

Genetická predispozice k autoimunitnímu diabetu mellitus manifestovanému v dospělém věku

(These přednášky k habilitačnímu řízení)

MUDr. Marie Černá, CSc.

Oddělení buněčné a molekulární biologie, Centrum biomedicínských oborů, 3. LF UK

Úvod

Morfologickým podkladem diabetu mellitus 1. typu (T1DM) je selektivní a postupný zánik β -buněk Langerhansových ostrůvků, jejichž ostatní endokrinní buňky zůstávají zachovány. Destrukce buněk produkujících inzulín je způsobena autoimunitním procesem. Předpokladem je genetická predispozice, určovaná hlavně geny II. třídy HLA systému (DR a DQ). Markery imunitní destrukce β -buněk jsou autoprotilátky proti ostrůvkům (ICA), inzulínu (IAA), dekarboxyláze kyseliny glutamové (GADA) a tyrozinofosfatázám (IA-2 a IA-2 β).

Epidemiologie

V rámci České republiky bylo v roce 2005 registrováno asi 50 000 léčených diabetiků 1. typu a 680 000 léčených diabetiků 2. typu. Z celkového počtu léčených diabetiků 1. typu bylo pouze 1-2% pacientů ze skupiny dětí a mladistvých. V současné době se předpokládá, že po 35. roce věku života vznikne více než polovina všech případů diabetu 1. typu.

Etiopatogeneze autoimunitního diabetu mellitus zahrnuje pravděpodobně 4 fáze

- 1) Během vyžívání T-lymfocytů v **thymu** dochází i za fyziologických podmínek k nekompletní negativní selekci a naivní autoreaktivní T-lymfocyty se proto dostávají do periferních lymfatických orgánů. Specifické HLA molekuly, které jsou zapojeny do prezentace peptidů vyžívajícím T-lymfocytům, mohou tak přispívat k náchylnosti k autoimunitně. Molekuly HLA-DQ asociované s autoimunitním diabetem (DQB1*0302) mají strukturální vlastnosti, které svědčí o nedostatečné komunikaci během rozpoznávání T-lymfocyty, což odpovídá hypotéze, že asociace HLA-DQ s T1DM se částečně vysvětluje neadekvátní časnou selekcí a maturací T-lymfocytů.
- 2) Relativní (v důsledku nedostatečné amplifikace autoreaktivních T-lymfocytů - hygienická hypotéza), ale i absolutní **periferní amplifikace** potenciálních autoreaktivních T-lymfocytů vlivem neadekvátní stimulace infekcí (zkřížené reakce či porušení slizniční imunity) činí z jedince s autoimunitní predispozicí jedince s autoimunitní náchylností. To vede k rozšíření počtu T-lymfocytů se specifitou pro určité HLA-peptidové komplexy. Jedním z důsledků této amplifikace je zvýšení počtu autoreaktivních lymfocytů k prahové hodnotě, která je nutná ke zpuštění následujících patologických jevů.
- 3) Další fáze se odehrává již v pankreatu, protože zahrnuje rozpoznání antigenu ostrůvkového kompartmentu a **aktivaci** autoreaktivních T-lymfocytů. Každá molekula HLA determinuje vazbu určitých antigenních peptidů. Afinity této vazby a stabilita HLA-peptidového komplexu budou určovat celkovou aviditu interakce HLA-peptid-TCR. Prodloužená ligace TCR rozhodne o osudu aktivovaných T-lymfocytů, částečně závislém na prostředí, kde probíhá interakce HLA-peptid-TCR. Obecné zánětlivé stimuly a tkáňové poškození, které zvyšují antigenovou expresi na cílové tkáni a vedou k uvolnění lokálních zánětlivých mediátorů, chemoatrakci a migraci T-lymfocytů, mohou sehrát zásadní roli v přechodu mezi podprahovými autoimunitními reakcemi a vznikem autoimunitní choroby.
- 4) Fáze 4 zahrnuje **selhání regulačních mechanismů**, jehož výsledkem je progresse latentní autoimunity do choroby s plně rozvinutými klinickými příznaky, a pravděpodobně zahrnuje genetickou predispozici k diabetu danou non-HLA geny. Ze všech autoimunitních chorob

