egzonie 2 i 4 (odpowiednio trzykrotnie i pięciokrotnie), co w sumie dało około 61 % wszystkich różnic sekwencji związanych z cukrzycą w niniejszej pracy doktorskiej. Powyższa obserwacja jest zgodna z ostatnio podsumowaniem obejmującym wszystkie publikacje na temat MODY3 do roku 2006 [54].

Analizując rolę poszczególnych mutacji genu $HNF1\alpha$ w powstawaniu cukrzycy MODY3 w populacji polskiej warto zastanowić się nad siłą dowodu naukowego sugerującego związek przyczynowo-skutkowy między opisywanymi powyżej zmianami sekwencji genu a fenotypem cukrzycy w opisanych rodzinach. Generalnie istnieje kilka rodzajów argumentów, które wykorzystuje się w tego rodzaju analizach. Po pierwsze ocenia się, czy dana mutacja segreguje się z cukrzycą (lub inną chorobą) w badanych rodzinach. Po drugie bada się, czy występuje ona w dużej grupie niespokrewnionych osób bez choroby. Po trzecie, ważnym argumentem jest analiza konserwatywności zmian, stopnia ingerencji w strukturę aminokwasową białka czy też sekwencję promotora. Po czwarte, jest pożądaną, aby w badaniach funkcjonalnych ocenić jej znaczenie biologiczne [7, 10, 11, 14, 15, 81]. Ten ostatni punkt jest jednak wykonywany jedynie w niektórych projektach i nie ma charakteru rutynowego. Oczywistymi argumentami przemawiającymi za przyczynową rolą danej mutacji jest jej segregacja z chorobą, na przykład z cukrzycą MODY, w rodzinie, niewystępowanie w grupie kontrolnej, zmiana konserwatywnego aminokwasu oraz upośledzenie funkcji białka powstającego w jej wyniku.

Przed przystąpieniem do szczegółowej analizy skutków poszczególnych mutacji należy wspomnieć o mechanizmach prowadzących do ich powstania. Większość z opisanych w niniejszej pracy zmian w sekwencji nukleotydów genu $HNF1\alpha$ powstała w obrębie miejsc o zwiększonej podatności na mutagenezę. Częstym mechanizmem mutacji jest dezaminacja metylocytozyny w obrębie dinukleotydów CpG do tyminy, co skutkuje tranzycją C na T lub G na A. W tym mechanizmie mogły powstać cztery mutacje zmiany sensu (Arg131Gln, Arg262His, Arg271Trp i Pro447Leu), a także mutacja nonsensowna Arg171X. Dinukleotydy CpG występują również w miejscach powstania obu mutacji intronowych. Kolejnymi sekwencjami podatnymi

na mutagenezę są powtórzenia. W takich miejscach powstały mutacje zmiany ramki odczytu Pro291fsinsC i Pro379fsdelT [54].

Przystępując do analizy poszczególnych mutacji warto rozpocząć od stwierdzenia faktu, iż 10 z nich było już wcześniej opublikowanych i uprzednio prowadzone badania dostarczyły dowodów naukowych na ich rolę w powstawaniu cukrzycy u ludzi. W grupie tych mutacji odrębną jakość stanowi mutacja Pro291fsinsC, którą do chwili obecnej opisano w ponad 60 rodzinach MODY [54]. Wkrótce po opisanie genu HNF1 α jako częstej przyczyny cukrzycy MODY kilka grup niezależnie odnotowało znaczną częstość występowania wspomnianej mutacji w zgromadzonych rodzinach [67, 75, 79]. Analiza dodatkowych polimorfizmów intronowych w siedmiu rodzinach brytyjskich i trzech niemieckich dowiodła, że nie były one związane z efektem założyciela [67, 75]. Co więcej w dwóch rodzinach wykazano spontaniczny (*de novo*) charakter insercji Pro291fsinsC [79, 82]. W niektórych publikacjach odsetek ten osiągał około jednej czwartej całości, co z kolei zachęciło niektórych do opracowywania szybkich metod przesiewowych ukierunkowanych wybiórczo na wspomnianą mutację [83]. Najbardziej prawdopodobną przyczyną występowania mutacji w tym właśnie miejscu aminokwasowym jest duplikacja (lub rzadziej delecja) jednej pary w szeregu cytozyn w wyniku błędów polimerazy DNA w widelkach replikacyjnych. Podjęto także trud wykonywania badań funkcjonalnych mających na celu opisanie patomechanizmów z nią związanych. W modelu sztucznych hybryd genowych (tzw. *reporter gene*) wykazano, że funkcjonalne własności białek różnią się dramatycznie od prawidłowej proteiny. Badania te koncentrowały się też na odpowiedzi na pytanie, czy mutacja ta związana jest z mechanizmem negatywnym dominującym czy też jedyną przyczyną rozwoju objawów chorobowych jest niedobór prawidłowego białka kodowanego przez jeden z alleli u każdego z nosicieli (tzw. *haploinsufficiency*) [54, 84, 85]. Mechanizm dominujący w przypadku białka HNF1 α potencjalnie wiązać się miał z łączeniem nieprawidłowego produktu genu (posiadającego jednak prawidłowe domeny dimeryzacyjną i wiążącą DNA) z prawidłową proteiną w homo- lub heterodimery. Ostateczną odpowiedź przyniosły badania stabilności mRNA powstałego w wyniku transkrypcji zmutowanego genu, które wykazały jego przyspieszoną degradację, co w zasadzie

wykluczyło mechanizm dominujący negatywny opisywanej mutacji [86]. Warto zaznaczyć, że badania funkcjonalne przeprowadzano także w odniesieniu do innych mutacji zmiany sensu, przesunięcia ramki odczytu, czy też nonsensownych zidentyfikowanych w niniejszym badaniu. Wykazywały one bądź to upośledzenie łączenia białka z DNA bądź też upośledzenie funkcji transaktywacyjnej. Dotyczy to następujących mutacji: Arg131Gln, Arg171X, Arg271Trp, Pro447Leu [80, 85]. Dla trzech pierwszych z wymienionych mutacji udowodniono ponadto upośledzoną translokację do jądra komórkowego wskutek uszkodzenia sekwencji sygnału lokalizacji jądrowej [71]. Brak jest danych dotyczących badań funkcjonalnych opublikowanych wcześniej mutacji: Arg263His, Sre225fsdelC, Pro379fsdelT. Istnieją natomiast badania funkcjonalne innych mutacji obejmujących pozycje aminokwasowe 263 i 379 (Arg263Cys i Pro379fsdelCT). Ich skutkiem jest odpowiednio upośledzenie wiązania z DNA i uszkodzenie sygnału lokalizacji jądrowej obejmującego pozycje aminokwasowe 441 – 474, a także w obu przypadkach upośledzenie aktywności transaktywacyjnej. Za patogennym charakterem wspomnianych trzech mutacji, a także dwóch nowych, przemawiają w sposób jednoznaczny charakter zmiany w strukturze aminokwasowej białka, segregacja z cukrzycą w rodzinach, w których zostały opisane, brak występowania w grupie kontrolnej i ewolucyjny konserwatyzm reszt aminokwasowych.

W ramach prac związanych w niniejszą rozprawą doktorską zidentyfikowano dwie mutacje zmieniające miejsca łączenia: IVS2nt+1G>A i IVS7nt-6G>A. Mutacja IVS2nt+1G>A zmieniała konserwatywną zasadę w intronie 2 i segregowała się z cukrzycą w rodzinie brytyjskiej [34]. Substytucja IVS7nt-6G>A była dodatkowo analizowana na poziomie mRNA, gdzie potwierdzono wypadanie egzonu 7 [80]. Na zakończenie paragrafu dotyczącego charakteru mutacji w genie HNF1 α w populacji polskiej trzeba jeszcze raz wspomnieć, iż jedna z mutacji, Arg271Trp w rodzinie M019, miała charakter spontaniczny. Jest to dopiero trzecia mutacja *de novo* odnosząca się do genu MODY3 [79, 82], a pierwsza o charakterze zmiany sensu. Warto zauważyć, że identyfikacja wspomnianej mutacji w rodzinie M019 miała po części przypadkowy charakter, ponieważ o kwalifikacji tej rodziny do Polskiego Rejestru Rodzin MODY zadecydowała obecność

w trzecim pokoleniu cukrzycy u osoby, która ostatecznie okazała się być fenokopią (osoba M019-6). Można pokusić się o formułowanie wniosku, iż ilość mutacji spontanicznych w cukrzycy MODY3 może być niedoszacowana w związku z preferencyjnym kwalifikowaniem do badań rodzin o wielopokoleniowym wywiadzie chorobowym.

