

Genetická determinace věku diagnózy diabetes mellitus 2. typu? Revidovaná koncepce „střádavého genotypu“ – editorial

K. Kaňková

Ústav patologické fyziologie Lékařské fakulty MU Brno, přednostka prof. MUDr. Anna Vašků, CSc.

Dobříková M et al. Vztah polymorfizmů genů *CDKAL1* a *KCNQ1* k věku diagnózy diabetu 2. typu v populaci Slováků. Vnitř Lék 2011; 57(2): 155–158.

Uplynulých několik málo let přineslo díky výsledkům celogenomových asocičních studií (anglicky genome-wide association study – GWAS) poměrně radikální změnu v chápání etiopatogeneze nejběžnějšího typu diabetes mellitus – 2. typu (DM2T), ale rovněž přehodnocení očekávání kladených do prediktivní genetiky. DM2T je ukázkovým typem komplexního onemocnění, které vzniká jako důsledek interakce mezi zevními a genetickými faktory. Ve světle současných poznatků lze zjednodušeně říci, že manifestní DM2T se rozvine u člověka, který během svého života neúměrně stupňuje požadavky na syntézu inzulínu zvyšováním periferní inzulínové rezistence (fyzickou inaktivitou, expanzí tukové tkáně, kvalitou diety aj.) a u něhož je schopnosti proporcionálně kompenzovat inzulínovou rezistenci hyperinzulinemií omezená. Právě kapacita kompenzatorní hyperinzulinemie se zdá být interindividuálně variabilní a z části geneticky determinovaná (což mimo jiné ukázaly doposud provedené GWAS). Většina dnešní populace v industrializovaných zemích je exponována stejným „metabolickým nástrahám“ – neomezené množství palatabilní a kaloricky bohaté stravy, komfortní způsob života s minimem pohybu, stres, horší kva-

lita spánku atd. – ale důsledky nejsou pro všechny stejné. Porucha se nejčastěji vyvine u toho, kdo má malou kapacitu kompenzovat pokles inzulínové citlivosti vyšší tvorbou inzulínu, bude trvat tím déle a dojde větší závažnosti (komplikace) čím časněji vznikla a její léčba bude úměrně tomu nákladná. Navíc v situaci, kdy již není možné udržet normální poměry sacharidového a lipidového metabolismu, dochází k další akceleraci poruchy syntézy inzulínu β -buňkami v důsledku glukosa a lipotoxicity. Pochopitelně, že existují extrémy (lidé zjevně bez minima rizikových faktorů či s nimi, a přesto diabetici, a naopak tzv. metabolicky zdraví obézní), ale pro většinu populace zřejmě platí výše uvedený prototypický scénář.

To, že existuje určitá genetická dispozice pro DM2T, naznačovala již epidemiologická data, konkrétně jeho familiární agregace. U přímých příbuzných postižených je asi 3násobné riziko vzniku DM2T ve srovnání s nepostiženými rodinami (sibling recurrence risk ratio = 3,5) [1,2]. Je to sice velmi mírné riziko ve srovnání s jinými onemocněními (včetně jiných typů diabetu jako DM1T či MODY), ale vzhledem k populační prevalenci DM2T byl zájem o poznání podstaty jeho gene-

tické predispozice a možností predikce obrovský. Realizaci GWAS předcházela zhruba dekáda, během níž se lokusy hypoteticky zvyšující individuální riziko rozvoje DM2T logicky hledaly všemi tehdy dostupnými geneticko-epidemiologickými metodami, tedy převážně asocičními studiemi typu „kontroly-případy“ (zpravidla vždy pro jediný vybraný kandidátní gen) anebo, v omezené míře, vazebním mapováním. Oba přístupy bohužel nutně selhávaly, a to z mnoha důvodů, jakými jsou např. spojitý charakter fenotypu, chybná konstrukce kontrolních skupin a zejména naše neznalost patogeneze DM2T, a tedy chybný výběr kandidátních genů v případě asocičního přístupu a pozdní manifestace poruchy, neúplná penetrance, absence více-generačních rodin a neznámý model dědičnosti u vazebného přístupu. GWAS většinu z tohoto nepotřebují. Pokroky v genetické technologii (platforma DNA chipů), bioinformatice (molekulárně biologické databáze) a pochopení rozsahu a struktury genetické variability lidského genomu (Human Genome Project a International HapMap Project) umožnily pracovat simultánně s obrovským množstvím genetických markerů (zejména jednonukleotidových polymorfizmů,