právě T1DM představuje jasný doklad o důležitosti tohoto regulačního kroku: příbuzní diabetiků jsou často pozitivní na autoprotilátky a mohou mít i sníženou sekreci inzulínu, a přesto u nich nedojde k vývoji diabetu. Tito jedinci jsou jasným důkazem toho, že je možné zastavit imunitní kaskádu po aktivaci autoimunity, ale před tkáňovou destrukcí. Vysvětlením může být přítomnost funkčních regulačních T lymfocytů (Treg: CD4+ CD25+), NK T buněčné aktivity, či regulace vývoje nezralých dendritických buněk, navozujících toleranci. Imunitní odpověď samotná je regulována balancí mezi cytokiny T pomocných lymfocytů Th1 (IL-2 a IFN- γ) a Th2 (IL-4, IL-5 a IL-13). Předpokládá se, že lymfocyty Th1, vedoucí k buněčné imunitě, aktivují rozvoj diabetu, zatímco Th2, směřující k humorální imunitě, spíše tomuto procesu brání.

Cíl studie

Cílem naší studie byla analýza genetické predispozice k autoimunitnímu diabetu mellitus manifestovanému po 35. roce života. Chtěli jsme ověřit:

- a) jestli se jedná o heterogenní skupinu onemocnění, ve které dále můžeme identifikovat jednotlivé podtypy diabetu
- b) jestli diabetes manifestovaný v dospělosti má odlišnou imunogenetickou predispozici od diabetu 1. typu manifestovaného v dětském věku.

Subjekt studie

Subjektem asociační studie se stal soubor 281 pacientů s diabetem mellitus manifestovaným po 35. roce života. Tito pacienti byli klasifikováni do tří skupin:

1. **T1DM:** CP \leq 200 pmol/l, inzulín do 6 měsíců po dg. (N= 64)
2. **LADA:** CP \geq 200 pmol/l GADA \geq 50 ng/ml, inzulín po 6 měsících po dg. (N= 31)
3. **T2DM:** CP \geq 200 pmol/l GADA \leq 50 ng/ml, bez inzulínové terapie (N=131)

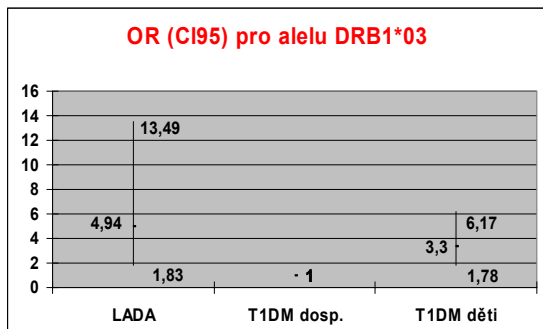
LADA (latentní autoimunitní diabetes mellitus u dospělých) je považován za podtyp T1DM. Dále jsme pro porovnání používali soubor - 188 dětských pacientů s T1DM
- 159 zdravých dospělých jedinců.

Metody studie

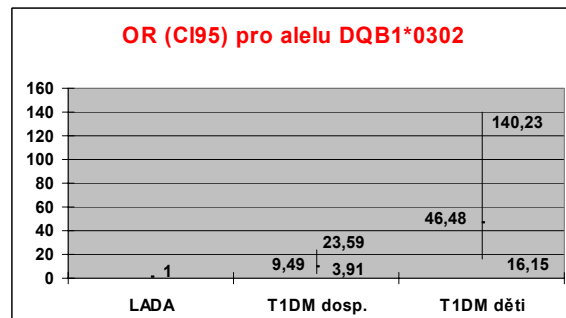
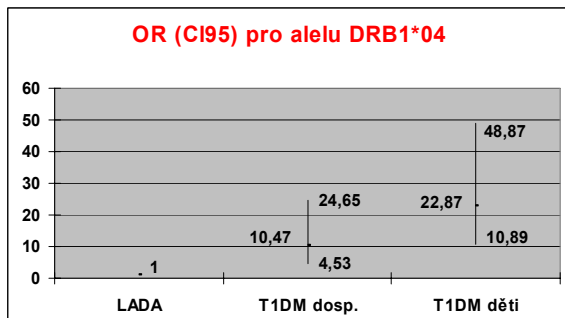
Několika celogenomovými skríninky bylo zmapováno u diabetu 1. typu celkem 18 predispozičních lokusů. Jasně doložené zůstávají však pouze dva: HLA alely II. třídy a polymorfismus inzulínového promotoru. V rámci naší imunogenetické studie jsme vedle těchto dvou rizikových faktorů navrhli k testování další, které na základě současné literatury a jejich funkce v imunitním systému se jeví jako potenciální kandidáti predispozice. Celkem jsme analyzovali sedm genetických lokusů lokalizovaných na 4., 6., 11. a 14. chromozomu. Nejvýznamnějším rizikovým faktorem zůstávají na 6. chromozomu alely II. třídy lidských leukocytárních antigenů, HLA DRB1 a DQB1 (IDDM1), kde se také nachází „MHC (major histocompatibility complex) class I chain related” gen A, MIC-A, v jehož 5. exonu transmembránové oblasti jsme sledovali mikrosatelitový polymorfismus (GCT) 6 alel. Gen pro inzulín, nacházející se na 11. chromozomu, s polymorfismem tandemového opakování v promotorové oblasti je považován, hned po HLA systému, za další kandidátní gen podmiňující predispozici ke vzniku diabetu 1. typu (IDDM2). Na 11. chromozomu je dále lokalizován gen pro interleukin 18, IL-18, se dvěma jednonukleotidovými polymorfismy v promotorové oblasti na pozicích -607 a -137. Gen pro nukleární faktor kappa B, NFKB1, na 4. chromozomu s mikrosatelitovým polymorfismem (CA) v regulační oblasti a gen pro inhibitor nukleárního faktoru kappa B, NFKBIA, na 14. chromozomu s jednonukleotidovým polymorfismem (A/G) ve oblasti 3'UTR byly další kandidáti genetické predispozice vzhledem k jejich vztahu k zánětlivým procesům.