Analizując obraz kliniczny cukrzycy MODY3 w populacji polskiej warto zwrócić uwagę na wysoki stopień penetracji u nosicieli mutacji. Prawie wszyscy nosiciele mutacji genu $HNF1\alpha$ w momencie badania powyżej 30. roku życia chorowali już na cukrzycę. Tak więc mutacja genu MODY3 niemal jednoznacznie determinowała zachorowanie na cukrzycę, co jest zgodne z doniesieniami z innych populacji [87, 88, 89]. Niemniej analiza zamieszczonych w niniejszej rozprawie doktorskiej rodowodów pokazuje, iż nawet między nosicielami takich samych mutacji w jednej rodzinie istnieją różnice dotyczące na przykład wieku diagnozy oraz sposobu leczenia. Jedną z przyczyn może być wcześniejsze wykrywanie cukrzycy w młodszych pokoleniach w stosunku do generacji ich rodziców czy dziadków. Wyjaśnić to może efektywniejsze wykrywanie cukrzycy przez współczesną medycynę a także świadomość choroby w rodzinach, w których wielu jej członków jest przez nią dotkniętych. Warto zastanowić się, co jeszcze może powodować takie różnice kliniczne. Wydaje się, że fenotyp cukrzycy MODY3 podlega wpływom zarówno środowiska, na przykład warunkom wewnątrzmacicznym, otyłości, siedzącemu trybowi życia, oraz czynników dziedzicznych, które modyfikują efekt mutacji $HNF1\alpha$. [88, 89].

Szereg elementów klinicznych obrazu cukrzycy MODY3 w populacji polskiej stanowi potwierdzenie opisów z innych grup etnicznych. Warto zwrócić uwagę na pewne odrębności oraz nowe elementy charakterystyki. Po pierwsze, mimo tego, iż generalnie większość grupy nosicieli mutacji genu $HNF1\alpha$ nie była otyła i nie miała cech zespołu metabolicznego, to jednak u około jednej czwartej grupy skojarzenie tego rodzaju elementów z cukrzycą MODY3 miało miejsce. Dotyczy to na przykład częstości nadciśnienia, nadwagi oraz podwyższonych wskaźników talia / biodro. Warto zaznaczyć, że uprzednio publikowane doniesienia dotyczące pojedynczych przypadków klinicznych dowiodło, że nawet kiedy cukrzyca MODY3 towarzyszy otyłość, to powinna być ona leczona pochodną sulfonilomocznika [90]. Po drugie, wysokie poziomy

hemoglobiny glikowanej, konieczność stosowania farmakoterapii wszystkich nosicieli z cukrzycą MODY3 oraz częste występowanie powikłań naczyniowych dowodzą, iż mutacje w genie HNF1 α w populacji polskiej wiążą się ze stosunkowo ciężkim fenotypem choroby. W opisanej grupie 46 przypadków cukrzycy MODY3 jedynie dwie osoby nie stosowały farmakoterapii z powodu nie wyrażenia zgody na podjęcie leczenia. Tymczasem w doniesieniach z innych grup etnicznych odsetek pacjentów leczonych wyłącznie dietetycznie sięgał około jednej trzeciej całości [11, 91]. Wątek przewlekłych powikłań choroby był stosunkowo rzadko podejmowaną w dotychczas opublikowanych pracach dotyczących MODY3 kwestią. Kompleksowe badania ukierunkowane na opisanie związku między cukrzycą uwarunkowaną mutacjami w genie HNF1 α a powikłaniami naczyniowymi pochodzą głównie z populacji francuskiej i fińskiej [45, 91]. Właśnie to badanie jest dobrym punktem odniesienia w kontekście poszukiwania przewlekłych powikłań w cukrzycy MODY3, bowiem była to grupa zbliżona liczebnie, o podobnym poziomie HbA_{1c} i średnim czasie trwania choroby. Ponadto badanie fińskie przeprowadzono na grupie chorych z udokumentowanymi mutacjami genu, podczas gry w badaniu francuskim kryterium włączenia do badania była obecność sprzężenia na chromosomie 12q. Częstość retinopatii w opisywanej polskiej grupie dotyczyła blisko połowy nosicieli mutacji genu HNF1 α z cukrzycą. Wcześniej równie wysoką częstość tego groźnego powikłania odnotowano w populacji fińskiej [91]. Częstość nefropatii wydaje się być w rodzinach polskich (około trzydzieści procent) nieco większa niż w badaniu fińskim (19%).

Interesujące wyniki przyniosło porównanie obrazu klinicznego pacjentów z cukrzycą MODY 3 i złożoną wielogenową cukrzycą typu 2. Część z udokumentowanych różnic w zasadzie wynika z definicji cukrzycy MODY i jest zgodna z oczekiwaniami. Dotyczy to na przykład masy ciała, obwodów pasa, czy też wskaźników talia / biodro. Podobnie niższy poziom peptydu C w grupie nosicieli mutacji genu HNF1 α potwierdza nieco inną patogenezę cukrzycy w obu grupach, z dominującym defektem wydzielania insuliny w MODY3 [92, 93]. Brak różnic w wyrównaniu metabolicznym i częstości przewlekłych powikłań cukrzycy potwierdza zaprezentowaną powyżej tezę o ciężkości fenotypu MODY3 w polskiej grupie etnicznej.

Wnioskiem płynącym z tego stwierdzenia powinien być oczywisty postulat dobrego wyrównania cukrzycy MODY3 od samego początku choroby. Trzeba pamiętać, że początek zachorowania ma miejsce w młodym wieku i czas trwania choroby u jej nosicieli potencjalnie jest długi.

Analiza czynników różniących badane grupy chorych metodą regresji logistycznej wykazała, że jedynym istotnym predyktorem jest BMI. Brak znamiennych różnic między stężeniami peptydu C przy uwzględnieniu BMI w modelu można wytłumaczyć istotą patogenezy cukrzycy typu 2 i MODY. U podłoża obu tych schorzeń leży względny defekt wydzielania insuliny, natomiast tylko w cukrzycy typu 2 za objawy współodpowiedzialna jest w dużym stopniu insulinooporność. Zatem to otyłość, ściśle powiązana z obniżoną wrażliwością na insulinę będzie faktycznie odróżniać obie porównywane jednostki chorobowe. Należy tu również wspomnieć, że wadą analizy wieloczynnikowej, w porównaniu z klasycznymi metodami statystycznymi jest mniejsza siła testu wynikająca ze stratyfikacji danych. Liczba osób dostępnych badaniu była zatem głównym czynnikiem utrudniającym stworzenie stabilnego modelu uwzględniającego więcej predyktorów. Wskutek stratyfikacji grupy o niedostatecznej liczebności wiek nie był w powyżej opisanej analizie istotnym statystycznie niezależnym predyktorem.

Porównanie MODY3 z grupą kontrolną składającą się z ochotników z prawidłową glikemią na czczo wykazało mniejsze wydzielanie insuliny przez nosicieli mutacji, czego wykładnikiem był poziom peptydu C na czczo. Grupy nie różniły się pod względem częstości zaburzeń lipidowych, otyłości, nadciśnienia tętniczego. Jest to odzwierciedleniem faktu, iż za rozwój cukrzycy MODY3 odpowiada praktycznie wyłącznie pojedyncza mutacja genowa w sposób niezależny od powszechnych czynników ryzyka cukrzycy typu 2. Znamienne niższa średnia wartość BMI obserwowana w grupie nosicieli mutacji genu HNF1 α może być interpretowana jako wyraz defektu wydzielniczego wysp β trzustki i związanej z tym mniejszej produkcji insuliny, hormonu o silnym działaniu anabolicznym. Należy podkreślić, że średnie BMI w obu grupach mieściło się w zakresie wartości prawidłowych, a częstość wysokich wartości tego parametru, wskazujących na nadwagę lub otyłość była wśród pacjentów z MODY3 i w grupie kontrolnej podobna. Dzięki wykorzystaniu regresji logistycznej ustalono, iż poziom glukozy

na czczo i peptydu C były niezależnymi czynnikami różniącymi grupę kontrolną i MODY3, natomiast BMI powiązane było ze stężeniem peptydu C, co wspiera zaprezentowaną hipotezę. Opisywano już występowanie niższej masy ciała u chorych z genetycznymi defektami wydzielniczymi insuliny. Dotyczy to cukrzycy noworodkowej związanej z genem Kir6.2 [94], cukrzycy mitochondrialnej [95], natomiast dla genu HNF1 α wykazano takie zjawisko w modelu zwierzęcym [96]. Badania u chorych z MODY3 w innych populacjach nie wykazywały jednak u nich mniejszej masy ciała, choć można zaobserwować nieznamienny trend spadku BMI wraz ze wzrostem wielkości defektu wydzielania insuliny [77]. Różnicę w BMI stwierdzoną w niniejszym badaniu należy jednak interpretować z dużą ostrożnością, ponieważ rekrutacja grupy zdrowych ochotników do badań nad podłożem genetycznym cukrzycy prowadzonych w Katedrze i Klinice Chorób Metabolicznych CMUJ odbywa się bez randomizacji, przez co zgromadzona grupa osób może nie być w pełni reprezentatywna dla populacji.