anglicky single nucleotide polymorphisms – SNPs). Jako GWAS bývají konvenčně označovány studie pracující alespoň s 150 000 SNPs (ale běžně více), což je akceptovatelné minimum k orientačnímu pokrytí genomové variability při stávající vazebné nerovnováze. Kolem 500 000 až 1 000 000 SNPs je dnes možno rutinně detekovat pomocí jediného chipu (Affymetrix či Illumina) během několika hodin s vysokou přesností a zejména za cenu, která činí tyto analýzy ne sice levné, ale tč. proveditelné. Odhaduje se, že k pokrytí variability až na úrovni variant s populační frekvencí 1% bude potřeba asi 5 000 000 SNPs a tyto platformy budou v nejbližší době komerčně dostupné.

Z jakých předpokladů vycházela první generace GWAS a vůbec hledání genetické determinace DM2T? Za prvé vzhledem k malé heritabilitě intermediálních fenotypů DM2T (inzulinová citlivost a senzitivita) dohromady reprezentující maximálně asi 26% celkového rizika DM2T jsou k průkazu významné asociace potřeba obrovské počty studovaných osob, typicky tisícové soubory. To je nad síly jednotlivých pracovišť a nutně vede k vytváření mezinárodních genetických konsorcií. Druhým důležitým faktorem je arbitrární stanovení hladiny statistické významnosti $< 5 \times 10^{-8}$ pro celogenomovou asociaci. Toto číslo odpovídá konvenční hladině 0,05 korigované na 1 000 000 testů, což je zhruba počet nezávislých markerů (SNPs) nutných při doposud známé haplotypové struktuře (tj. míře vazebné nerovnováhy $r^2 > 0,8$ mezi sousedními markery) k pokrytí větší části variability v rozsahu celého genomu. Takto stringentní kritérium značně snižuje pravděpodobnost spekulativních a nereprodukovatelných asociací. Doposud bylo pomocí několika GWAS v evropské populaci a jejich metaanalýz (např. DIAGRAM, společně s in silico imputovanými geny asi 2 500 000 SNPs) identifikováno přes 40 genů zvyšujících riziko DM2T [3]. Při pohledu na výčet genů a jejich

funkci jednoznačně dominují lokusy ve vztahu k dysfunkci β -buněk [4], což bylo pro některé překvapením, pro jiné potvrzením zásadní patogenetické role inzulinové sekrece při rozvoji poruchy. Dodatečně zajímavé výsledky pocházejí ze GWAS kvantitativních metabolických fenotypů (např. MAGIC).