Analýza genů HLA systému (II. třídy: DRB1 a DQB1, I. třídy: MIC-A)

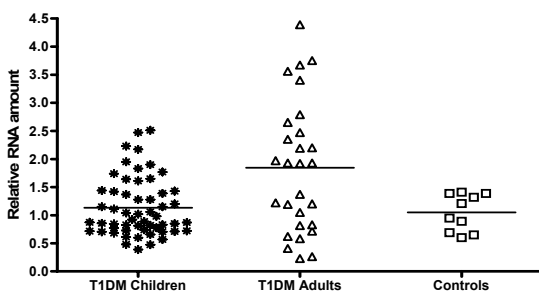
Příčina významné asociace molekul HLA II. třídy s autoimunitními chorobami souvisí pravděpodobně s jejich funkcí, coby molekul předkládajících antigenní peptidové fragmenty T-lymfocytům. Jedna z hypotéz, vysvětlující rozdíl mezi predispozičními a ochrannými alelami, poukazuje na to, že predispoziční DQ molekuly slabě interagují s antigenními peptidy na rozdíl od ochranných DQ molekul, kde je silná interakce, jež je v případě dominantní ochranné alely *DQB1*0602* tak významná, že k prezentaci peptidu není třeba lysozomálního chaperonu HLA-DM. Nestabilní komplex predispoziční HLA molekuly s vlastním peptidem se v thymu nedostatečně dlouho podílí na negativní selekci a autoimunitní T-lymfocyty se pak dostanou do periférie. Naopak, stabilita komplexu ochranné HLA molekuly s vlastním peptidem je určitou zárukou, že v thymu dojde k úplné negativní selekci všech autoimunitních T-lymfocytů. Ačkoliv antigenní peptidy mohou být dlouhé až 30 aminokyselin, specifitu vazby HLA-peptid určují pouze čtyři kontaktní místa na HLA molekule, nazývaná kapsy, kam se vážou specifické aminokyseliny peptidu, nacházející se v pozici 1, 4, 6 a 9, čímž se tak selektují peptidy, které se mohou vázat na HLA molekulu. Je zajímavé, že kapsa 9 odpovídá oblasti kodonu 57 řetězce DQβ, kde nepřítomnost asparátové kyseliny je charakteristická pro všechny predispoziční DQB1 alely.



Síla asociace, vyjádřena podílem šancí („odds ratio“) pro jednotlivé predispoziční HLA alely, se významně liší u jednotlivých skupin pacientů. Pro alelu *DRB1*03* je nejvyšší u LADA pacientů, pro alely *DRB1*04* a *DQB1*0302* je nejvyšší u dětských diabetiků. Co se týče diabetu 1. typu manifestovaného v dospělosti, predispoziční alely jsou zde obdobné jako u dětí, ale podíl šancí je menší, navíc svědčící o silnějším vlivu DR alel než DQ alel.