Analiza wieloczynnikowa poziomu peptydu C jako zmiennej zależnej wykazała, iż najważniejszym czynnikiem wpływającym na ten parametr jest BMI. W zastosowanym modelu zamienny statystycznie był również predyktor jakościowy odpowiadający podziałowi na grupy MODY3, chorych na cukrzycę typu 2 i ochotników bez cukrzycy. Interesujące jest, że w obrębie grupy chorych z MODY3 stężenie peptydu C nie zależało od BMI, a od czasu trwania choroby. Tę obserwację wytłumaczyć można dominującym w MODY, monogenowo uwarunkowanym defektem wydzielania insuliny, który w znacznym stopniu utrudnia kompensację poprzez wzrost sekrecji zwiększonego zapotrzebowania na insulinę związanego z wyższą masą ciała. Progresa defektu wysp β trzustki w raz z wiekiem, obserwowana w tej grupie chorych tłumaczy, obserwowany w tej grupie, związek stężenia peptydu C z czasem trwania cukrzycy. Analiza wieloczynnikowa przeprowadzona dla stężenia triglicerydów i poziomu HDL-cholesterolu wykazała wzajemne powiązanie tych parametrów, a także występowanie progresji zaburzeń lipidowych wraz z wiekiem. W zastosowanym modelu obecne były znamienne różnice poziomu triglicerydów, uwarunkowane obecnością i typem cukrzycy. Podobnie badano predyktory otyłości, wyrażonej tu w postaci wskaźnika BMI. Analiza wieloczynnikowa wykazała, że niezależnymi

predyktorami były poziom peptydu C, wiek, obecność i typ cukrzycy, a także obecność choroby niedokrwiennej serca. Brak znamienności statystycznej w stosunku do innych ujętych w modelu czynników, w tym parametrów lipidowych i nadciśnienia tętniczego można tłumaczyć w pierwszej kolejności małą liczebnością podlegającej stratyfikacji grupy. Zastosowanie regresji logistycznej pozwoliło na określenie czynników ryzyka związanych z nadciśnieniem tętniczym. Obecność i typ cukrzycy, współczynnik BMI oraz wykładnik zaburzeń lipidowych, jakim jest stężenie triglicerydów, a więc typowe czynniki ryzyka, były niezależnymi predyktorami dla tego schorzenia. Należy tu ponownie przywołać ograniczenia tych nowoczesnych i bardzo użytecznych narzędzi matematycznych, jakimi są różne postacie analizy wieloczynnikowej, wynikające ze stratyfikacji danych. Niewystarczająca liczebność analizowanych grup, typowy problem badań nad rzadkimi chorobami monogenowymi, nie pozwoliła na stworzenie modelu zawierającego statystycznie istotne predyktory tłumaczące ryzyko choroby niedokrwiennej serca. Podkreślić trzeba, że analizy tego rodzaju wykazują jedynie relacje matematyczne pomiędzy predyktorami, nie przyczynowo-skutkowe.

Niniejsze badanie jako pierwsze wykazało, że mutacje w genie HNF1 α mogą, aczkolwiek rzadziej niż zmiany w genie HNF1 β , powodować fenotyp zaburzeń rozwojowych nerek. HNF1 α ulega ekspresji w nerkach, aczkolwiek później niż to ma miejsce w przypadku genu HNF1 β [43]. Blisko dziewięcioprocentowa częstość wad nerek w tej populacji, w tym 3,6 % (2 / 56) częstość agenezji nerki, wydaje się być znacznie większa niż w populacji ogólnej. Częstość wrodzonych wad układu moczowego u ludzi oceniana jest na około 0,5 % [97], szacuje się, że agenezja nerki występuje u 1 na 1300 osób, a hipoplazja u 1 na 1000 [98]. Pomimo stosunkowo dużej ilości doniesień dotyczących rodzin MODY3 w światowej literaturze, nie opisywano dotychczas tego rodzaju defektów. Powyższe stwierdzenie dotyczy oczywiście także osób z rodzin z wcześniej opisanymi mutacjami IVS7nt-6G>A i Arg271Trp, gdzie nie obserwowano takich defektów [69, 80]. Jedynym opisywanym fenotypem nerkowym w MODY3 była upośledzona reabsorpcja glukozy w cewkach nerkowych [46]. Jest bardzo ciekawe, że w trzech rodzinach ze średniego rozmiaru kolekcji MODY z polskiej populacji tego rodzaju zaburzenia zostały odnotowane. Jednym

z możliwych wyjaśnień jest wpływ niezidentyfikowanych czynników wielogenowych lub środowiskowych u osób z zaburzeniami rozwojowymi opisywanymi w rodzinach M014, M016, M019. Oczywiście nie można całkowicie wykluczyć, że anomalie nerkowe u nosicieli mutacji w genie MODY3 zostały spowodowane innymi czynnikami dziedzicznymi niż mutacje genu HNF1 α .

6. WNIOSKI

- Mutacje w genie HNF1 α (MODY3) stanowią stosunkowo częstą przyczynę cukrzycy MODY w Polsce. Wydają się one wyjaśniać ponad jedną czwartą podłoża molekularnego autosomalnej dominującej cukrzycy o wczesnym początku.
- Charakter zidentyfikowanych mutacji jest zbliżony do opisywanego w innych europejskich grupach etnicznych. Najczęściej miały one charakter substytucji występujących w proksymalnych częściach genu kodujących domeną wiążącą się z DNA. Mutacje zmiany ramki odczytu w egzonie 4 w tzw. *hot spot* wydają się natomiast być rzadsze niż w innych populacjach.
- Wśród zidentyfikowanych mutacji jedna, Arg271Trp, miała charakter *de novo*. Sugeruje to, że częstość mutacji spontanicznych w rodzinach MODY może być niedoszacowana w związku z selekcją rodzin do badań na podstawie rozbudowanego wywiadu rodzinnego.
- Grupa nosicieli mutacji w genie HNF1 α cechowała się hipoinsulinemią, brakiem otyłości oraz zaburzeń lipidowych, co odróżniało ich od pacjentów z wielogenową cukrzycą typu 2 o późnym początku. U niektórych pacjentów z cukrzycą MODY3 występowały jednak elementy składowe zespołu metabolicznego.
- Nosiciele mutacji w genie HNF1 α cechowali się częstym występowaniem powikłań cukrzycy. Najczęściej obserwowanym powikłaniem była retinopatia cukrzycowa obecna u prawie połowy osób z cukrzycą MODY3.
- Wysokie poziomy hemoglobiny glikowanej, konieczność stosowania farmakoterapii oraz częste występowanie powikłań naczyniowych dowodzą, iż mutacje w genie HNF1 α w populacji polskiej wiążą się ze stosunkowo ciężkim fenotypem cukrzycy.

- Wady rozwojowe nerek w rodzinach MODY mogą być związane z mutacjami w genie HNF1 α , a nie tylko z opisywanymi wcześniej zmianami w genie HNF1 β . Pacjenci z rodzin MODY, u których stwierdzono wady rozwojowe nerek powinni być poddawani badaniom genetycznym w kierunku mutacji w obu genach.