Přes všechny metodologické pokroky jsou i první generace GWAS poplatné době a pohled na jejich výsledky a efektivitu bude za několik let – v kontextu nových poznatků – jiný. Např. fakt, že nejsilněji asociované SNPs pro DM2T – v genu *TCF7L2* – vykazuje alelické relativní riziko kolem 1,5 [5] a všechny ostatní SNPs mnohem nižší, naznačuje, že větší část genetického rizika není současnými GWAS zachycena, protože doposud identifikované varianty vysvětlují empiricky popsané genetické riziko maximálně z 10% [6]. Kde tedy leží „chybějící dědičnost“ a jak ji nalézt? Bude zřejmě potřeba přehodnotit současné genetické paradigma komplexních nemocí, totiž hypotézu „common disease = common variant“. Asociační studie principiálně stojí na analýze četností běžných variant a z tohoto pohledu jsou zřejmě další očekávání vkládaná do druhé generace GWAS, tedy hustějšího pokrytí genomu běžnými SNPs a také délkovými polymorfizmy (tzv. copy-number variations – CNV) v současné době minimálně zastoupenými, asi nerealistická, protože odhalí už jen další mnohem slaběji asociované varianty a neposunou naše vysvětlení genetického rizika zásadním způsobem. V této souvislosti se dostávají do popředí zájmu populačně vzácné, ale individuálně významné varianty („common disease = rare variants“?), které početně mnohonásobně převyšují běžné. Jsou odhalitelné celogenomovým sekvenováním a porovnáním mnoha genomů. To byl úkol donedávna neproveditelný z časových a finančních důvodů. Konsorcium „The 1000 Genomes Project“ počínaje rokem 2008 ohlásilo záměr detailně popsat strukturu genetické variability lidského genomu pomocí celogeno-

mového sekvenování jako východisko pro další generaci geneticko-epidemiologických iniciativ v humánní medicíně. Cílem je systematická katalogizace nízkofrekvenčních variant (frekvence menšinové alely, $MAF \geq 1\%$) napříč celým genomem a nad to vzácných variant ($MAF \geq 0,5\%$) v kódujících oblastech (SNPs i CNV), stanovení jejich frekvence a zpřesnění našich dosavadních znalostí haplotypové struktury, k čemuž bude potřeba sekvenace více než 2 000 individuů. Letos byly publikovány výsledky pilotní fáze projektu [7], které např. naznačily některé zajímavé posuny v chápání vztahu genotyp-fenotyp (překvapivě velký počet „loss-of-function“ mutací, asi 250–300/na osobu).

Další generace GWAS budou technologicky jistě intenzivně stavět na nových poznatcích zejména o úloze vzácných variant a CNV, ale co je nejdůležitější, do popředí zájmu se nutně musí dostat analýza mezigenových interakcí a interakcí genů s faktory prostředí, ale zejména potřeba pregnantně definovaného fenotypu. A to nejen klinického, ale případně i s využitím systémové biologie (metabolomika, proteomika, transkriptomika aj.). Tedy co možná největší eliminace chyb, kterými byla zatížena první generace GWAS. V mezičase je ale jistě logickým krokem pokusit se o replikace výsledků stávajících GWAS např. s využitím pre-selektovaných platform (např. Metabo-Chip, Illumina), GWAS jiných etnik či geografických populací, odhalení kauzálních variant cíleným resekvenováním a o funkční vysvětlení nalezených asociací [8]. Právě vysvětlení molekulární podstaty asociované záměny je nutným krokem k objasnění patogenetického vztahu genotyp – fenotyp. Autoři Dobříková M et al se v článku „Vztah polymorfizmů genů *CDKAL1* a *KCNQ1* k věku diagnózy diabetes mellitus 2. typu v populaci Slovenska“ v tomto čísle Vnitřního lékařství pokouší o analýzu eventuálního efektu nosičství dvou vybraných variant – rs77569982 v *CDKAL1* (kóduje inhibitor cyklinde-

pendentní kinázy 5, aktivní komplex snižuje expresi inzulinu) a rs163184 v *KCNQ1* (kóduje podjednotku napětím vrátkovaného draslíkového kanálu exprimovaného v β -buňkách regulujícího sekreci inzulinu) – z těchto asociovaných pomocí GWAS v evropské populaci k době diagnózy DM2T. Podobně byl dříve v několika studiích analyzován efekt nejsilněji asociovaného *TCF7L2*, kde nosiči rizikových variant vykazovali signifikantně nižší věk nástupu DM2T [9–11]. V případě *CDKAL1* a *KCNQ1* nebyla prozatím podobná analýza publikována. Ve slovenské populaci významný efekt nalezen nebyl, což má jistě řadu možných vysvětlení (malý počet studovaných subjektů, slabší efekt rizikových variant, doba diagnózy nekoresponduje se skutečným nástupem onemocnění aj.). Nicméně i přesto se jedná o zajímavou a naprosto legitimní studii navazující na první generaci GWAS.