Analýzou genové exprese HLA-DRB1*04 v antigen-prezentujících buňkách periferní krve jsme zjistili významně zvýšené množství mRNA této alely u diabetu 1. typu manifestovaného v dospělosti oproti diabetu 1. typu manifestovanému v dětském věku a kontrolním souborům



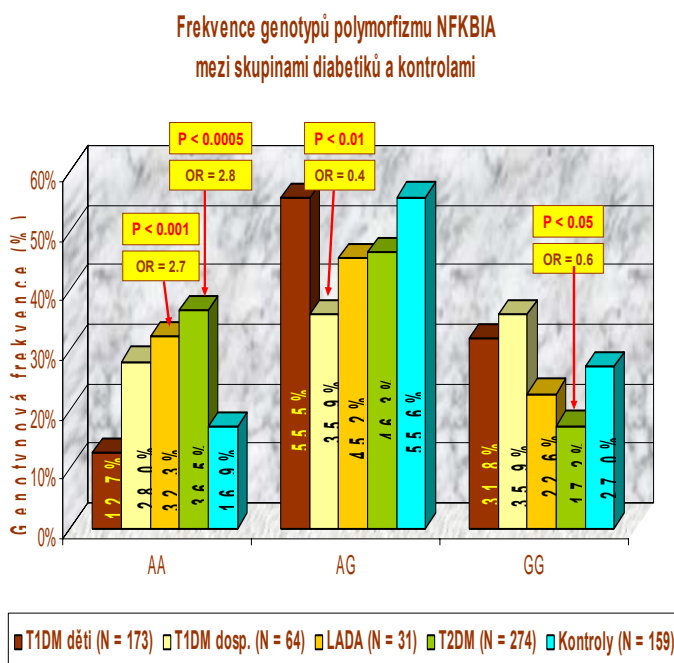
dospělých i dětí. K vysvětlení tohoto jevu se hodí jedna z HLA hypotéz, která poukazuje na možnou roli HLA-DR molekul jako ochranného faktoru, který na rozdíl od HLA-DQ molekul tlumí autoimunitní reakce. Vyšší množství DR molekul u dospělých pacientů by mohlo svědčit o brždění autoimunitního procesu.

Gen *MIC-A* patří společně s dalším funkčním genem *MIC-B* a s třemi pseudogeny do oblasti HLA I. třídy. Svoji expresí a funkcí se však významně odlišuje od klasických genů HLA I. třídy. MIC proteiny jsou považovány za markery stresu, jsou exprimovány na střevním epitelu a exprese je řízená „heat-shock“ promotorovým elementem. MIC proteiny slouží jako ligandy pro obecný aktivační receptor (NKG2D) NK buněk a receptor $\gamma\delta$ T-lymfocytů. Jsou schopné vázat nepolymorfnní struktury jako např. glykolipidy anebo uhlovodíky. Nalezli jsme statisticky významně vyšší frekvenci alely A5.1 u autoimunitního diabetu manifestovaného v dospělosti a dále také u systémového lupus erytematodu.

Analýza genů rodiny Rel/NF κ B (NFKB1, NFKBIA)

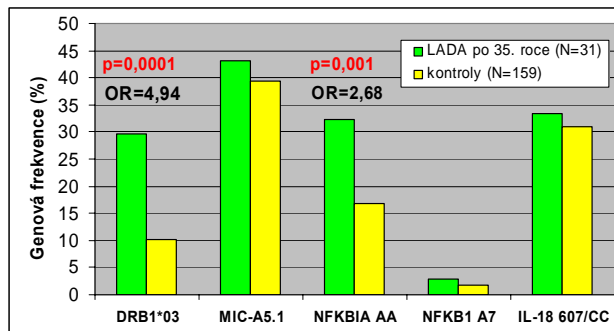
Jedním z atraktivních témat současného výzkumu je studium nukleárního faktoru kappa B (NF κ B). Je to univerzální transkripční faktor, jež má sjednocující funkci v kaskádě reakcí vyvolaných nejrůznějšími signály. Jeho aktivace je součástí stresové odpovědi organismu, reguluje expresi řady složek imunitního systému a podílí se i na embryonálním vývoji a vývoji tkání. V inaktivní formě je Rel/NF κ B systém sekvestrován v cytoplasmě, vázán na inhibitory NF κ B (I κ B). Fosforylace I κ B kinázami, s následnou ubikvitinizací a degradací inhibitoru v proteazomu, vede k uvolnění NF κ B proteinů a k jejich translokaci do jádra, kde se vážou na specifické sekvence v promotoru či enhancerových oblastech cílových genů. Naše asoiační studie se týkala nejběžnějšího heterodiméru p50-p65, a to jeho regulující části p50, pocházející z prekurzoru p105, kódovaného genem *NFKB1*, a na tento dimér vázajícího se inhibičního proteinu, I κ B α kódovaného genem *NFKBIA*.

Zjistili jsme asociaci genotypu AA genu *NFKBIA* nejen s LADA, ale také s diabetem 2. typu. U diabetu 1. typu manifestovaného v dospělosti byla genotypová frekvence také zvýšená, ale nedosahovala statistické významnosti. Oproti tomu hodnoty u diabetu dětského věku se nelišily od kontrolních. Fakt, že polymorfismus systému NF κ B souvisí nejen s autoimunitním, ale i metabolickým onemocněním, svědčí v buňce o jeho univerzální sjednocující funkci. Co se týče možného vztahu NF κ B k diabetu 2. typu, je v literatuře popsána zvýšená aktivace kináz NF κ B, která vede k inzulínové rezistenci. Snížené frekvence u ostatních genotypu GG a AG mohou být pravděpodobně kompenzačním efektem, protože nedosahují takové významnosti.



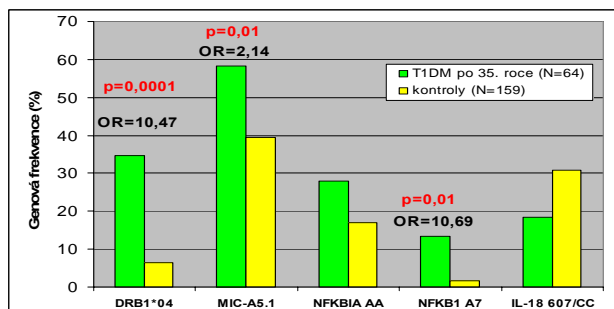
Vzhledem k tomu, že se nám při DNA analýze potvrdil význam NF κ B jako univerzálního převodníku buněčné signalizace, rozšířili jsme naši studii jednak o diabetické komplikace, jednak o další autoimunitní onemocnění. Našli jsme asociaci genotypu AA genu *NFKBIA* s makrovaskulární komplikací diabetu, aterosklerózou, ale nikoliv s diabetickou nefropatií. Dále jsme zjistili asociaci tohoto genotypu s revmatoidní artritidou, ale nikoliv se systémovým lupus erytematodem. Analýza genové exprese v antigen-prezentujících buňkách periferní krve nezjistila žádné rozdíly v závislosti na genotypu či chorobě.

Shrnutí výsledků pro skupinu LADA s manifestací po 35. roce života



Hlavní a jediný HLA predispoziční faktor pro skupinu LADA je alela *DRB1*03*. Ostatní HLA alely nebyly nalezeny ve významné souvislosti s onemocněním. Dále tato skupina je asociována s genotypem AA genu kódující inhibiční protein alfa v Rel/NFκB systému (*NFKBIA*).

Shrnutí výsledků pro skupinu T1DM s manifestací po 35. roce života



Hlavní HLA predispoziční faktor pro skupinu T1DM s manifestací po 35. roce života je alela *DRB1*04*. Není ale jediná riziková HLA alela, s ní je ve vazbě další predispoziční alela *DQB1*0302*. Dále tato skupina je asociována s mikrosatelitovými polymorfizmy genů *MIC-A* a *NFKB1*.

Shrnutí výsledků projektu

Z našich pozorování vyplývá, že autoimunitní diabetes manifestovaný v dospělosti (po 35. roce života) má jiná predispoziční rizika než autoimunitní diabetes manifestovaný v dětském věku. Genový polymorfismus Rel/NFκB systém představuje rizikový faktor pouze u diabetu s manifestací v dospělosti, a nikoliv v dětském věku. Alelový polymorfismus HLA systému je sice asociován s autoimunitním diabetem v obou věkových kategoriích, ale pro každou skupinu pacientů jsme popsali specifickou asociaci.

Rovněž dále platí, že imunogenetická predispozice pro skupinu LADA je částečně odlišná od imunogenetické predispozice pro skupinu T1DM s manifestací po 35. roce života. *HLA-DRB1*03* je asociován pouze s LADA a nikoliv s T1DM dospělých.

Promotorový polymorfismus IL-18 nebyl asociován s žádnou skupinou diabetu, ale našli jsme zde statisticky signifikantní rozdíl mezi jednotlivými skupinami pacientů, což podporuje naše závěry ohledně částečně odlišné etiopatogeneze jednotlivých skupin diabetu.

U polymorfismus regulačních sekvencí genu pro inzulin jsme nezjistili asociaci s autoimunitou, jak je uváděno jinými autory, ale s hladinou C-peptidu. Je vedle genu kódující inhibiční protein alfa v Rel/NFκB systému další faktor představující společné genetické riziko pro diabetes mellitus 1. i 2. typu.

Závěr

Naše studie patří k jedněm z prvních studií, které se komplexněji zabývají problematiku autoimunitního diabetu manifestovaném po 35. roce života. Doposud se diabetes dospělých zužoval pouze na typ LADA a sledování jediné predispozice, a to HLA alel.

Analýzy jednotlivých predispozičních genetických i environmentálních faktorů nám dovolí lépe pochopit etiopatogenezi autoimunitního diabetu. Předpokládá se, že odhalení všech rizik ovlivňujících vznik a průběh choroby umožní zavedení její cílené prevence a léčby.

Publikace vztahující se k tématu přednášky

1. Cerna M, Novota P, Kolostova K, Cejkova P, Zdarsky E, Novakova D, Kucera P, Novak J, Andel M : HLA in Czech adult patients with autoimmune diabetes mellitus: comparison with Czech children with type 1 diabetes and patients with type 2 diabetes. *European Journal of Immunogenetics*, 2003: 30: 401-407.
2. Novota P, Kolesár L, Slavčev A, Černá M : Fluorescence-based automated fragment analysis of microsatellite polymorphism within the transmembrane region of the MIC-A gene. *Folia Biologica (Praha)*, 2004: 50: 21-23.
3. Pintérová D, Černá M, Kološtová K, Novota P, Čimburová M, Romžová M, Kuběna A, Anděl M : The frequency of alleles of the Pro12Ala polymorphism in PPAR γ 2 is different between healthy controls and patients with type 2 diabetes. *Folia Biologica (Praha)*, 2004: 50: 153-156.
4. Novota P, Cerna M, Kolostova K, Cejkova P, Zdarsky E, Novakova D, Kucera P, Novak J, Andel M : Diabetes mellitus in adults: association of HLA DRB1 and DQB1 diabetes risk alleles with GADab presence and C-peptide secretion. *Immunology Letters*, 2004: 95: 229-232.
5. Novota P, Kolostova K, Pinterova D, Novak J, Treslova L, Andel M, Cerna M : Interleukin IL-18 gene promoter polymorphisms in adult patients with type 1 diabetes mellitus and latent autoimmune diabetes in adults. *Immunology Letters*, 2005: 96: 247-251.
6. Romzova M, Hohenadel D, Kolostova K, Pinterova D, Cerna M, Rychlik I : Association of the polymorphism in the 3'UTR of NFKBIA gene (Inhibitor of Nuclear Factor Kappa Beta Gene) with diabetic nephropathy. In Timio M, Wizemann V, Venanzi S, eds.: *Cardionephrology 9*. Editoriale Bios Castrolibero – Italy 2005, 75-78. (ISBN 88-7740-388-8)
7. Novota P, Kolostova K, Pinterova D, Novak J, Weber P, Treslova L, Kovar J, Andel M, Cerna M : Association of MHC class I chain related gene-A microsatellite polymorphism with the susceptibility to T1DM and LADA in Czech adult patients. *International Journal of Immunogenetics*, 2005: 32: 273-275.
8. Romzova M, Hohenadel D, Kolostova K, Pinterova D, Fojtikova M, Ruzickova S, Dostal C, Bosak V, Rychlik I, Cerna M: NF κ B and its inhibitor I κ B in relation to type 2 diabetes and its microvascular and atherosclerotic complications. *Human Immunology*, 2006: accepted.
9. Kolostova K, Pinterova D, Novota P, Romzova M, Cejkova P, Pruhova S, Lebl J, Treslova L, Andel M, Cerna M: HLA, NFKB1 and NFKBIA gene polymorphism profile in autoimmune diabetes mellitus patients. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 2006: accepted.

Granty, kterými byl projekt financován

IGA MZ NB/7432-3/03: Význam dědičných prognostických znaků diabetes mellitus 1. typu pro klinickou diagnózu a prognózu (řešitel MUDr. Marie Černá) - *hodnocení Závěrečné zprávy v kategorii A*

MSM 111200001: Prevence, diagnostika a terapie iniciálních stádií diabetu a metabolických, endokrinních a environmentálních poškození organismu (koordinátor Prof. MUDr. Anděl, CSc.)

MSM 0021620814: Prevence, diagnostika a terapie diabetes mellitus, metabolických a endokrinních poškození organismu (koordinátor Prof. MUDr. Anděl, CSc.)