7. PIŚMIENNICTWO:

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H: Global Prevalence of Diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004, 27:1047-1053.
2. Zdrojewski T, Bandosz P, Szpakowski P, Krupa-Wojciechowska B, Babińska B, Kąkol K, Wyrzykowski B: Rozpowszechnienie głównych czynników ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego w Polsce. Wyniki badania NATPOL PLUS. *Kardiol Pol* 2004, 61:5-26.
3. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus and its Complications. Report of WHO Consultations. World Health Organization, Department of Noncommunicable Disease Surveillance, Geneva, 1999 (WHO/NCD/NCS/99.2).
4. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę, 2007. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego *Diabetologia Praktyczna* 2007, tom 8 Supl. A.
5. Pearson ER, Hattersley AT: Unravelling the heterogeneity of non insulin dependent diabetes. *J R Coll Physicians Lond* 2000, 34: 332-335.
6. Hattersley AT: Molecular genetics goes to the diabetes clinic. *Clin Med* 2005, 5:476-81.
7. Malecki MT. Genetics of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2005, 68 Suppl 1:S10-S21.
8. McCarthy MI, Hattersley AT: Molecular diagnostics in monogenic and multifactorial forms of type 2 diabetes. *Expert Rev Mol Diagn* 2001, 1:403-412.
9. Porter JR, Barrett TG: Monogenic syndromes of abnormal glucose homeostasis: clinical review and relevance to the understanding of the pathology of insulin resistance and b-cell failure. *J Med Genet* 2005, 16:893-902.
10. Hattersley AT: Maturity-onset diabetes of the young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity. *Diabet Med* 1998, 15:15-24.
11. Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS: Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med* 2001, 345:971-980.
12. Bouchardet A: De la glycosurie ou diabete sucre. Paris, 1875.

13. Tattersall RB, Fajans SS: A difference between the inheritance of classical juvenile-onset and maturity-onset type of diabetes in young people. *Diabetes* 1975, 24:44-53.
14. McCarthy MI: Susceptibility gene discovery for common metabolic and endocrine traits. *Mol Endocrinol* 2002, 28:1-17.
15. McCarthy MI, Hattersley AT: Molecular diagnostics in monogenic and multifactorial forms of type 2 diabetes. *Expert Rev Mol Diagn* 2001, 1:403-412.
16. Tattersall RB: Mild familial diabetes with dominant inheritance. *Q J Med* 1974, 43:339-357.
17. Mange EJ, Mange AP: Human Pedigrees. Rozdział w podręczniku *Basic Human Genetics*, wydanie drugie. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA 1999.
18. Tattersall RB, Mansell PI: Maturity onset-type diabetes of the young (MODY): one condition or many? *Diabet Med* 1991, 8:402-410.
19. Hattersley AT, Turner RC, Permutt MA, Patel P, Tanizawa Y, Chiu KC, O'Rahilly S, Watkins PJ, Wainscoat JS: Linkage of type 2 diabetes to the glucokinase gene. *Lancet* 1992, 339:1307-1310.
20. Vionnet N, Stoffel M, Takeda J, Yasuda K, Bell GI, Zouali H, Lesage S, Velho G, Iris F, Passa P: Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 1992, 356:721-722.
21. Iynedjian PB, Mobius G, Seitz HJ, Wollheim CB, Renold AE: Tissue-specific expression of glucokinase: identification of the gene product in liver and pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, 83:1998-2001.
22. Bell GI, Pilkis SJ, Weber IT, Polonsky KS: Glucokinase mutations, insulin secretion, and diabetes mellitus. *Annu Rev Physiol* 1996, 58:171-186.
23. Pearson ER, Velho G, Clark P, Stride A, Shepherd M, Frayling TM, Bulman MP, Ellard S, Froguel P, Hattersley AT: beta-cell genes and diabetes: quantitative and qualitative differences in the pathophysiology of hepatic nuclear factor-1alpha and glucokinase mutations. *Diabetes* 2001, 50 Suppl 1:S101-S107.

24. Velho G, Petersen KF, Perseghin G, Hwang JH, Rothman DL, Pueyo ME, Cline GW, Froguel P, Shulman GI: Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) subjects. *J Clin Invest* 1996, 98:1755-1761.
25. Ellard S, Beards F, Allen LI, Shepherd M, Ballantyne E, Harvey R, Hattersley AT: A high prevalence of glucokinase mutations in gestational diabetic subjects selected by clinical criteria. *Diabetologia* 2000, 43:250-253.
26. Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, Fajans SS, Signorini S, Stoffel M, Bell GI: Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4a gene in the maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* 1996, 384:458-60.
27. Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, Southam L, Cox RD, Lathrop GM, Boriraj VV, Chen X, Cox NJ, Oda Y, Yano H, Le Beau MM, Yamada S, Nishigori H, Takeda J, Fajans SS, Hattersley AT, Iwasaki N, Hansen T, Pedersen O, Polonsky KS, Bell GI: Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1a gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* 1996, 384:455-458.
28. Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF: Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* 1997, 17:138-139.
29. Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN, Lindner T, Yamagata K, Ogata M, Tomonaga O, Kuroki H, Kasahara T, Iwamoto Y, Bell GI: Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat Genet* 1997, 17:384-385.
30. Malecki MT, Jhala US, Antonellis A, Fields L, Doria A, Orban T, Saad M, Warram JH, Montminy M, Krolewski AS: Mutations in the NEUROD1 gene are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 1999; 23:323-328.
31. Schrem H, Klempnauer J, Borlak J: Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part I: the hepatocyte nuclear factor network and liver-specific gene expression. *Pharmacol Rev* 2002, 54:129-158.

32. Shih DQ, Screenan S, Munoz KN, Philipson L, Pontoglio M, Yaniv M, Polonsky KS, Stoffel M: Loss of HNF1alpha function in mice leads to abnormal expression of genes involved in pancreatic islet development and metabolism. *Diabetes* 2001, 50:2472-2480.
33. Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, Tsai MJ: Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 1997, 11:2323-2234.
34. Frayling TM, Evans JC, Bulman MP, Pearson E, Allen L, Owen K, Bingham C, Hannemann M, Shepherd M, Ellard S, Hattersley AT: beta-cell genes and diabetes: molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors. *Diabetes* 2001, 50 Suppl 1:S94-S100.
35. Bingham C, Ellard S, Cole TR, Jones KE, Allen LI, Goodship JA, Goodship TH, Bakalinoa-Pugh D, Russell GI, Woolf AS, Nicholls AJ, Hattersley AT: Solitary functioning kidney and diverse genital tract malformations associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations. *Kidney Int* 2002, 61:1243-1251.
36. Montoli A, Colussi G, Massa O, Caccia R, Rizzoni G, Civati G, Barbetti F: Renal cysts and diabetes syndrome linked to mutations of the hepatocyte nuclear factor-1 beta gene: description of a new family with associated liver involvement. *Am J Kidney Dis* 2002, 40:397-402.
37. Gribble FM, Reimann F: Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era. *Diabetologia* 2003, 46:875-891.
38. Sovik O, Njolstad P, Folling I, Sagen J, Cockburn BN, Bell GI: Hyperexcitability to sulphonylurea in MODY3. *Diabetologia* 1998, 41:607-608.
39. Pearson ER, Liddell WG, Shepherd M, Corrall RJ, Hattersley AT: Sensitivity to sulphonylureas in patients with hepatocyte nuclear factor-1alpha gene mutations: evidence for pharmacogenetics in diabetes. *Diabet Med* 2000, 17:543-545.
40. Pearson ER, Starkey BJ, Powell RJ, Gribble FM, Clark PM, Hattersley AT: Genetic cause of hyperglycaemia and response to treatment in diabetes. *Lancet* 2003, 362:1275-1281.
41. The European Agency for the Evaluation of Medical Products CPMP/EWP/462/95, London 1995.

42. Mendel DB, Hausen LP, Graves MK, Conley BP, Crabtree GR: HNF1a and HNF1b (vHNF1) share dimerization and homeodomains, but not activation domains, and form heterodimers in vitro. *Genes Dev* 1991, 5:1042–1056.
43. Coffinier C, Thepot D, Babinet C, Yaniv M, Barra J: Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1beta in visceral endoderm differentiation. *Development* 1999, 126:4785-4794.
44. Harries LW, Ellard S, Stride A, The European MODY consortium, Morgan NG, Hattersley AT: Isomers of the TCF1 gene encoding hepatocyte nuclear factor-1 alpha show differential expression in the pancreas and define the relationship between mutation position and clinical phenotype in monogenic diabetes. *Hum Mol Genet* 2006, 15:2216-2224.
45. Velho G, Vaxillaire M, Boccio V, Charpentier G, Froguel P. Diabetes complications in NIDDM kindreds linked to the MODY3 locus on chromosome 12q. *Diabetes Care* 1996, 19:915-919.
46. Menzel R, Kaisaki PJ, Rjasanowski I, Heinke P, Kerner W, Menzel S: A low renal threshold for glucose in diabetic patients with a mutation in the hepatocyte nuclear factor-1alpha (HNF1alpha) gene. *Diabet Med* 1998, 15:816-820.
47. Mendel DB, Khavari PA, Conley PB, Graves MK, Hansen LP, Admon A, Crabtree GR: Characterization of a cofactor that regulates dimerization of a mammalian homeodomain protein. *Science* 1991, 254:1762-1767.
48. Reznik Y, Dao T, Coutant R, Chiche L, Jeannot E, Clauin S, Rousselot P, Fabre M, Oberti F, Fatome A, Zucman-Rossi J, Bellanne-Chantelot C: Hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene inactivation: cosegregation between liver adenomatosis and diabetes phenotypes in two maturity-onset diabetes of the young (MODY)3 families. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89:1476-1480 .
49. Xu N, Dahlback B: A novel human apolipoprotein (apoM). *J Biol Chem* 1999, 274:31286-31290.
50. Richter S, Shih DQ, Pearson ER, Wolfrum C, Fajans SS, Hattersley AT, Stoffel M: Regulation of apolipoprotein M gene expression by MODY3 gene hepatocyte nuclear factor-1alpha:

- haploinsufficiency is associated with reduced serum apolipoprotein M levels. *Diabetes* 2003, 52:2989-2995.
51. Karlsson E, Shaat N, Axler O, Holmkvist J, Cervin C, Dalbäck B, Groop L. The role for complement C5 and C8, apoM and transthyretin as biomarkers for MODY 1 and 3. *Diabetologia* 2005, 48 Suppl. 11:A117.
52. Malecki MT, Klupa T, Frey J, Cyganek K, Galicka-Stankowska D, Wanic K, Sieradzki J: Identification of a new mutation in the hepatocyte nuclear factor-1 α gene in a Polish family with early onset type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Nutr Metab* 2001, 14:288-291.
53. Chomczynski, P, Mackey K, Drews R, Wilfinger W. DNA Zol: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *BioTechniques* 1997, 22:550-553.
54. Ellard S, Colclough K. Mutations in the Genes Encoding the Transcription Factors Hepatocyte Nuclear Factor 1 Alpha (HNF1A) and 4 Alpha (HNF4A) in Maturity-Onset Diabetes of the Young. *Human Mutation* 2006, 27:854-869.
55. Vaxillaire M, Abderrahmani A, Boutin P, Bailleul B, Froguel P, Yaniv M, Pontoglio M: Anatomy of a Homeoprotein Revealed by the Analysis of Human MODY3 Mutations. *J Biol Chem* 1999, 274:35639-35646.
56. Burge C, Karlin S: Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J Mol Biol* 1997, 268:78-94.
57. Burge C: Modeling dependencies in pre-mRNA splicing signals. W Salzberg S, Searls D. Kasif S. (red.) *Computational Methods in Molecular Biology*, Elsevier Science, 1998, Amsterdam, 127-163.
58. Thompson JD, Higgins DG Gibson TJ: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 1994, 22:4673-4680.
59. Sekhon JS: Multivariate and Propensity Score Matching Software with Automated Balance Optimization: The Matching package for R. 2007.

60. Malecki MT, Moczulski DK, Klupa T, Wanic K, Cyganek K, Frey J, Sieradzki J: Homozygous combination of calpain 10 gene haplotypes is associated with type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Eur J Endocrinol* 2002, 146:695-699.
61. Malecki MT, Frey J, Klupa T, Skupien J, Walus M, Mlynarski W, Sieradzki J: The Pro12Ala polymorphism of PPARgamma2 gene and susceptibility to type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Diabetes Res Clin Pract* 2003, 62:105-111.
62. Harrell FE: *Regression Modeling Strategies*, Springer-Verlag, 2001.
63. Lehto M, Wipemo C, Ivarsson SA, Lindgren C, Lipsanen-Nyman M, Weng J, Wibell L, Widen E, Tuomi T, Groop L: High frequency of mutations in MODY and mitochondrial genes in Scandinavian patients with familial early-onset diabetes. *Diabetologia* 1999, 42:1131-1137.
64. Ji L, Malecki M, Warram JH, Yang Y, Rich SS, Krolewski AS: New susceptibility locus for NIDDM is localized to human chromosome 20q. *Diabetes* 1997, 46:876-881.
65. Malecki MT, Yang Y, Antonellis A, Curtis S, Warram JH, Krolewski AS: Identification of new mutations in the hepatocyte nuclear factor 4alpha gene among families with early onset Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 1999, 16:193-200.
66. Doria A, Yang Y, Malecki M, Scotti S, Dreyfus J, O'Keeffe C, Orban T, Warram JH, Krolewski AS: Phenotypic characteristics of early-onset autosomal-dominant type 2 diabetes unlinked to known maturity-onset diabetes of the young (MODY) genes. *Diabetes Care* 1999, 22:253-261.
67. Frayling TM, Bulamn MP, Ellard S, Appleton M, Dronsfield MJ, Mackie AD, Baird JD, Kaisaki PJ, Yamagata K, Bell GI, Bain SC, Hattersley AT: Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene are a common cause of maturity-onset diabetes of the young in the U.K. *Diabetes* 1997, 46:720-725.
68. Vaxillaire M, Boccio V, Philippi A, Vigouroux C, Terwilliger J, Passa P, Beckmann JS, Velho G, Lathrop GM, Froguel P: A gene for maturity onset diabetes of the young (MODY) maps to chromosome 12q. *Nat Genet* 1995, 9:418-423.
69. Chevre JC, Hani EH, Boutin P, Vaxillaire M, Blanche H, Vionnet N, Pardini VC, Timsit J, Larger E, Charpentier G, Beckers D, Maes M, Bellanne-Chantelot C, Velho G, Froguel P:

- Mutation screening in 18 Caucasian families suggest the existence of other MODY genes. *Diabetologia* 1998, 41:1017-1023.
70. Pruhova S, Ek J, Lebl J, Sumnik Z, Saudek F, Andel M, Pedersen O, Hansen T: Genetic epidemiology of MODY in the Czech republic: new mutations in the MODY genes HNF4alpha, GCK and HNF1alpha. *Diabetologia* 2003, 46:291-295.
71. Bjorkhaug L, Sagen JV, Thorsby P, Sovik O, Molven A, Njolstad PR: Hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene mutations and diabetes in Norway. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88:920-931.
72. Malecki MT, Skupien J, Klupa T, Wanic K, Mlynarski W, Gach A, Solecka I, Sieradzki J: Transfer to sulphonylurea therapy in adult subjects with permanent neonatal diabetes due to KCNJ11-activating mutations: evidence for improvement in insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2007, 30:147-149.
73. Froguel P, Vaxillaire M, Sun F, Velho G, Zouali H, Butel MO, Lesage S, Vionnet N, Clement K, Fougereousse F, et al.: Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 1992, 356:162-164.
74. Froguel P, Zouali H, Vionnet N, Velho G, Vaxillaire M, Sun F, Lesage S, Stoffel M, Takeda J, Passa P, et al.: Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993, 328:697-702.
75. Kaisaki PJ, Menzel S, Lindner T, Oda N, Rjasanowski I, Sahm J, Meincke G, Schulze J, Schmechel H, Petzold C, Ledermann HM, Sachse G, Boriraj VV, Menzel R, Kerner W, Turner RC, Yamagata K, Bell GI: Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in MODY and early-onset NIDDM: evidence for a mutational hotspot in exon 4. *Diabetes* 1997, 46:528-535.
76. Toaima D, Nake A, Wendenburg J, Praedicow K, Rohayem J, Engel K, Galler A, Gahr M, Lee-Kirsch MA: Identification of novel GCK and HNF1A/TCF1 mutations and polymorphisms in German families with maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Hum Mutat* 2005, 25:503-504.