Negativní výsledky slovenských autorů také dobře dokumentují fakt, že dosavadní GWAS nás neposunuly o nic blíže k možnosti individuální predikce genetického rizika. Pokud by prediktivní využití mělo být jediným přínosem GWAS, musely by současné výsledky nutně vést k velkému zklamání. Přesto se domnívám, že opak je pravdou. Dosavadní GWAS pro DM2T přinesly a budoucí dále přinesou jistě mnoho nového např. v oblasti

humánní genetiky, genomiky a epigenetiky, farmakologie, farmakogenetiky, bioinformatiky a v neposlední řadě patofyziologie. Velmi obrazně řečeno se prozatím potvrdilo, že platí dle za pohodlný způsob života jsou naše β -buňky, ale nikdo bohužel neznáme stav svého konta. Prediktivní genetika by výhledově mohla být takovýmto finančním poradcem. Je otázkou, jak bychom s informací naložili, zda ti, kteří jsou „chudí“, by skutečně začali úpravou režimu a metabolických parametrů inzulinem šetřit nebo – jak je dnes obvyklé – žili na dluh v očekávání dalšího pohodlného řešení v budoucnosti v podobě spásné, vše řešící farmakoterapie.

Seznam zkratk

CNV – copy number variation
GWAS – genome-wide association study
MAF – minor allele frequency
MODY – maturity onset diabetes of the young
SNP – single nukleotide polymorphism
DM2T – type 2 diabetes mellitus

Literatura

1. Florez JC, Hirschhorn J, Altshuler D. The inherited basis of diabetes mellitus: implications for the genetic analysis of complex traits. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2003; 4: 257–291.
2. Gloyn AL. The search for type 2 diabetes genes. *Ageing Res Rev* 2003; 2: 111–127.
3. Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V et al. Twelve type 2 diabetes susceptibi-

lity loci identified through large-scale association analysis. *Nat Genet* 2008; 42: 579–589.

4. Staiger H, Machicao F, Fritsche A et al. Pathomechanisms of type 2 diabetes genes. *Endocr Rev* 2009; 30: 557–585.

5. Zeggini E, McCarthy MI. *TCF7L2*: the biggest story in diabetes genetics since HLA? *Diabetologia* 2007; 50: 1–4.

6. McCarthy MI, Zeggini E. Genome-wide association studies in type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 2009; 9: 164–171.

7. Durbin RM, Abecasis GR, Altshuler DL et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 2009; 467: 1061–1073.

8. Ruchat SM, Elks CE, Loos RJ et al. Association between insulin secretion, insulin sensitivity and type 2 diabetes susceptibility variants identified in genome-wide association studies. *Acta Diabetol* 2009; 46: 217–226.

9. Cauchi S, Meyre D, Dina C et al. Transcription factor *TCF7L2* genetic study in the French population: expression in human beta-cells and adipose tissue and strong association with type 2 diabetes. *Diabetes* 2006; 55: 2903–2908.

10. Lehman DM, Hunt KJ, Leach RJ et al. Haplotypes of transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene and its upstream region are associated with type 2 diabetes and age of onset in Mexican Americans. *Diabetes* 2007; 56: 389–393.

11. Kimber CH, Doney AS, Pearson ER et al. *TCF7L2* in the Go-DARTS study: evidence for a gene dose effect on both diabetes susceptibility and control of glucose levels. *Diabetologia* 2007; 50: 1186–1191.

prof. MUDr. Kateřina Kaňková, Ph.D.
www.med.muni.cz
e-mail: kankov@med.muni.cz

Doručeno do redakce: 24. 1. 2011