77. Costa A, Bescos M, Velho G, Chevre J, Vidal J, Sesmilo G, Bellanne-Chantelot C, Froguel P, Casamitjana R, Rivera-Fillat F, Gomis R, Conget I: Genetic and clinical characterisation of maturity-onset diabetes of the young in Spanish families. *Eur J Endocrinol* 2000, 142:380-386.
78. Xu JY, Dan QH, Chan V, Wat NM, Tam S, Tiu SC, Lee KF, Siu SC, Tsang MW, Fung LM, Chan KW, Lam KS: Genetic and clinical characteristics of maturity-onset diabetes of the young in Chinese patients. *Eur J Hum Genet* 2005, 13:422-427.
79. Glucksmann MA, Lehto M, Tayber O, Scotti S, Berkemeier L, Pulido JC, Wu Y, Nir WJ, Fang L, Markel P, Munnelly KD, Goranson J, Orho M, Young BM, Whitacre JL, McMenimen C, Wantman M, Tuomi T, Warram J, Forsblom CM, Carlsson M, Rosenzweig J, Kennedy G, Duyk GM, Thomas JD, et al: Novel mutations and a mutational hotspot in the MODY3 gene. *Diabetes* 1997, 46:1081-1086
80. Bulman MP, Harries LW, Hansen T, Shepherd M, Kelly WF, Hattersley AT, Ellard S: Abnormal splicing of hepatocyte nuclear factor 1 alpha in maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia* 2002, 45:1463-1467.
81. Malecki M, Krolewski AS: Podłoże molekularne i obraz kliniczny autosomalnej dominującej cukrzycy typu 2. *Przegl Lek* 2000, 57 Suppl 3:13-18.
82. Bellanne-Chantelot C, Iafusco D, Blanche H, Puca MR, Clauin S, Morel V, Le Gall I, Thomas G, Prisco F: Screening for mutations in the glucokinase (MODY2/GCK) and hepatocyte nuclear factor 1-a (MODY3/HNF1a) genes in south Italian families. *Diabetologia* 1998, 48, Suppl 1:A109.
83. Frayling TM, Bulman MP, Appleton M, Hattersley AT, Ellard S: A rapid screening method for hepatocyte nuclear factor 1 alpha frameshift mutations; prevalence in maturity-onset diabetes of the young and late-onset non-insulin dependent diabetes. *Hum Genet* 1997, 101:351-354.
84. Yamagata K, Yang Q, Yamamoto K, Iwahashi H, Miyagawa J, Okita K, Yoshiuchi I, Miyazaki J, Noguchi T, Nakajima H, Namba M, Hanafusa T, Matsuzawa Y: Mutation P291fsinsC in the transcription factor hepatocyte nuclear factor-1alpha is dominant negative. *Diabetes* 1998, 47:1231-1235.

85. Thomas H, Badenberg B, Bulman M, Lemm I, Lausen J, Kind L, Roosen S, Ellard S, Hattersley AT, Ryffel GU: Evidence for haploinsufficiency of the human HNF1alpha gene revealed by functional characterization of MODY3-associated mutations. *Biol Chem* 2002, 383:1691-1700.
86. Harries LW, Hattersley AT, Ellard S: Messenger RNA transcripts of the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene containing premature termination codons are subject to nonsense-mediated decay. *Diabetes* 2004, 53:500-504.
87. Sheperd M, Sparkes AC, Hattersley AT: Genetic testing in maturity onset diabetes of the young (MODY); a new challenge for the diabetic clinic. *Pract Diabetes Int* 2001, 18:16-21.
88. Klupa T, Warram JH, Antonellis A, Pezzolesi M, Nam M, Malecki MT, Doria A, Rich SS, Krolewski AS: Determinants of the development of diabetes (maturity-onset diabetes of the young-3) in carriers of HNF1alpha mutations: evidence for parent-of-origin effect. *Diabetes Care* 2002, 25:2292-2301.
89. Stride A, Shepherd M, Frayling TM, Bulman MP, Ellard S, Hattersley AT: Intrauterine hyperglycemia is associated with an earlier diagnosis of diabetes in HNF1alpha gene mutation carriers. *Diabetes Care*. 2002, 25:2287-2291.
90. Pearson ER, Liddell WG, Shepherd M, Corral RJ, Hattersley AT: Sensitivity to sulphonylureas in patients with hepatocyte nuclear factor-1alpha gene mutations: evidence for pharmacogenetics in diabetes. *Diabet Med* 2000, 17:543-545.
91. Isomaa B, Henricsson M, Lehto M, Forsblom C, Karanko S, Sarelin L, Hagglblom M, Groop L: Chronic diabetic complications in patients with MODY3 diabetes. *Diabetologia* 1998, 41:467-473.
92. Byrne MM, Sturis J, Menzel S, Yamagata K, Fajans SS, Dronsfield MJ, Bain SC, Hattersley AT, Velho G, Froguel P, Bell GI, Polonsky KS: Altered insulin secretory responses to glucose in diabetic and nondiabetic subjects with mutations in the diabetes susceptibility gene MODY3 on chromosome 12. *Diabetes* 1996, 45:1503-1510.
93. Vaxillaire M, Pueyo ME, Clement K, Fiet J, Timsit J, Philippe J, Robert JJ, Tappy L, Froguel P, Velho G: Insulin secretion and insulin sensitivity in diabetic and non-diabetic subjects with

- hepatic nuclear factor-1alpha (maturity-onset diabetes of the young-3) mutations. *Eur J Endocrinol* 1999, 141:609-618.
94. Gloyn AL, Pearson ER, Antcliff JF, Proks P, Bruining GJ, Slingerland AS, Howard N, Srinivasan S, Silva JM, Molnes J, Edghill EL, Frayling TM, Temple IK, Mackay D, Shield JP, Sumnik Z, van Rhijn A, Wales JK, Clark P, Gorman S, Aisenberg J, Ellard S, Njolstad PR, Ashcroft FM, Hattersley AT: Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N Engl J Med*. 2004, 350:1838-1849.
95. Guillausseau PJ, Dubois-Laforgue D, Massin P, Laloi-Michelin M, Bellanne-Chantelot C, Gin H, Bertin E, Blickle JF, Bauduceau B, Bouhanick B, Cahen-Varsaux J, Casanova S, Charpentier G, Chedin P, Derrien C, Grimaldi A, Guerci B, Kaloustian E, Lorenzini F, Murat A, Olivier F, Paques M, Paquis-Flucklinger V, Tielmans A, Vincenot M, Vialettes B, Timsit J; GEDIAM, Mitochondrial Diabetes French Study Group: Heterogeneity of diabetes phenotype in patients with 3243 bp mutation of mitochondrial DNA (Maternally Inherited Diabetes and Deafness or MIDD). *Diabetes Metab*. 2004, 30:181-186.
96. Pontoglio M, Sreenan S, Roe M, Pugh W, Ostrega D, Doyen A, Pick AJ, Baldwin A, Velho G, Froguel P, Levisetti M, Bonner-Weir S, Bell GI, Yaniv M, Polonsky KS: Defective insulin secretion in hepatocyte nuclear factor 1alpha-deficient mice. *J Clin Invest*. 1998, 101:2215-2222.
97. Rosendahl H: Ultrasound screening for fetal urinary tract malformations: a prospective study in general population. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1990, 36:27-33.
98. Sheih CP, Liu MB, Hung CS, Yang KH, Chen WY, Lin CY: Renal abnormalities in schoolchildren. *Pediatrics* 1989, 84:1086-1090.

8. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

W wyniku intensywnych wysiłków naukowców pracujących nad poznaniem genetycznego podłoża cukrzycy, w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku udowodniono związek mutacji kilku genów z powstawaniem autosomalnej dominującej cukrzycy o wczesnym początku, zwanej MODY. Najczęstszym podtypem cukrzycy MODY będącej skutkiem mutacji genów czynników transkrypcyjnych jest MODY3, związana z genem HNF1 α (TCF1). Niektórym opisanym przypadkom cukrzycy MODY3 towarzyszyły pozatrzustkowe manifestacje kliniczne, na przykład tubulopatia nerkowa lub gruczolaki wątroby. Wiedza o molekularnym podłożu MODY ma duże znaczenie naukowe, rokownicze, profilaktyczne, coraz częściej wpływa też na działania terapeutyczne.

Niniejsza rozprawa doktorska dotyczy badania podłoża molekularnego i wybranych zagadnień klinicznych cukrzycy MODY3 w regionie małopolskim. Szczegółowymi celami były a) rekrutacja rodzin do badań przesiewowych w kierunku cukrzycy MODY3 w ramach tworzonego Polskiego Rejestru Rodzin MODY; b) poszukiwanie, ocena częstości i charakterystyka mutacji genu HNF1 α (MODY3); c) analiza segregacji i ocena znaczenia zidentyfikowanych mutacji; d) charakterystyka kliniczna nosicieli mutacji genu HNF1 α ; e) poszukiwanie wad rozwojowych nerek u nosicieli mutacji genu HNF1 α .

Rekrutację rodzin MODY prowadzono w oparciu o następujące kryteria: a) autosomalny dominujący sposób dziedziczenia cukrzycy w rodzinie; b) cukrzyca obecna co najmniej w 3 pokoleniach; c) co najmniej dwie osoby w rodzinie, u których cukrzyca została rozpoznana przed 30. rokiem życia i miała cechy klinicznej insulinoniezależności. Poszukiwanie mutacji u probantów prowadzono metodą bezpośredniego sekwencjonowania 10 egzonów i promotora genu HNF1 α . Mutacji poszukiwano następnie u członków rodzin zidentyfikowanych nosicieli. Charakterystyka kliniczna obejmowała dane dotyczące choroby: wieku rozpoznania, czasu i sposobu leczenia, obecności powikłań i schorzeń współistniejących, pomiarów antropometrycznych i parametrów biochemicznych. Grupy porównawcze w odniesieniu do wybranych parametrów stanowili pacjenci

z wieloczynnikową cukrzycą typu 2 i zdrowi ochotnicy, przyporządkowani w stosunku 1:1 do osób z MODY3. Poszukiwanie wad układu moczowego przeprowadzono metodą ultrasonograficzną u wszystkich nosicieli mutacji HNF1 α .

Przebadano 47 probantów rodzin, u 13 z nich zidentyfikowano mutacje genu HNF1 α . Stwierdzono 6 mutacji zmiany sensu, w tym dwie uprzednio nie opisane (Ser249Pro i Asn257Thr), 3 mutacje zmiany ramki odczytu, 1 mutację nonsensowną i 2 mutacje zmiany miejsc wycinania intronów. Mutacja Arg131Gln wykryta została w 2 rodzinach. Przebadano 114 członków rodzin MODY z mutacjami genu HNF1 α . Zidentyfikowano 56 nosicieli, z których 46 chorowało na cukrzycę. Wszystkie wymienione mutacje segregowały z cukrzycą w rodzinach. Jedna z mutacji (Arg271Trp) powstała *de novo* w rodzinie, w której została opisana. Średni wiek zachorowania wynosił 23,8 lat, do 30. roku życia zachorowało 66,0 % pacjentów, w grupie nosicieli starszych niż 30 lat chorowało 96,7 %. U chorych z MODY3 stwierdzono wysoki odsetek przewlekłych powikłań, porównywalny z ich częstością w cukrzycy typu 2 oraz znaczną, ponad 50 %, częstość stosowania insulinoterapii. U niektórych pacjentów MODY3 występowały elementy zespołu metabolicznego w postaci zaburzeń lipidowych, nadciśnienia, albo nadwagi, jednak rzadziej niż miało to miejsce w cukrzycy typu 2. Chorzy ci charakteryzowali się też niższym poziomem peptydu C. U 5 nosicieli mutacji genu HNF1 α z 3 rodzin stwierdzono występowanie wad rozwojowych nerek.

Niniejsza praca jest pierwszym systematycznym poszukiwaniem mutacji MODY3 w Polsce. Badanie wykazało, że mutacje HNF1 α stanowią ważną, porównywalną pod względem częstości z innymi populacjami przyczynę cukrzycy MODY. Wydają się one wyjaśniać ponad jedną czwartą podłoża molekularnego autosomalnej dominującej cukrzycy o wczesnym początku. Potwierdzono opisane wcześniej cechy kliniczne tego podtypu cukrzycy: młody wiek zachorowania, wysoką penetrację mutacji oraz stosunkowo rzadkie występowanie elementów zespołu metabolicznego. Niniejsza praca jest jednym z kilku na świecie badań dotyczących powikłań przewlekłych cukrzycy MODY. Nosiciele mutacji w genie HNF1 α w przebadanej populacji cechowali się

częstym występowaniem powikłań cukrzycy. Najczęściej obserwowana była retinopatia cukrzycowa obecna u prawie połowy osób z cukrzycą MODY3. Po raz pierwszy na świecie zaobserwowano związek wad rozwojowych nerek z mutacjami genu HNF1 α .

9. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Molecular background and clinical characteristics of MODY3 in Lesser Poland

Extensive studies concerning the genetic background of diabetes mellitus, performed in the 90. of the XX century, showed the association of mutations in several genes with early onset autosomal dominant diabetes called MODY. The most common subtype is MODY3 linked to mutations in the HNF1 α (TCF1) gene encoding a transcription factor. Several extra-pancreatic phenotypes were described in MODY. For example, MODY3 is sometimes associated with renal tubulopathy and the occurrence of hepatic multiple adenomas. The knowledge about the molecular background of this type of diabetes has already a wide impact on diabetic research, as well as on prophylaxis, prognosis, and, with increasing intensity, on the clinical practice.

This study concerns the genetic background and clinical features of MODY3 in the region of Lesser Poland. The aims were: a) to recruit the families with early onset autosomal diabetes to screen for MODY gene mutations from a population of Poland; b) to search for HNF1 α mutations in probands from the families; c) to analyse the segregation and to provide the characteristics of mutations; d) to characterize mutation carriers; e) to search for developmental renal abnormalities.

The recruitment was performed according to the following criteria: a) autosomal dominant inheritance of diabetes; b) diabetes present in the family in at least 3 generations; c) at least two family members diagnosed with diabetes within 30 years, with clinical insulin independence. Mutation screening was performed by direct sequencing of 10 exons and promoter of HNF1 α . Family members of the probands with mutations were screened for sequence differences. The characteristics included the clinical data, such as age of diagnosis, time and method of treatment, presence of chronic complications, and coexisting abnormalities, antropometric measurements, and biochemical parameters. The mutation carriers were compared to a group of diabetic subjects with typical type 2 diabetes and non-diabetic volunteers, matched in 1:1 ratio.

The search for renal malformation was performed by USG examination of all HNF1 α mutation carriers.

47 probands were recruited and examined, 13 MODY3 families were identified. 6 missense mutations were found, among them 2 were novel (Ser249Pro and Asn257Thr). In addition, there were 3 frameshift, 1 nonsense, and 2 splice-site mutations, respectively. The Arg131Gln mutation was identified in two families. There were 114 members of MODY3 families examined in this study. Among 56 identified HNF1 α mutation carriers there were 46 diabetic patients. All these mutations segregated with diabetes in the families. One mutation, Arg271Trp, have arisen *de novo*. The mean age of diabetes diagnosis was 23,8 years. Below the age of 30 years there were 66,0 % carriers diagnosed with diabetes, while in group over 30 years of age there were 96,7 % diabetic patients. Among MODY3 patients there was a high prevalence of chronic complications, similar to type 2 diabetes group. Almost half of the HNF1 α mutation carriers were diagnosed with diabetic retinopathy. In MODY group the rate of insulin therapy was over 50 %. The frequency of the metabolic syndrome components was lower in MODY3 subjects than in type 2 diabetic group. In addition, their C-peptide concentration was lower. In 5 HNF1 α mutation carriers from 3 families the renal developmental malformations were identified.

This study is the first large-scale search for MODY3 mutations in a Polish population. It was found that HNF1 α mutations constitute a frequent cause of MODY diabetes, which is comparable with the results from other populations. They seem to explain more than a quarter of early onset autosomal dominant diabetes. Previously described features of MODY3 were confirmed, such as early onset, high penetrance, and infrequent coexistence of the metabolic syndrome elements. This study is one of a few ones in the world in which diabetes complications were examined in MODY patients. HNF1 α mutation carriers in Polish population were characterized by high prevalence of diabetic complications. The most frequently observed complication was diabetic retinopathy, which was present in almost a half of MODY3 patients.

This study is also the first description of the association of renal malformation occurrence with the HNF1 α gene mutations.

10. Załącznik A. Ankieta genetyczna o charakterze przesiewowym dotycząca dziedziczenia cukrzycy w rodzinie

Imię i nazwisko:

		Cukrzyca			Wiek zachorowania
		TAK	NIE	NIE WIEM	
Osoba wypełniająca ankietę		X			
Rodzice					
	Matka				
	Ociec				
Dziadkowie:					
	Matka Matki				
	Ociec Matki				
	Matka Oica				
	Ociec Oica				
Rodzeństwo (od najstarszego)					
	1 rodzeństwo				
	2 rodzeństwo				
	3 rodzeństwo				
	4 rodzeństwo				
	5 rodzeństwo				
Dzieci (od najstarszego)					
	1 dziecko				
	2 dziecko				
	3 dziecko				
	4 dziecko				
	5 dziecko				
Ciotki/Wujkowie (od najstarszego)					
	1 rodzeństwo Matki				
	2 rodzeństwo Matki				
	3 rodzeństwo Matki				
	4 rodzeństwo Matki				
	5 rodzeństwo Matki				
	1 rodzeństwo Oica				
	2 rodzeństwo Oica				
	3 rodzeństwo Oica				
	4 rodzeństwo Oica				
	5 rodzeństwo Oica				
Kuzynki/Kuzyni (od najstarszego)					
	1 kuzynka/kuzyn				
	2 kuzynka/kuzyn				
	3 kuzynka/kuzyn				
	4 kuzynka/kuzyn				
	5 kuzynka/kuzyn				
	6 kuzynka/kuzyn				
	7 kuzynka/kuzyn				
Inne osoby z rodziny chorujące na cukrzycę (prosimy o podanie wieku zachorowania):					
1. _____					
2. _____					
3. _____					

ANKIETA GENETYCZNA

DATA ANKIETY:.....

IMIĘ I NAZWISKO:.....

Adres:.....

Numer telefonu:.....

Wywiad chorobowy: Prosimy o zastanowienie się nad odpowiedziami i umieszczenie ich we właściwych rubrykach.

1. **Rok** rozpoznania cukrzycy:.....Ile Pan/Pani miał(a) wtedy **lat**.....

2. Aktualna metoda leczenia (podkreślić właściwe):

Bez leczenia

Dieta

Leki doustne

Insulina

JEŻELI STOSOWANA JEST INSULINA, to w **ile lat po rozpoznaniu cukrzycy** zaczęto ją stosować ?..... **Jaki to był rok ?**.....

JEŻELI STOSOWANA JEST INSULINA, to jaka jest jej dobową dawką?.....

3. Prosimy o podanie swojej **daty urodzenia** Dzień.....Miesiąc.....Rok.....

4. Prosimy o podanie swojego **wzrostu**:.....cm

5. Prosimy o podanie swojej **wagi**:.....kg

6. Jaka była Pan/Pani **największa waga w życiu** i kiedy to miało miejsce?

Waga.....kg **Wiek**.....

W pytaniach zamieszczony poniżej prosimy w odpowiednich miejscach o podkreślenie prawidłowej odpowiedzi TAK lub NIE

7. Czy Pan/Pani lekarz powiedział kiedykolwiek, że ma Pan/Pani wysokie ciśnienie tętnicze lub nadciśnienie?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, czy aktualnie stosuje Pan/Pani leki obniżające ciśnienie tętnicze krwi ?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to prosimy wymienić te leki:.....

.....

8. Czy lekarz powiedział Panu/Pani kiedykolwiek, że miał/a Pan/Pani atak serca lub dusznicę bolesną?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to prosimy podać datę.....

9. Czy był/a Pan/Pani kiedykolwiek hospitalizowany(a) z powodu zawału serca?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to prosimy podać datę/y hospitalizacji:.....

10. Czy lekarz kiedy powiedział Panu/Pani, że ma Pan/Pani **chorobę nerek (nefropatię)** związaną z cukrzycą?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, prosimy podać kiedy to miało miejsce.....

11. Czy lekarz powiedział Panu/Pani kiedykolwiek, że ma Pan/Pani **retinopatię** lub inne problemy oczne związane z cukrzycą?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, prosimy podać kiedy to miało miejsce.....

Czy miał Pan/Pani kiedykolwiek wykonywany zabieg laseroterapii?

NIE

TAK

12. Czy był/a Pan/Pani kiedykolwiek leczony z powodu innej choroby?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, prosimy o ich wymienienie.....

.....

13. Czy aktualnie jest Pan/Pan leczony następującymi lekami (prosimy o podkreślenie

stosowanych leków):

Accupro Benalapril Capoten Captopril Enap Enarenal Gopten

Inhibace Lotensin Prestarium

WYWIAD RODZINNY

Prosimy o odpowiedź na poniższe pytania dotyczące problemów zdrowotnych Pani/Pana rodziny. Wszystkie pytania dotyczą rodzin biologicznych (nie dotyczą macoch, ojcymów, dzieci adoptowanych).

W pytaniach zamieszczony poniżej prosimy w odpowiednich miejscach o **podkreślenie** prawidłowej odpowiedzi TAK lub NIE albo NIE WIEM

DZIADKOWIE

Czy ktoś z Pani/Pana babć lub dziadków chorował na cukrzycę?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, prosimy zaznaczyć, którego z nich to dotyczyło:

ojciec ojca	TAK	NIE	NIE WIEM
-------------	-----	-----	----------

matka ojca	TAK	NIE	NIE WIEM
------------	-----	-----	----------

ojciec matki	TAK	NIE	NIE WIEM
--------------	-----	-----	----------

matka matki	TAK	NIE	NIE WIEM
-------------	-----	-----	----------

Ile/u ma Pani/Pan żyjących babć lub dziadków:

RODZICE

MATKA

1. Rok urodzenia.....

2. Czy rozpoznano u niej kiedykolwiek cukrzycę?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to w jakim wieku.....

3. Czy rozpoznano u niej kiedykolwiek nadciśnienie tętnicze?

NIE

TAK

OJCIEC

1. Rok urodzenia.....

2. Czy rozpoznano u niego kiedykolwiek cukrzycę (właściwe zakreślić)?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to w jakim wieku.....

3. Czy rozpoznano u niego kiedykolwiek nadciśnienie tętnicze?

NIE

TAK

CIOTKI STRYJENKI/WUJKOWIE

Ilu braci i sióstr miała Pana/Pani matka?Ilu żyje?.....

U ilu z nich wystąpiła cukrzyca?.....Ilu z nich żyje?.....

Czy u któregoś z Pana/Pani kuzynów lub kuzynek ze strony twojej matki wystąpiła cukrzyca?

NIE

TAK

Ilu braci i sióstr miał Pani/Pana ojciec?Ilu żyje?.....

U ilu z nich wystąpiła cukrzyca?.....Ilu z nich żyje?.....

Czy u któregoś z Pani/Pana kuzynów lub kuzynek ze strony twojego ojca wystąpiła cukrzyca?

NIE

TAK

RODZENÍSTWO

Czy ma Pan/Pani braci lub siostry?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to prosimy o ich wymienienie począwszy od najstarszych:

1. Rok urodzeniapłeć.....

Czy miało miejsce rozpoznanie cukrzycy?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to w jakim wiekui jaki jest sposób leczenia.....

Czy żyje

NIE

TAK

JEŻELI NIE, to kiedy nastąpił zgon.....

Liczba dzieci.....Liczba dzieci z cukrzycą.....

2. Rok urodzeniapłeć.....

Czy miało miejsce rozpoznanie cukrzycy?

NIE TAK
JEŻELI TAK, to w jakim wiekui jaki jest sposób leczenia.....

Czy żyje

NIE TAK

JEŻELI NIE, to kiedy nastąpił zgon.....

Liczba dzieci.....Liczba dzieci z cukrzycą.....

3. Rok urodzeniapłeć.....

Czy miało miejsce rozpoznanie cukrzycy?

NIE TAK
JEŻELI TAK, to w jakim wiekui jaki jest sposób leczenia.....

Czy żyje

NIE TAK

JEŻELI NIE, to kiedy nastąpił zgon.....

Liczba dzieci.....Liczba dzieci z cukrzycą.....

4. Rok urodzeniapłeć.....

Czy miało miejsce rozpoznanie cukrzycy?

NIE TAK
JEŻELI TAK, to w jakim wiekui jaki jest sposób leczenia.....

Czy żyje

NIE TAK

JEŻELI NIE, to kiedy nastąpił zgon.....

Liczba dzieci.....Liczba dzieci z cukrzycą.....

DZIECI

Czy ma Pani/Pan dzieci?

NIE TAK

JEŻELI TAK, to u ilu z nich wystąpiła cukrzyca.....

PALENIE TYTONIU

1. Czy palił Pan/Pani kiedykolwiek papierosy?

NIE

TAK

JEŻELI NIE, to prosimy o pominięcie pozostałych pytań.

JEŻELI TAK, to w jakim wieku zaczął/a Pan/Pani palić regularnie?

Wiek.....

2. Czy aktualnie pali Pan/Pani papierosy?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to prosimy o przejście do pytania 3.

JEŻELI NIE, to w jakim wieku rzucił/a Pan/Pani palenie? Wiek.....

Ile średnio paczek papierosów wypalał/a Pan/Pani dziennie w czasie ostatniego miesiąca palenia papierosów (prosimy zakreślić)?.....

Wyrażam zgodę na pobranie krwi celem izolacji DNA do badań genetycznych.

podpis wypełniającego ankietę.....

Prosimy o podanie nazwisk i adresów **żyjących siostr lub braci**

Nazwisko i imię:.....

Adres i telefon:

Nazwisko i imię:.....

Adres i telefon:

Nazwisko i imię:.....

Adres i telefon: