

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta



Dizertační práce

**Některé molekulární mechanismy
kalcium–fosfátového metabolismu u diabetu mellitu**

**Some molecular mechanisms of calcium phosphate
metabolism in diabetes mellitus**

Školitelka: prof. MUDr. Marie Černá, DrSc.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 15. 11. 2019

Marcela Vedralová

Podpis

Identifikační záznam:

VEDRALOVÁ, Marcela, *Některé molekulární mechanismy kalcium–fosfátového metabolismu u diabetu mellitu. [Some molecular mechanisms of calcium phosphate metabolism in diabetes mellitus]*. Praha, 2019, 98 stran. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Ústav lékařské genetiky. Vedoucí dizertační práce: Prof. MUDr. Marie Černá, DrSc.

Klíčová slova: diabetes, nefropatie, kalcium senzitivní receptor, parathormon, receptor pro vitamín D, polymorfismus

Key words: diabetes, nephropathy, calcium sensing receptore, parathyroid hormone, receptore for vitamin D, polymorphism

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat mé školitelce prof. Marii Černé za odborné vedení, trpělivost a cenné rady, které mi poskytovala během studia.

Také bych ráda poděkovala kolegům, Anně Kotrbové, Ph.D. a Martě Zajacové, Ph.D. za cenné rady a připomínky.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala mé rodině, která mě podporovala během studia.

Abstrakt

Zaměřili jsme se na studium polymorfizmů v genech pro receptor vitamínu D (*VDR*), parathormonu (*PTH*) a kalcium senzitivního receptoru (*CASR*). Proteinové produkty těchto genů významně ovlivňují kalcium–fosfátový metabolismus a podílí se na patogenezi jak samotného diabetu, tak ledvinového poškození.

Cílem této studie bylo zjistit, zda námi zkoumané polymorfizmy genů *VDR*, *PTH* a *CASR* nejsou spojeny s rizikem rozvoje diabetu mellitu a jeho ledvinových komplikací. Frekvence alel a genotypů byly studovány u jednotlivých skupin diabetických pacientů s ledvinovými komplikacemi a bez ledvinových komplikací pomocí TaqMan sond nebo metodou PCR-RFLP.

V porovnání se skupinou zdravých kontrol jsme zjistili, že polymorfismus *FokI* genu *VDR* je rizikový pro rozvoj diabetické nefropatie ($P < 10^{-4}$). Rovněž polymorfismus *BstBI* genu *PTH* je predispoziční pro rozvoj diabetické nefropatie ($P = 0,023$). *DraII* polymorfismus je predispoziční pro rozvoj diabetu a jeho ledvinových komplikací. U DN pacientů je haplotyp BBFFAATt genu *VDR* zastoupen častěji než u zdravých kontrol ($P = 0,046$), haplotyp BbFFAaTt je v porovnání se zdravými kontrolami častěji zastoupen u DM2 ($P = 0,018$). Haplotyp BBDD se zdá být predispozičním faktorem pro rozvoj samotného diabetu ($P = 0,019$).

Frekvence alel a distribuce genotypů polymorfizmů rs3804594 a rs1042636 genu *CASR* u zkoumaných skupin pacientů byly porovnávány s kontrolní skupinou zdravých dárců krve a s kontrolní skupinou nediabetických pacientů s ledvinovým selháním (NWD). Zjistili jsme, že polymorfismus rs3804594 je rizikovým faktorem pro rozvoj samotného diabetu (DM2 $P = 0,002$; NDRD = 10^{-3}) i nediabetického selhání ledvin ($P = 0,0005$).

Polymorfizmy rs1501898, rs1801725 a rs7652589 genu *CASR* byly zkoumány pouze u diabetiků 1. a 2. typu bez komplikací a porovnávány s kontrolní skupinou zdravých dárců krve. Zjistili jsme, že polymorfismus rs7652589 je asociován s diabetem 1. typu ($P = 0,0098$).

Abstract

We chose to study polymorphisms of vitamin D receptor gene (*VDR*), parathyroid hormone gene (*PTH*) and *CASR* gene whose protein products significantly affect calcium phosphate metabolism and are implicated in the pathogenesis of diabetes, which may also involve kidney damage.

The aim of this study was to find out whether the *VDR*, *PTH* and *CASR* polymorphisms are associated with the risk of developing diabetes mellitus and its renal complications. The frequencies of alleles and genotypes were studied in the groups of diabetic patients with and without kidney complications using either TaqMan probes or PCR-RFLP.

Comparison of patients with diabetic nephropathy (DN) and healthy subjects identified statistically significant difference for the *FokI* polymorphism in *VDR* gene ($P < 10^{-4}$) and also for the *BstBI* polymorphism in *PTH* gene ($P = 0,023$). *DraIII* polymorphism in *PTH* gene is associated with the risk of developing diabetes and its renal complications. In DN patients, the BBFFAATt haplotype of *VDR* gene was more frequent than in healthy subjects ($P = 0,046$), and the BbFFAaTt variant was more frequent than in DM2 patients ($P = 0,018$). The BBDD haplotype of *PTH* gene seems to be a predisposing factor for diabetes itself ($P = 0,019$).

The allele frequencies and genotype distribution for rs3804594 and rs1042636 polymorphisms *CASR* gene in the patient groups were compared with the control group of healthy subjects and the control group of non-diabetic renal failure (NWD) patients. We have found that rs3804594 polymorphism is a risk factor for the development of diabetes (DM2 $P = 0,002$; $NDRD = 10^{-3}$) itself and for non-diabetic renal failure ($P = 0,0005$).

Polymorphisms rs1501898, rs1801725 and rs7652589 *CASR* gene were studied only in type 1 and type 2 diabetes patients without complications and compared with the control group of healthy blood donors. We have found that rs7652589 polymorphism is associated with type 1 diabetes ($P = 0,0098$).

Obsah

1. Literární přehled.....	14
1.1 Diabetes mellitus.....	14
1.1.1. Epidemiologie.....	14
1.1.2. Klasifikace diabetu.....	15
1.1.3. Diagnostika diabetu.....	16
1.2. Diabetes 1. typu	17
1.2.1. Patofyziologie diabetu 1. typu.....	17
1.2.2. Dědičnost diabetu 1. typu	17
1.2.3. Negenetické faktory asociované s diabetem 1. typu	18
1.3. Diabetes 2. typu	19
1.3.1. Patofyziologie diabetu 2. typu.....	19
1.3.2. Dědičnost diabetu 2. typu	20
1.4. Komplikace diabetu.....	20
1.4.1. Akutní komplikace diabetes mellitus	21
1.4.2. Pozdní chronické komplikace	21
1.4.3. Patogeneze chronických komplikací	21
1.4.4. Diabetická nefropatie	22
1.5. Diabetes a metabolismus vápníku	23
1.5.1. Úloha vápníku.....	23
1.5.2. Klíčové složky systému vápníkové homeostázy	23
1.5.3. Parathormon	24
1.5.4. Vitamín D	24
1.5.5. Kalcitonin (CT)	25
1.5.6. Interakce mezi Ca^{2+} a fosfátovým metabolismem.....	26
1.5.7. Regulace sekrece PTH kalcium senzitivním receptorem.....	26
1.5.8. Regulace sekrece CT kalcium senzitivním receptorem	27
1.6. Kalcium senzitivní receptor	27
1.6.1. Struktura genu.....	27
1.6.2. Struktura proteinu.....	28
1.7. Ligandy a allosterické modulátory	30
1.8. Mutace <i>CASR</i> receptoru	32
1.8.1. Inaktivační mutace <i>CASR</i>	33

1.8.1.1. Familiární hypokalciurická hyperkalcémie	34
1.8.1.2. Novorozenecká těžká primární hyperthyreóza	34
1.8.2. Aktivační mutace CASR.....	34
1.8.2.1. Autozomálně dominantní hypokalcémie s hyperkalciurií (ADHH)	35
1.8.2.2. Bartterův syndrom V. typu	35
1.8.3. Onemocnění asociována s jinými poruchami kalcium senzitivního receptoru	35
1.8.3.1. Primární hyperparathyreóza (PHPT)	35
1.8.3.2. Sekundární hyperparathyreóza (SHPT)	36
1.8.3.3. Hyperkalcémie způsobená nádory	37
1.8.3.4. CASR a pankreatitida	38
1.9. CASR a sekrece inzulínu.....	39
1.10. Diabetes a s ním související změny kalciového metabolismu	39
1.11. Asociační studie.....	41
1.12. Námi studované polymorfizmy CASR.....	41
2. Cíle.....	43
3. Materiál a metody	44
3.1. Používaný materiál	44
3.2. Počítačové programy.....	45
3.3. Vzorky pacientů a jejich rozdělení do skupin	45
3.4. Pracovní postupy	47
3.4.1. Sběr vzorků	47
3.4.2. Izolace DNA	47
3.4.3. Stanovení čistoty a kvality DNA.....	47
3.4.4. Genotypizace <i>VDR</i> a <i>PTH</i>	48
3.4.5. Genotypizace <i>CASR</i>	51
3.4.5.1. PCR-RFLP genotypizace	51
3.4.5.2. Genotypizace pomocí TaqMan sond	53
3.4.6. Agarózová elektroforéza	54
4. Výsledky.....	55
4.1. Genotypizace <i>VDR</i> a <i>PTH</i>	55
4.1.1. Genotypizace polymorfizmu <i>FokI</i> genu <i>VDR</i>	56
4.1.2. Genotypizace polymorfizmu <i>BstBI</i> genu <i>PTH</i>	57
4.1.3. Genotypizace <i>Drall</i> polymorfizmu <i>PTH</i> genu	58
4.1.4. Porovnání kombinací genotypů <i>VDR</i> a <i>PTH</i> mezi skupinami DN, DM2 a zdravými kontrolami	59

4.2. Genotypizace <i>CASR</i>	60
4.2.1. Genotypizace polymorfizmů rs1042636 a rs3804594 genu <i>CASR</i>	60
4.2.1.1. Genotypizace rs3804594 genu <i>CASR</i>	61
4.2.1.2. Genotypizace rs1042636 genu <i>CASR</i>	63
4.2.2. Genotypizace rs1501898, rs1801725 a rs7652589 genu <i>CASR</i>	65
4.2.2.1. Genotypizace rs1501898 genu <i>CASR</i>	65
4.2.2.2. Genotypizace rs1801725	66
4.2.2.3. Genotypizace rs7652589	66
5. Diskuze.....	68
6. Závěr	76
7. Literatura	77
8. Přílohy.....	98

Seznam zkratek

A	Adenin
AA	Arachidonová kyselina
AAA	Polyadenylační místo
AC	Adenylát cykláza
ADHH	Autozomálně dominantní hypokalcémie s hyperkalciurií
ADP	Adenosindifosfát
AGE	Irreverzibilní produkty glykace
AKT/PI3K	Intracelulární signální dráha
AP-1 místo	Místo vazby transkripčního faktoru AP-1
ATP	Adenosintrifosfát
C	Cytosin
CaM	Kalmodulin
CAMK	Kalmodulin dependentní protein kináza
CASR	Kalcium senzitivní receptor
CCAAT box	Úsek DNA ležící v eukaryotickém promotoru RNA polymerázy II
CKD	Chronické selhání ledvin
CT	Kalcitonin
CTLA4	Cytotoxický T lymfocytární antigen 4
CYP27B1	Cytochrom P450
DAG	Diacylglycerol
dATP	2' - deoxyadenosin - 5' - trifosfát
dCTP	2' - deoxycytidin - 5' - trifosfát
dGTP	2' - deoxyguanosin - 5' - trifosfát
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus 1. typu
DM2	Diabetes mellitus 2. typu
DN	Diabetická nefropatie
DNA	2' - deoxyribonukleová kyselina
dNTP	2' - deoxyribonukleotid trifosfát
ECD	Extracelulární doména
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová

eNOS	Endoteliální forma syntetázy oxidu dusnatého
ER	Endoplazmatické retikulum
ERK	Protein kináza regulovaná buněčným signálem
ESRD	Terminální stádium ledvinového selhání
FGF	Fibroblastový růstový faktor
FHH	Familiární hypokalcirická hyperkalcémie
G	Guanin
GABAB2	Metabotropní transmembránový receptor pro gama-aminomáselnou kyselinu
GAD65	Protilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové
GDM	Gestační diabetes
GLUT	Glukozové transportéry
GPCR	C rodina membránových receptorů spřažená s G proteiny
GWAS	Celogenomové asociační studie
HCl	Kyselina chlorovodíková
HLA	Hlavní histokompatibilní systém
IA-2A	Protilátky proti proteinu podobnému tyrozin fosfatáze
IAA	Protilátky proti inzulínu
ICA	Protilátky proti cytoplazmě ostrůvkových buněk
ICD	Intracelulární doména
IFG	Zvýšená glykémie nalačno
IGF-1	Inzulínu podobný růstový faktor
IL	Interleukin
IL2RA	Interleukinový receptor 2A
iNOS	Inducibilní syntetáza oxidu dusnatého
INS-1 buňky	buňky „Rat Insulinoma Cell“
IP3	Inositol-3-fosfát
ITG	Porušená glukózová tolerance
JNK	Jun amino-terminální protein kináza
LADA	Latentní autoimunitní diabetes dospělých
Kb	Kilobáze
KCNJ11, KCNJ15	Draselné kanály

M	Marker, žebříček
MAPK	Mitogeny aktivovaná protein kináza
MEPE	Matrixový extracelulární protein
MODY	Monogenní diabetes „Maturity-onset diabetes of the young“
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
NDRD	Nediabetická nefropatie
NF-kB	Nukleární faktor kappa B
NO	Oxid dusnatý
NSHPT	Novorozenecká těžká primární hyperthyreóza
NWD	Nediabetičtí pacienti s chronickým selháním ledvin
oGTT	Orální glukózový toleranční test
P1, P2	Promotor 1, promotor 2 genu <i>CASR</i>
PA	Fosfatidová kyselina
PBS	Fosfátový pufr se solí
PCR	„Polymerase Chain Reaction“ (polymerázová řetězová reakce)
pH	Potenciál vodíku
PHPT	Primární hyperparathyreóza
PI3K, PI4K	Fosfatidylinositol-3-kináza, Fosfatidylinositol-4-kináza
PIP2	Fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PKC	Protein kináza C
PLA2	Fosfolipáza A2
PLD	Fosfolipáza D
PTH	Parathormon
PTHR	Receptor pro parathormon
PTHrP	Parathormonu podobná bílkovina
PTPN22	Tyrosin fosfatáza specifická pro lymfoidní linii
RCLB	Red Cell Lysis Buffer
RFLP	„Restriction Fragment Length Polymorphism“ (délkový polymorphismus restričních fragmentů)
Rho A	Protein „Ras homolog gene family, member A“
RNA	Ribonukleová kyselina
rs SNP	Referenční číslo jednonukleotidové záměny

RT-PCR	„Real-Time Polymerase Chain Reaction“ (kvantitativní polymerázová řetězová reakce)
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky
sFrp-4	Hormon „Secreted frizzle-related protein“
SHPT	Sekundární hyperparathyreóza
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus
SOC	Store-operated Ca ²⁺ kanál
SP	Signální peptid
SPINK1	Gen kódující inhibitor intrapancreatické trypsinové aktivity
STAT místo	Místo vazby transkripčního faktoru STAT
STZ	Streptozotocin
T	Thymin
TATA box	Sedminukleotidová sekvence DNA nacházející se v promotorové oblasti mnoha genů
TM, TMD	Transmembránová doména
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
U	Uracil
UTR oblast	Nepřekládaná oblast genu
VDCC	Napětově řízený kalciový kanál
VDRE	Vitamin D responzibilní element
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor
VTF	„Venus Fly Trap“ doména
WCLB	White Cell Lysis Buffer
WHO	Světová zdravotnická organizace
HWE	Hardy-Weinbergův zákon

1. Literární přehled

1.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (cukrovka, DM) je skupinou chronických, etiopatogeneticky heterogenních onemocnění se společným rysem-hyperglykemií. Vzniká v důsledku nedostatečného účinku inzulínu při jeho absolutním nebo relativním nedostatku a je provázen komplexní poruchou metabolismů tuků, cukrů a bílkovin (Bartoš a Pelikánová 2003).

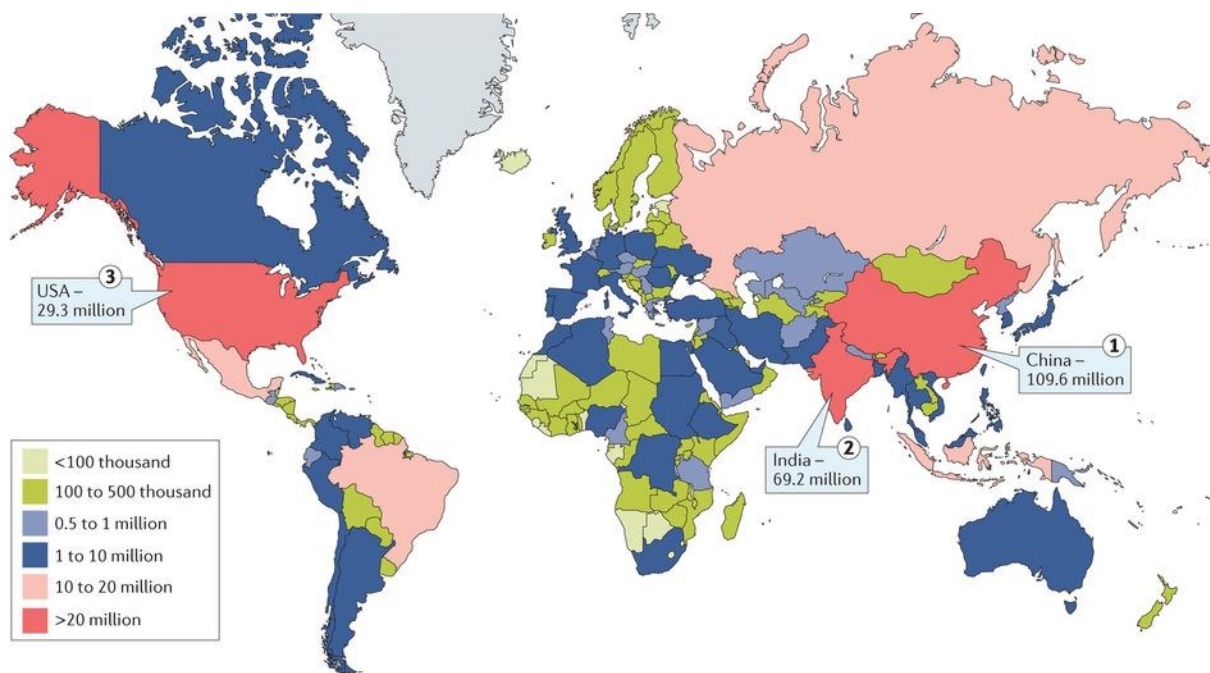
1.1.1. Epidemiologie

Diabetes mellitus byl ještě v první polovině 19. století onemocněním relativně řídkým. Postupná změna životního stylu ve 20. století vedla k jeho prudkému vzestupu. Dnes hovoříme často o celosvětové epidemii diabetu prostupující všemi etniky. World Health Organisation (WHO) zpracovává a vyhodnocuje údaje o celosvětovém výskytu diabetu, a studie z roku 2014 udává 422 mil. nemocných, které odpovídají 8,5% populace ve věku od 18 let. Na všech kontinentech se očekává další nárůst tohoto onemocnění, nejzřetelněji tam, kam proniká „západní“ styl života se všemi jeho důsledky.

V roce 2013 se v České republice léčilo s diabetem téměř 862 tisíc pacientů, což představovalo nárůst prevalence o 20 tisíc diabetiků oproti předchozímu roku. Prevalence tohoto onemocnění u obyvatel České republiky dosahuje 8,2 % a roste v dlouhodobém trendu, stejně jako počet jeho chronických komplikací.

U převážné většiny pacientů s diabetem je diagnostikován DM 2. typu (nezávislý na inzulínu). Jedná se o typické onemocnění středního a vyššího věku. Ke dni 31. 12. 2013 se v ČR léčilo s DM 2. typu 789 900 osob. DM 1. typu je zjištěn u necelých 7 % diabetiků, v roce 2013 to představovalo 58 901 osob, z toho 1 123 ve věku 0-14 let a 891 ve věku 15-19 let. Tento typ diabetu začíná obvykle v mladším věku a je při něm vyšší náchylnost k akutním komplikacím.

Z celkového počtu 861 647 léčených diabetiků k roku 31. 12. 2013, bylo 411 968 mužů, a 449 679 žen. Vyšší četnost tohoto onemocnění u žen lze v ČR vysvětlit průměrně vyšším věkem dožití (ÚZIS ČR 2015). 25 508 osob s diabetickým onemocněním v průběhu roku zemřelo. Diabetes byl jako hlavní příčina úmrtí uveden 3 748 případech (Informační systém Zemřelí, ČSÚ).



Nature Reviews | Endocrinology

Obrázek. 1: Odhad celosvětového počtu dospělých diabetiků (20-79 let)

Jednotlivé barvy znázorňují odhad celosvětového počtu dospělých diabetiků napříč všemi kontinenty. Počet pacientů s diabetem se v posledních třech desetiletích zvýšil čtyřnásobně. Asie je hlavní oblastí, kde prudce narůstá počet diabetiků. Dalšími takovými epicentry jsou Čína a Indie. Jedná se o země, kam proniká západní styl života se všemi jeho důsledky (Zheng *et al.* 2018).

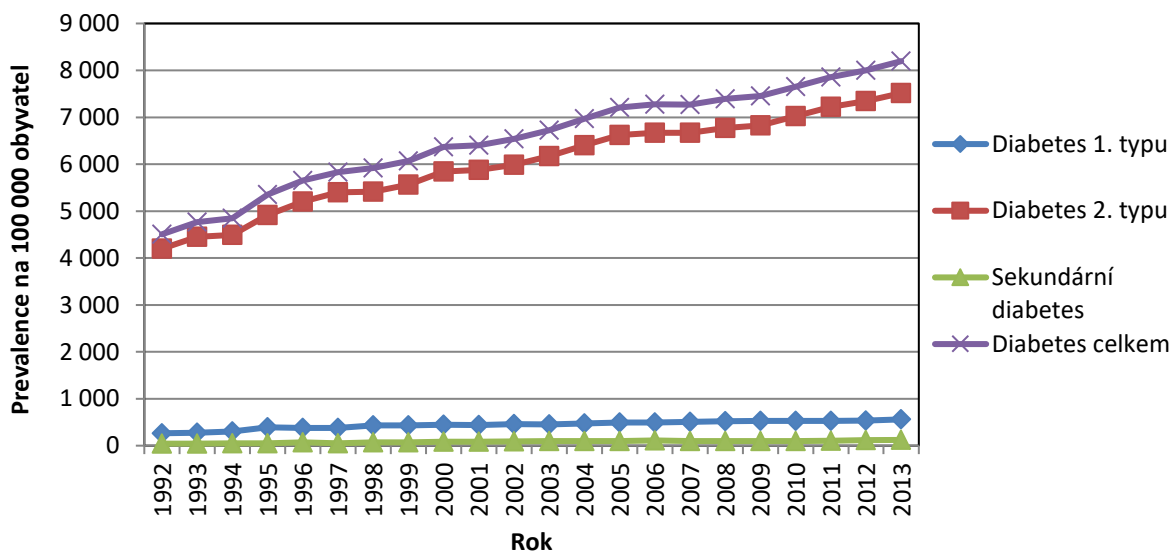
1.1.2. Klasifikace diabetu

Současná klasifikace rozděluje diabetes na 4 skupiny. Další 2 skupiny jsou označovány jako hraniční poruchy glukózy homeostázy (tzv. prediabetes) (American Diabetes Association 2010)

- 1) Diabetes 1. typu (DM1) včetně klinického průběhu LADA (Latent Autoimmune Diabetes in Adults)
 - A) Imunitně podmíněný (pozitivní autoprotiátky)
 - B) Idiopatický (negativní protiátky)
- 2) Diabetes 2. typu (DM2)
- 3) Gestační diabetes (GDM)
- 4) Ostatní specifické typy diabetu: monogenní diabetes-MODY; sekundární diabetes: diabetes při chronickém onemocnění pankreatu, při imunosupresi, endokrinopatiích a dalších.

Prediabetes:

- 1) Zvýšená glykémie nalačno (IFG, Impaired Fasting Glucose)
- 2) Porušená glukózová tolerance (IGT, Impaired Glucose Tolerance)
- 3) Kombinace obou poruch (IFG+ IGT)



Obrázek 2: Vývoj prevalence diabetes mellitus v ČR na 100 000 obyvatel v letech 1993-2013

Data za rok 2014 nebyla ze stejného zdroje publikována. Roční výkaz měl z důvodu technologických změn sběru velmi nízkou kompletnost. V rámci statistických stanovení se v ČR kromě diabetu 1. a 2. typu sleduje výskyt sekundárního diabetu (ÚZIS ČR 2015).

1.1.3. Diagnostika diabetu

DM 2. typu probíhá dlouhou dobu asymptomaticky, a diagnóza bývá často stanovena náhodně, v rámci vyšetření na jiné onemocnění. Laboratorní diagnostika je založena na stanovení glykémie jako jednoduchého parametru. Normální hladina glykémie nalačno je $\leq 5,6$ mmol/l. Podle WHO je diabetes metabolickou poruchou charakterizovanou hladinou glykémie nalačno $\geq 7,0$ mmol/l a glykemií za 2 hodiny $\geq 11,1$ mmol/l při orálním glukózovém tolerančním testu (oGTT) s podáním 75 g glukózy (American Diabetes Association 2010)

1.2. Diabetes 1. typu

1.2.1. Patofyziologie diabetu 1. typu

Jedná se o onemocnění, při kterém jsou postupně ničeny β -buňky Langerhansových pankreatických ostrůvků vlastním imunitním systémem. Destrukce β -buněk je způsobena útokem CD8-pozitivních cytotoxických T-lymfocytů, který je řízen CD4-pozitivními pomocnými (helper) T-lymfocyty. Postupně dochází k úplné destrukci těchto buněk produkujících inzulín, což vede k celoživotní závislosti pacienta na exogenním dodání inzulínu (Wang *et al.* 1991). Pro autoimunitní původ tohoto onemocnění také svědčí přítomnost autoprotilátek v krvi, které jsou zároveň jedním z kritérií rozlišení, zda se jedná o diabetes 1. nebo 2. typu. Tyto autoprotilátky se samy o sobě nechovají destruktivně. Autoprotilátky se nalézají u 85-90 % jedinců s DM 1. typu, zejména protilátky proti cytoplazmě ostrůvkových buněk (ICA), protilátky proti inzulínu (IAA), protilátky proti dekarboxyláze glutamové kyseliny (GAD65), protilátky asociované s inzulínomem-2 (IA-2A) a protilátky proti proteinu podobnému thyrozin-fosfatáze (Verge *et al.* 1996).

1.2.2. Dědičnost diabetu 1. typu

Dědičnost diabetu 1. typu má polygenní charakter, kde se uplatňuje jak vliv vnějšího prostředí, tak složka genetická. Tyto 2 složky spolu složitým, ne zcela jasným způsobem interagují. Míru dědičnosti DM1 dobře vystihuje konkordance mezi jednovaječnými dvojčaty, která se pohybuje v různých studiích od 22 % do 53 %, zatímco u dvojvaječných dvojčat je to od 2,5 % do 11 % (Kaprio *et al.* 1992).

Na základě pozorování rizik byl navržen model, podle kterého je diabetes vázán na jeden hlavní lokus s několika lokusy menšího významu, které působí epistaticky (Risch 1990). Právě HLA systém představuje 50% riziko rozvoje diabetu a s určitým sice menším přispěním (1/3) působí tzv. *non-HLA* geny. HLA systém byl nejprve popsán jako soubor genů, jejichž produkty jsou klíčové pro histokompatibilitu, tedy schopnost organismu přihojit se v organismu jiného jedince. Významnou roli pro rozvoj autoimunitních onemocnění hrají především HLA geny II. třídy (*DQA1*, *DQB1* a *DRB1*). Nejrizikovější *DR/DQ* haplotypy jsou *DR3-DQ1*0501-DQB1*0201* (*DR3*) a *DR4-DQA1*0301-DQB1*0302* (*DR4*), tyto haplotypy představují 30 %-50 % riziko rozvoje diabetu (Noble *et al.* 1996).

Non-HLA geny leží mimo *HLA* lokus a dosud bylo popsáno více než 40 genů. Mezi ty nejvýznamnější patří gen pro inzulin (*INS*), gen pro cytotoxický T lymfocytární antigen 4 (*CTLA4*), gen kódující tyrozin fosfatázu specifickou pro lymfoidní linii (*PTPN22*), gen pro interleukinový receptor 2 α (*IL2RA*), gen kódující virový senzor (*IFIH1*) a řada dalších genů nedávno popsaných v celogenomových asociačních studiích (GWAS) (Todd *et al.* 2007).

1.2.3. Negenetické faktory asociované s diabetem 1. typu

Existuje řada faktorů s prokázaným nebo předpokládaným vlivem na rozvoj diabetu 1. typu. Samy o sobě nejsou přímým etiologickým činitelem. Riziko je rozděleno mezi řadu faktorů, které jsou špatně definovatelné. Avšak v kombinaci s vnímavým genotypem mohou přispět k celkovému obrazu diabetu.

Hygienická hypotéza předpokládá, že snižující se četnost infekcí a nákaz v raném dětství a méně různorodá symbiotická střevní mikroflóra může odchýlit imunitní systém směrem k autoimunitě a atopii (Bach 2002, Gale 2002).

Jako potencionální spouštěč DM1 byly označeny určité virové infekce. Především je jedná o enteroviry, které vykazují tropismus k lidským pankreatickým ostrůvkům *in vivo* a *in vitro* (Tracy *et al.* 2011).

Dalšími kandidátními faktory jsou císařský řez a používání antibiotik v dětství. Tyto faktory se prolínají s vývojem a funkcí lidského mikrobiomu. Střevní bakterie ovlivňují metabolismus tuků a glukózy, imunitu a systémový zánět mimo střevo (Wen *et al.* 2008, Maslowski *et al.* 2011).

Předpokládá se, že i různé dietní faktory se mohou podílet na rozvoji DM1. Podle švédské studie krátkodobé kojení zvyšuje riziko rozvoje autoimunity u 5-letých dětí (Holmberg *et al.* 2007). Další studie toto nepotvrdily (Ziegler *et al.* 2003). Kojení v období, kdy jsou kojencům do stravy zaváděny obiloviny, snižuje riziko autoimunity ostrůvků pankreatu a diabetu 1. typu. Jako rizikovou potravinou bylo označeno kravské mléko. Studie však neprokázaly žádnou souvislost mezi DM1 a podáváním kravského mléka v raném období života (Holmberg *et al.* 2007).

Vitamín D má významnou funkci v regulaci imunitního systému a byl proto zkoumán jako potencionální ochranný faktor před rozvojem DM1. Bylo dokázáno, že vitamín D posunuje rovnováhu odpovědi T-buněk směrem T-helper. Sezónní charakter diagnózy diabetu 1. typu

by mohl být vysvětlen sezónními výkyvy v produkci vitamínu D po expozici slunečního záření (Weets *et al.* 2004).

Toxiny v potravinách by rovněž mohly aktivovat autoimunitní mechanismy u citlivých jedinců. Seznam prvků, chemikálií a přirozeně vyskytujících se mykotoxinů spojených s možným rizikem rozvoje DM1 je dlouhý. Některé studie poukazují na možnou spojitost mezi nitrosaminy, nitrity a nitráty obsaženými ve vodě (Benson *et al.* 2010) a potravě (Dahlquist *et al.* 1990), jiné studie toto zjištění nepotvrzují (Moltchanova *et al.* 2004, Muntoni *et al.* 2006, Zhao *et al.* 2001).

Vyšší porodní hmotnost (Harder *et al.* 2009, Cardwell *et al.* 2010) a rychlý nárůst hmotnosti ve věku 12-18 měsíců (Johansson *et al.* 1994, Hyppönen *et al.* 1999) je spojen s rozvojem diabetu 1. typu. Tato asociace byla pozorována ve skandinávských zemích, nikoliv v Německu či v USA (Magnus *et al.* 2015, Larsson *et al.* 2016). Hypotéza předpokládá, že nadbytek tělesného tuku vede k rezistenci na inzulin v raném dětství a může iniciovat autoimunitu ostrůvků pankreatu (Wilkin 2001).

Z bohatého výčtu možných vnějších činitelů je patrné, že hledat preventivní opatření je téměř nemožné.

1.3. Diabetes 2. typu

1.3.1. Patofyziologie diabetu 2. typu

Hlavní podíl na vzniku diabetu 2. typu u geneticky predisponovaného jedince představuje kombinace 2 dějů: rozvoj inzulinové rezistence v cílových tkáních a porucha inzulinové sekrece, přičemž kvantitativní podíl obou poruch může být rozdílný. Inzulinovou rezistencí (IR) rozumíme poruchu účinku inzulinu v cílové tkáni, kdy normální koncentrace volného plazmatického inzulinu vyvolává sníženou metabolickou odpověď, zejména v metabolismu glukózy. Snížený účinek nejprve slinivka kompenzuje nadbytečnou sekrecí inzulinu a hyperinzulinémií. Porucha glukózové homeostázy se projeví pouze při neschopnosti β -buněk přiměřeně zvýšit sekreci inzulinu. Právě selhání β -buněk je rozhodujícím krokem k progresi glukózové intolerance a později k manifestaci diabetu. Bylo zjištěno, že morfoloickým podkladem úbytku sekrece inzulinu a v průběhu onemocnění je apoptóza, která vede ke snížení masy β -buněk (Deng *et al.* 2004).

Hyperglykémie je součástí tzv. metabolického syndromu. Metabolický syndrom je souborem klinických, biochemických a humorálních odchylek, které zvyšují riziko aterosklerózy, jehož projevem je inzulínová rezistence, hyperinzulinémie a hyperglykémie (Kahn *et al.* 2005). Nejčastěji je IR způsobena obezitou. 90% diabetiků je obézních, avšak samotná obezita k manifestaci diabetu nestačí. Ke vzniku tohoto onemocnění také přispívá stres, nepravidelná strava a málo pohybu.

1.3.2. Dědičnost diabetu 2. typu

Dědičné genetické faktory zahrnují jak predispozici, tak rezistenci k chorobě. U tohoto typu diabetu je dědičnost polygenní a riziko přenosu na potomky není tak přesně vyčísleno. Problém je, že diabetes 2. typu vzniká až v dospělosti a navíc může dlouhou dobu probíhat skrytě, proto mohou být informace o jeho výskytu v rodině značně zkresleny. Na rozdíl od DM1 má incidence svůj vrchol u mužů mezi 45 a 65 lety, u žen mezi 50 a 55 lety. Riziko manifestace DM2 je vysoké a je závislé na dané populaci: ve většině populací se toto riziko udává v rozmezí 1-5 %. Nejvyšší bývá u etnických skupin amerických černochů, Mexičanů a Indiánů (kmen Pima v Arizoně), nejnižší u Eskymáků. V Evropě je nízké ve skandinávských zemích, relativně vysoké v jižní Evropě.

Jestliže jeden rodič má diabetes 2. typu, riziko rozvoje onemocnění u jeho dítěte je 10 %. Pokud oba rodiče trpí diabetem, riziko pro jejich potomka je 70 % (Tillil *et Köbberling* 1987). Konkordance u jednovaječných dvojčat dosahuje 70 %, zatímco u dvojvaječných je pouze 20 %-30 % (Kaprio *et al.* 1992). Nicméně podíl konkordance u monozygotních dvojčat může být zkreslený, protože oproti dizygotním dvojčatům monochorionická intrauterinní výživa monozygotních dvojčat způsobuje růstovou retardaci.

1.4. Komplikace diabetu

Před objevem inzulínu byla hlavní příčinou smrti diabetiků dekompenzace diabetu. Po objevu inzulínu Fredericem Bantingem v roce 1923 dochází k revoluci v léčbě diabetu a prodlužuje se významně život pacientů. Na druhou stranu, dlouhodobá diagnóza diabetu a jeho špatná kompenzace s sebou nese riziko rozvoje komplikací. Cílem léčby diabetu je předcházet akutním komplikacím a s léty trvání diabetu i specifickým makrovaskulárním i mikrovaskulárním komplikacím. Patogeneze jak diabetu 1. typu, tak 2. typu je složitá. Oba typy diabetu predisponují jedince k podobnému spektru komplikací.

1.4.1. Akutní komplikace diabetes mellitus

Akutní komplikace diabetu jsou příhody náhle vzniklé a patří mezi ně hypoglykemické a hyperglykemické stavy a jejich následky, tj. diabetická ketoacidóza, hyperosmolární syndrom a laktátová acidóza. Jsou to stavy těžké a život ohrožující.

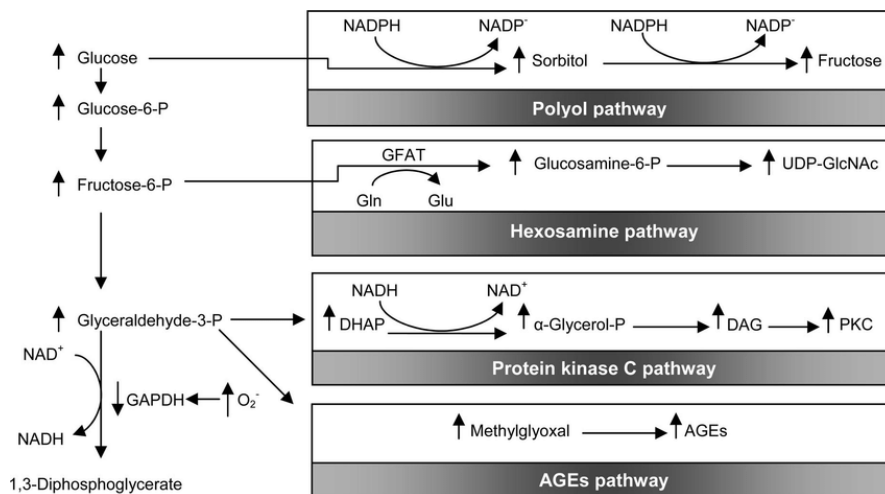
1.4.2. Pozdní chronické komplikace

Chronické komplikace dělíme na specifické a nespecifické. Mezi specifické patří mikroangiopatie projevující se jako diabetická nefropatie (DN), diabetická retinopatie a diabetická neuropatie. Mezi nespecifické komplikace patří akcelerace aterosklerózy a větší sklon k různým infekcím (zejména infekce močových cest, pyodermie, mykózy). Zvláště typická komplikace s komplexní patogenezí je diabetická noha.

1.4.3. Patogeneze chronických komplikací

Mezi základní rizikové faktory, které vedou k progresi specifických i nespecifických komplikací, patří zejména dlouhodobá opakovaná hyperglykémie a arteriální hypertenze. Patogeneze cévních změn souvisí s vystupňovaným oxidačním stresem, který postihuje endotel jako cílový orgán. Hyperglykémie způsobí zvýšený přesun glukózy z plazmy do endotelové buňky pomocí glukózových transportérů GLUT1. V buňce její zpracování vyvolá v mitochondriích zvýšenou tvorbu reaktivních forem kyslíku. Ty poté aktivují některé metabolické cesty, syntézu irreverzibilních produktů glykace (AGE) (Nessar 2005), hexosaminu (Ziyadeh *et al.* 1994), sorbitolu (Williamson *et al.* 1993), nebo zvýší aktivitu proteinkinázy C (Ischii *et al.* 1998), aktivují MAPK v ledvinách a signalizaci NF- κ B (Awazu *et al.* 1999).

Některé aminokyseliny jsou více reaktivní než jiné. Tato náchylnost ke glykaci souvisí s jejich hodnotou disociační konstanty. Ke glykaci jsou náchylnější proteiny s delší životností, které se během života téměř vůbec neobměňují, zejména proteiny oční čočky zvané krystaliny (Obšil a Pavlíček 1997). Jiným typem těchto proteinů jsou kolageny. Zkoumána byla glykace bazální glomerulární membrány, která byla u myši trpících diabetem mnohem vyšší než u myši bez diabetu (Cohen *et al.* 1980). AGE mohou vytvářet můstky mezi proteiny. Pentosidin vzniká jako produkt přemostění lysinových a argininových zbytků. Dalšími takovými produkty jsou glyoxal-lysinový dimer a metylglyoxal-lysinový dimer (Frye *et al.* 1998).



Obrázek 3: Úloha oxidačního stresu v aktivaci 4 klíčových biochemických cest vyvolané hyperglykemií

Při hyperglykémii se uplatňují 4 klíčové biochemické cesty: (i) zvýšený tok polyolovou cestou, ve které je glukóza redukována na sorbitol; (ii) zvýšená tvorba konečných pokročilých produktů glykace (AGE); (iii) aktivace protein kinázy C (PKC) s účinky v rozmezí od vaskulární okluze až po expresi prozánětlivých genů; (iv) zvýšený posun přebytků glukózy cestou hexosaminu zprostředkujícího zvýšenou transkripci genů pro zánětlivé cytokiny. Všechny cesty jsou aktivovány společným mechanismem: nadprodukcí superoxidových radikálů (Ceriello 2011)

1.4.4. Diabetická nefropatie

Klinicky je diabetická nefropatie charakterizována perzistentní, postupně narůstající albuminurií, hypertenzí a progresivním poklesem glomerulární filtrace, která vede až ke konečnému selhání ledvin a nutnosti dialýzy. Navzdory všem opatřením a intervencím, které jsou dostupné pro diabetické pacienty, tj. metabolickou kontrolu diabetu, léčivým přípravkům-inhibitorům angiotenzin konvertujícího enzymu, antagonistům angiotenzinových receptorů a antagonistům mineralokortikoidního receptoru, zůstává DN nejčastější příčinou selhání ledvin v Evropě i v USA (de Boer *et al.* 2011; Rosolowsky *et al.* 2011).

Většina pacientů v terminálním stádiu ledvinového selhání vykazuje sekundární hyperparathyreózu (SHPT), která se zhoršuje s trváním renální substituční terapie.

1.5. Diabetes a metabolismus vápníku

1.5.1. Úloha vápníku

Vápník je nepostradatelným prvkem v lidském těle. Jak extracelulární, tak intracelulární uložení vápníků má svůj podstatný význam v mnoha biologických procesech (Brown *et al.* 2001). Kalcium je z 99 % uloženo v kostní hmotě a zubech jako hydroxyapatit a 1 % je ve formě kalciových iontů součástí vnitřního prostředí organismu. V plazmě je vápník ze 40 % vázaný na proteiny (albumin, globulin), ze 13 % vázaný na anionty (citrát, bikarbonát) a ze 47 % je volně ionizovaný. Koncentrace vápenatých iontů v séru (kalcémie) je 2,25-2,75 mmol/l a ionizovaného vápníku 1,1-1,4 mmol/l. Ionizovaná forma slouží jako jediná aktivní forma vápníku v plazmě. Kalcium má mnohočetné biologické funkce. Nejznámější je jeho úloha při výstavbě a přestavbě kostní hmoty, dodává kostem pevnost a odolnost. Právě kosti slouží jako depotní zásoba vápníku (Wang *et al.* 2006).

V extracelulárním prostoru zajišťuje vápník integritu plazmatické membrány a vystupuje také jako důležitý kofaktor v proteinech, které jsou nezbytné pro srážení krve, slouží jako adhezní molekuly nebo jako sekreční enzymy, např. trypsin (Brown *et al.* 2001). Intracelulární vápenaté ionty aktivují exocytózu a slouží jako mediátory svalové kontrakce (Hofer *et al.* 2003). Podílí se na přenosu vzruchů v neuronech. Hraje zásadní roli v buněčné signalizaci, vápník slouží jako druhý posel, zprostředkovává účinek hormonů, cytokinů a dalších mediátorů (Berridge *et al.* 2000). Podílí se na buněčném dělení, genové expresi, energetickém metabolismu a stárnutí buňky vazbou vápenatých iontů na intracelulární senzory (Yanez *et al.* 2012), např. na kalmodulin (Klee *et al.* 2002). Každá z těchto funkcí je sama o sobě tak významná, že je pochopitelné, jak těsně musí být hladina vápníku regulována. Čidlem vápníkové homeostázy je kalcium senzitivní receptor (CASR), který snímá odchylky v koncentraci Ca^{2+} . Ten aktivuje další systémy v ledvinách, střevu a kostech, které obnoví jeho fyziologickou koncentraci (Brown 2007).

1.5.2. Klíčové složky systému vápníkové homeostázy

Homeostáza vápníku probíhá na 3 úrovních. První složku představují vápenaté senzory, které měří hladinu vápníku a její odchylky (Brown 2007). Druhou složkou systému jsou hormony, které jsou buď přímo, nebo nepřímo kontrolovány Ca^{2+} senzory. Hormonální regulace hladiny vápníku je úzce spjata s regulací hladiny fosfátů a podílí se na něm především parathormon (PTH) a jeho receptor (Potts *et al.* 2007), vitamín D (kalcitriol) a jeho

receptor (Jurutka *et al.* 2001), kalcitonin a jeho receptor (Pondel 2000) a kalcium senzitivní receptor (CASR), (Brown 2007) vázající vápenaté ionty. Vedle těchto hormonů se při regulaci kalcium-fosfátového metabolismu podílejí hormony štítné žlázy, trijodthyronin a thyroxin. Dalšími faktory ovlivňující hladinu Ca^{2+} jsou estrogeny, androgeny, glukokortikoidy, prolaktin, inzulínu podobný růstový faktor IGF-1 a fibroblastový růstový faktor FGF-23 (Berndt *et al.* Kumar 2009). Nejen hladina vápníku v plazmě, ale celkový metabolismus vápníku je řízen výše zmíněnými hormony a faktory. Třetí složku představují buňky v ledvinách, střevu a kostech, které umožňují vektorový pohyb vápenatých iontů směrem ven nebo dovnitř buňky, tak aby byla zajištěna adekvátní absorpce vápníku ve střevě, jeho uchování v kostech a vylučování přebytku Ca^{2+} močí.

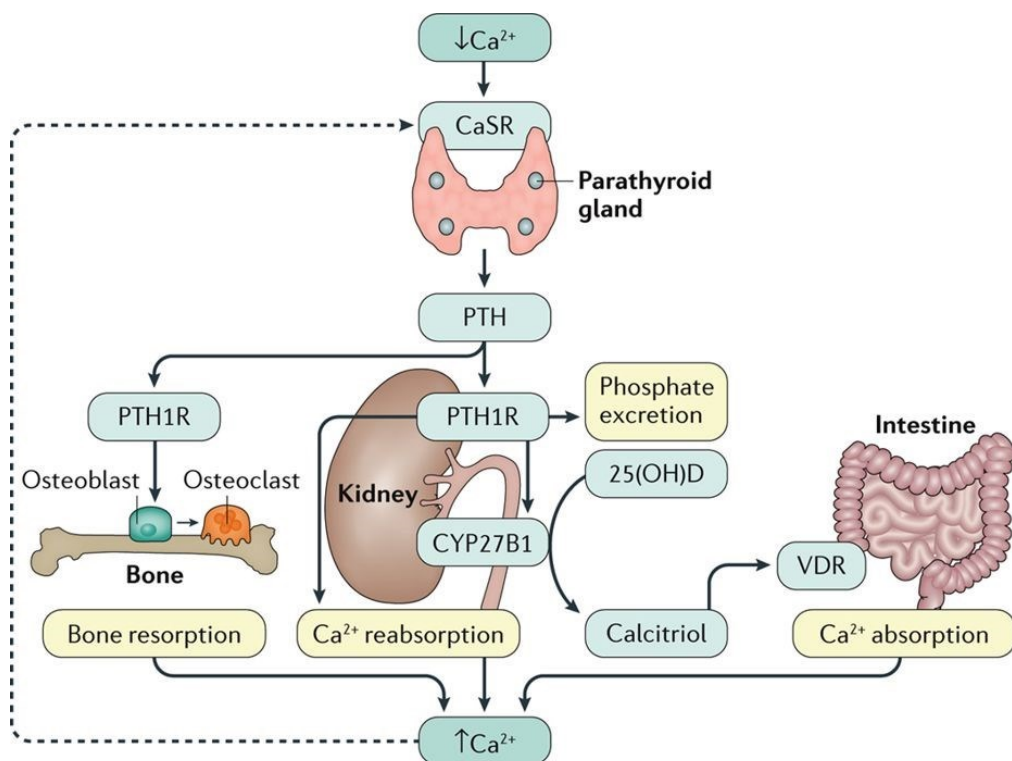
1.5.3. Parathormon

Nejdůležitějším regulátorem kalcémie je parathormon. Je tvořen v příštítných těliscích. Mezi faktory zvyšující jeho sekreci patří nízká hladina ionizovaného vápníku v plazmě. Sekrece parathormonu je řízena jednoduchou negativní zpětnou vazbou podle hladiny kalcia v krvi.

Hypokalcémie představuje hlavní podnět pro syntézu a sekreci parathormonu. PTH aktivuje zpětnou resorpci Ca^{2+} v distálním tubulu a ve sběrném kanálku. Zvyšuje hladinu vápníku v krvi odbouráním kostní hmoty osteoklasty (Bingham *et al.* 1969). Současně způsobuje exkreci fosfátů (fosfaturii) prostřednictvím inhibice jejich vstřebávání v proximálním a distálním tubulu ledvin (Greenwald *et al.* Gross 1925). V neposlední řadě pak aktivuje v ledvinách syntézu vitamínu D₃ v proximálním tubulu (Garabedian *et al.* 1972).

1.5.4. Vitamín D

Syntéza aktivního metabolitu vitamínu D, 1,25(OH)₂D₃ (kalcitriolu), je stimulována parathormonem, hypofosfatémií a hypokalcémií a inhibována hyperfosfatémií a hyperkalcémií. Esenciální role kalcitriolu spočívá ve zvýšení resorpce iontů vápníku ze střeva tím, že ve střevní sliznici zvyšuje syntézu proteinu, který je zodpovědný za transport Ca^{2+} přes lumenární membránu enterocytů. Zvyšuje zpětné vstřebávání vápníku v ledvinových tubulech (Holick 2004).



Obrázek 4: Regulace extracelulární koncentrace vápníku

Snížená extracelulární hladina vápníku a tedy i snížení aktivace CASR receptoru, vede k rychlému zvýšení sekrece PTH. PTH aktivuje PTH1 receptor v ledvinách a kostech. PTH1R se nachází v kostech na osteoblastech a osteocytech. Uvolňování cytokinů stimuluje osteoklasty v kostech k vyšší aktivitě, což vede k demineralizaci kostního materiálu a k uvolňování vápníku do krve. V ledvinách PTH omezuje vylučování vápníku močí (reabsorpci vápníku) a zvyšuje vylučování fosfátů. PTH stimuluje enzym CYP27B1, který podporuje konverzi na aktivní metabolit 1,25-dihydroxyvitamínu D, známý jako kalcitriol. Kalcitriol způsobuje ve střevě absorpci vápníku z tráveniny do krve. Zvýšení hladiny vápníku a kalcitriolu působí na příštítná tělíska a další produkce PTH je inhibována negativní zpětnou vazbou (označené přerušovanou šipkou) (Mannstadt *et al.* 2017).

1.5.5. Kalcitonin (CT)

Kalcitonin je vylučovaný parafolikulárními buňkami štítné žlázy, a na rozdíl od předchozích 2 hormonů, kalcémii snižuje. Inhibuje aktivitu osteoklastů a snižuje tak uvolňování vápníku z kostí. V ledvinách zvyšuje vylučování iontů vápníku močí, ve střevě blokuje jeho vstřebávání (Deftos *et al.* 1980).

1.5.6. Interakce mezi Ca^{2+} a fosfátovým metabolismem

Po objasnění mechanismů, které se podílí na homeostáze Ca^{2+} se o mnoho let později stala předmětem výzkumu regulace fosfátového metabolismu. Před 15-20 lety byly parathormon a vitamín D jedinými dobře charakterizovanými regulátory ovlivňujícími fosfátový metabolismus. Pozdější studie odhalily nové třídy hormonů. V roce 2000 byl popsán fosfaturetický hormon FGF-23 jako jedna z hlavních složek systému regulace hladiny fosfátů (White *et al.* 2000; Shimada *et al.* 2001). FGF-23 patří do rodiny fosfatoninů spolu s dalšími působky: sFrp-4 (secreted frizzle-related protein), MEPE (matrix extracellular phosphoglycoprotein) a FGF-7 (fibroblast growth factor-7), (Berndt *et al.* 2009).

FGF-23 je produkován výhradně kostními buňkami. Je zřejmé, že se podílí také na Ca^{2+} homeostáze. FGF-23 působí fosfatureticky, snižuje renální reabsorpci fosfátů na straně jedné a neovlivňuje signální transdukcí prostřednictvím cAMP (jako je tomu u PTH).

FGF-23 je velmi silným inhibítozem 1 α -hydroxylace 25-(OH)D₃. Parathormon i FGF-23, působí fosfatureticky (zvyšují renální exkreci fosfátů). V tomto je jejich účinek shodný. Avšak zatímco PTH zvyšuje produkci kalcitriolu v ledvinách (stimuluje renální alfa1-hydroxylázu), FGF-23 je velmi silným inhibítozem tohoto enzymu, tj. vlivem FGF-23 se tvorba kalcitriolu v ledvinách snižuje (Shimada *et al.* 2004). Výsledný aditivní fosfaturetický efekt obou hormonů vede k progresivnímu zvýšení exkreční frakce fosfátů a k udržení normofosfatémie až do terminálního stádia selhání ledvin, avšak za cenu suprafyziologických koncentrací FGF-23 i PTH, což je v konečném důsledku pro organismus nepříznivé (Gutierrez *et al.* 2005, Isakova *et al.* 2011).

1.5.7. Regulace sekrece PTH kalcium senzitivním receptorem

CARS reguluje sekreci PTH na několika úrovních, na úrovni sekrece PTH, na úrovni genové exprese *PTH* a na úrovni proliferace PTH. Všechny tyto regulační mechanismy jsou stimulovány hypoglykemií a inhibovány hyperglykemií, jak dokazují studie na knock-out myších (Ho *et al.* 1995), studie zabývající se inaktivujícími mutacemi CASR (Hauache 2001) a studie charakterizující specifické aktivátory či blokátory CASR (Nemeth 2002).

1.5.8. Regulace sekrece CT kalcium senzitivním receptorem

CASR reguluje sekreci kalcitoninu produkovaného parafolikulárními buňkami štítné žlázy (Kantham *et al.* 2009). Fudge a Kovacs ukázali posun doprava ve vztahu mezi cirkulující hladinou CT a hladinou sérového CT u knock-out heterozygotních myší v genu *CASR* (Fudge *et al.* 2004). Myši knock-out v genech pro *CASR* a *PTH* nevykazovaly sekreci kalcitoninu (Kanthan *et al.* 2009).

1.6. Kalcium senzitivní receptor

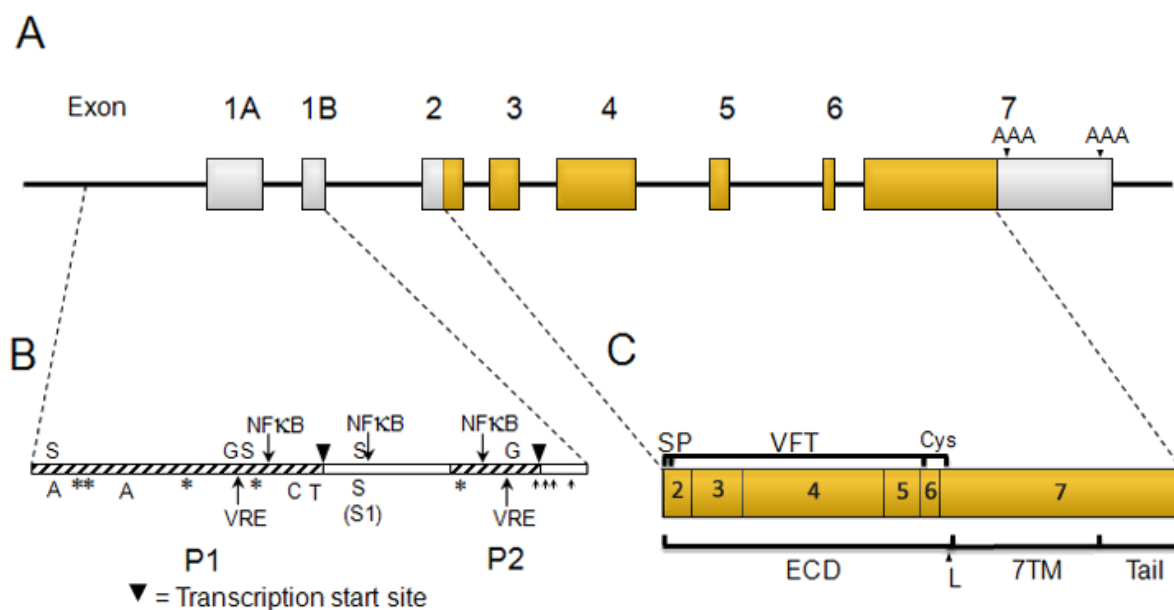
V roce 1991 publikoval Brown článek, podle kterého bylo zřejmé, že hlavní buňky příštítných tělísek jsou schopny rozpoznat a reagovat na malé změny koncentrace extracelulárního ionizovaného vápníku (Brown 1991). Kromě toho nepřímé důkazy naznačovaly, že detekce vápenatých iontů příštítných tělísek je spjata s G-proteiny. Klonování kalcium senzitivního receptoru v roce 1993 dokázalo, že iont vápníku může ve skutečnosti sloužit jako extracelulární první posel (Brown *et al.* 1993).

1.6.1. Struktura genu

Kalcium senzitivní receptor byl poprvé naklonován v roce 1993 z hovězího příštítného tělíška (Brown *et al.* 1993). Umístění genu na dlouhém raménku třetího chromozomu bylo stanoveno vazebnou analýzou, přesná lokalizace genu (3q13.3-21) pomocí *in situ* hybridizace (Janinic *et al.* 1995). Gen je dlouhý přibližně 103 kb a tvoří ho 8 exonů (exony 1A, 1B a exony 2-7), (Garrett *et al.* 1995, Janinic *et al.* 1995). Exony 1A a 1B jsou nekódující. *CASR* mRNA je transkribována z části 2. exonu, celých exonů 3 až 6 a části exonu 7. Byla publikována sestřihová varianta receptoru postrádající 5. exon (Rodriguez *et al.* 2005).

V genu jsou 2 promotory, upstream promotor (P1) zahrnující TATA box a CCAAT box a druhý promotor (P2) zahrnující SP1 box (Chikatsu *et al.* 2000). V obou promotorech byly objeveny vitamín D-responzibilní elementy (VDREs), responzibilní motiv pro NF- κ B a transkripční faktor „glial cells missing-2“. Upstream oblast promotoru obsahuje elementy Stat1/Stat3, které umožňují reakci na prozánětlivé cytokiny IL-6 a interleukin-1 β (Canaff *et al.* 2002, Canaff *et al.* 2005).

Užívání rozdílných polyadenylačních signálů v 7. exonu vede minimálně ke 2 různě dlouhým 3'UTR oblastem (Garret *et al.* 1995).



Obrázek 5: Struktura genu CASR (A), jeho promotor (B) a strukturní uspořádání proteinu (C)

CASR mRNA je transkribována z části 2. exonu, celého exonu 3-6 a části 7. exonu. Exony, které obsahuje CASR protein jsou označeny žlutě, netranslatované exony a jejich části, jsou označeny šedě. Introny nejsou kresleny v měřítku. Umístění polyadenylačních místa (AAA) v netranslatované oblasti 7. exonu je vyznačeno šipkami. Na obrázku označené písmenem B je znázorněno prostorové uspořádání mezi promotory P1, P2 (šrafovaně), netranslatovanými exony 1A a 1B a jsou zde zvýrazněna vazebná místa pro transkripční faktory a různé regulační elementy: C, CCAAT box; T, TATA box; A, Ap-1 místo; *, sérum responsivní elementy; VRE, vitamín D responsivní elementy; G, glial cells missing-2 response element; ↑, Sp1 místo; NF-κB, NF-κB responsivní elementy; S, STAT místa (S1 regulují odpověď IL-6). CASR protein (C) se skládá z extracelulární domény (ECD) obsahující signální peptid (SP), Venus Fly Trap (VFT) domény a cystein bohatou domény (cys), která je můstkem (L) připojena k transmembránové doméně (7TM), následuje intracelulární doména kódována 7. exonem.

Obrázek převzat z: http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_CASR.html

1.6.2. Struktura proteinu

CASR je 120 kDa objemný protein zakotvený v cytoplazmatické membráně buňky. Na buněčném povrchu se protein vyskytuje většinou ve formě dimeru, jehož monomerní podjednotky jsou kovalentně spojeny disulfidickými můstky (Bai *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2001, Pidasheva *et al.* 2006).

CASR patří do třetí C rodiny membránových receptorů spřažených s G proteiny (G protein-coupled receptors, GPCRs) s charakteristickou strukturou, zahrnující sedm transmembránových kliček (TMD), C-terminální intracelulární a N-terminální extracelulární doménu (Garrett *et al.* 1995; Hu *et Spiegel* 2003).

Největší 612 aminokyselin dlouhá extracelulární doména (ECD) váže ligand a obsahuje 2 „laločnatou“ Venus flytrap (VFT) doménu a doménu bohatou na cystein, následuje můstek spojující ECD s membránovými α helixy se 3 intracelulárními a 3 extracelulárními kličkami. Koncový α helix se připojuje na 216 aminokyselin dlouhou intracelulární doménu, která zprostředkovává intracelulární signalizaci (Hu *et Spiegel* 2003).

VFT doména sdílí sekvenční homologii s bakteriálním periplazmatickým proteinem a je konzervovaná mezi metabotropními receptory mGLU1 (Kunishima 2000), mGLU3 a mGlu7 (Muto *et al.* 2007) a GABA_{B2} podjednotka (Geng *et al.* 2012), které rovněž patří do rodiny C receptorů spřažených s G proteiny.

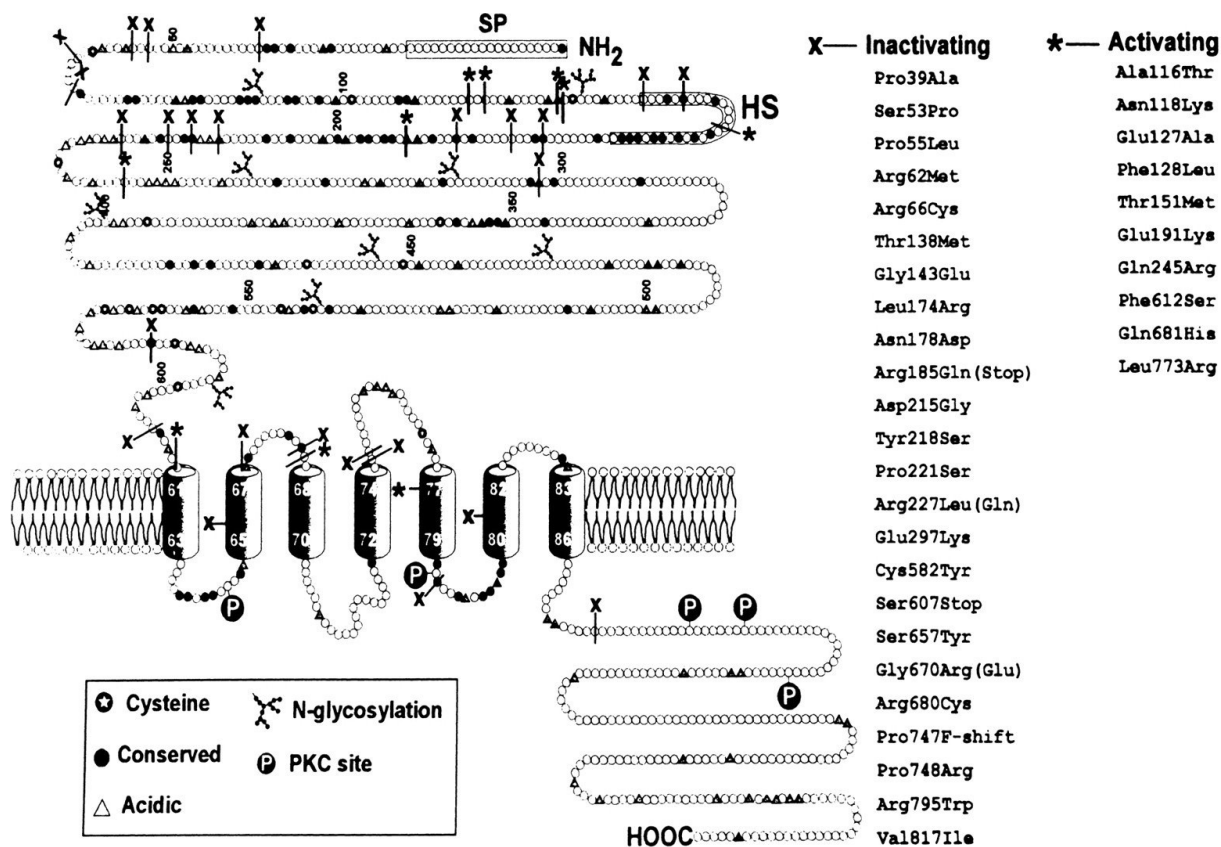
VFT zabezpečuje interakce potřebné pro dimerizaci receptoru a tvoří vazebná místa pro endogenní ligand. Vazba agonisty do štěrbiny mezi VFT laloky každého monomeru způsobí jejich uzavření. Rotace VFT dimeru přenáší konformační změny na cysteinovou doménu receptoru, která umožňuje pohyb α -helixů v membráně (Chakravaki *et al.* 2012). Na vnitrobuněčné straně asociují smyčky s G-proteinem, který v cytosolu aktivuje další enzym.

Cysteinová doména je tvořena 9 cysteiny. Sdílí ji členové C rodiny GPCR proteinů s výjimkou GABA_{B1} receptoru. Propojuje domény ECD a TMD a je esenciální pro přenos signálu, což bylo dokázáno odstraněním této domény (Hu *et al.* 2000).

C-terminální intracelulární doména je mezidruhově odlišná. Podílí se na kontrole a kooperaci CASR signalizace, na pohybu receptoru (trafficking) a jeho desenzibilizaci (Gama *et Breitwieser* 1998, Bai 2004, Ward 2004).

Pro normální expresi proteinu na povrchu buňky je důležitá dimerizace a N-glykosylace nezralého CASR proteinu v endoplazmatickém retikulu. Extracelulární část receptoru obsahuje 11 potencionálních glykosylačních míst, z nichž je skutečně využíváno pouze 8. N-glykosylace probíhá připojením manózy přes amido- skupinu asparaginu v endoplazmatickém retikulu. V této formě se posléze přemísťuje do Golgiho aparátu, kde je dále modifikován komplexními sacharidy a poté je ukotven v membráně (Ray *et al.* 1998).

Dimerizace receptoru je uskutečňována disulfidickými vazbami a dalšími intermolekulárními interakcemi (Zhang *et al.* 2001).



Obrázek 6: Schématické znázornění hlavních topologických znaků CASR

SP, signální peptid; HS, hydrofobní segment; PKC, protein kináza C. Na obrázku jsou vyznačeny missence a nonsense mutace způsobující familiární hypokalciurickou hyperkalcémii a autosomálně dominantní hypokalcémii. Mutace jsou zapsány následujícím způsobem: nejprve je uveden kodon pro normální aminokyselinu, poté jeho pořadí a následuje mutovaný kodon (Brown *et al.* 1997).

1.7. Ligandy a allosterické modulátory

CASR je schopen, kromě obligátní vazby vápenatých iontů, vázat celou řadu anorganických a organických ligandů, viz Tab. č. 2. Kromě vápenatých iontů je nevýznamnějším aktivátorem CASR Mg^{2+} . Mezi agonisty patří řada dalších dvojmocných a trojmocných kationtů: Sr^{2+} , Ba^{2+} , Gd^{3+} , Al^{3+} (Brown *et al.* 1990, Brown *et al.* MacLeod 2001). CASR je aktivován organickými polykationty, jako jsou polyaminy (spermin a spermidin) (Quinn *et al.* 1997), polypeptidy polylysinem a polyargininem (Brown *et al.* 1991, Brown *et al.* 2001) a amyloidními β -peptidy. Dalšími aktivátory jsou aminoglykosidová antibiotika (neomycin a gentamycin) (Brown 1991, Nemeth 1990). Tyto ligandy, označované jako kalcimimetika 1.

typu nebo také ortosteričtí agonisté, se mohou vázat na receptor i v nepřítomnosti Ca^{2+} či jiných ligandů.

Tabulka 1: Ortosteričtí agonisté a allosterické modulátory CASR (volně převzato Colella *et al.* 2016)

Ortosteričtí agonisté (Kalcimimetika 1. typu)	
A. Kationty	Gd^{3+} , Eu^{3+} , Tb^{3+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+}
B. Polyaminy	spermin, spermidin, putrescin
C. Aminoglykosidová antibiotika	neomycin, gentamycin, tobramycin, poromycin, kanamycin, ribostatin
D. Polypeptidy	poly-L-arginin, poly-L-lysin, protamin, amyloidní β -peptid
Allosterické modulátory (Kalcimimetika 2. typu)	
A. L-aminokyseliny	fenylalanin, tryptofan, tyrosin, histidin
B. Analogy glutathionu	γ -glutamyl-tripeptidy: glutathion, S-methylglutathion, S-propylglutathion γ -glutamyl-tripeptidy: γ -Glu-Ala, γ -Glu-Cys
C. Malé kalcimimetické molekuly	první generace: NPS R-568, NPS R-467, AMG 073, AMG 416 druhá generace: cinalcanet třetí generace: dibenzylaminová kalcimimetika, R, R kalcimimetika B, AC-265347
D. Malé kalcilytické molekuly	NPS 2143, Calhex 231, ATF396, AXT914, ronacaleret, NPSP795, SB-423557, SB-423562

Rozsáhlý výzkum vedl k objevení látek, tzv. allosterických modulátorů, které cíleně vedou ke změně aktivity CASR. Pozitivní modulátory CASR se nazývají kalcimimetika a negativní modulátory kalcilytika. Tyto modulátory neovlivňují běžně se vyskytující typ CASR přímo, nýbrž způsobují posun křivky závislosti účinku na koncentraci tak, že zvýší nebo sníží citlivost receptoru CASR na extracelulární koncentraci volných vápníkových iontů. Mechanismus účinku kalcimimetik spočívá v tom, že po navázání látky na transmembránový segment CASR, dochází ke konformační změně receptoru a zvýšení přenosu neboli transdukci signálu vyvolaného extracelulárním kalcie (Miedlich *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2015).

Právě kalcimimetika 1., 2. a 3. třídy představují léčiva s vysokým terapeutickým potenciálem (Nemeth *et al.* 1998, Kiefer *et al.* 2011, Kiefer *et al.* 2015, Nemeth *et al.* 2016).

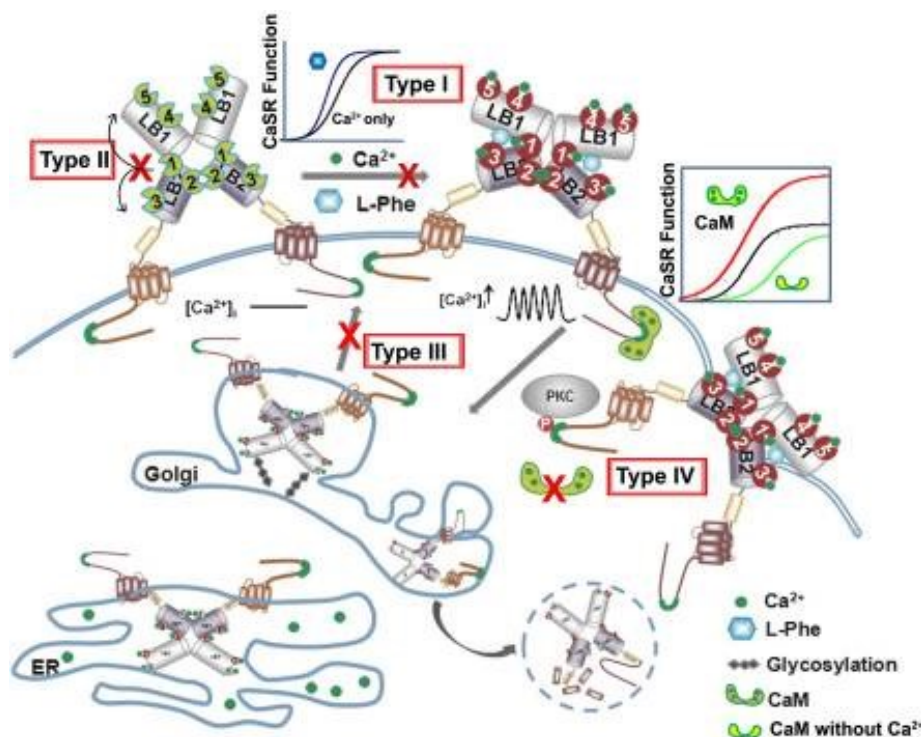
Po generaci kalcimimetik 1. třídy, které představovaly deriváty fenyalkylaminu (NPS R-568 a NPS R-467) obohatily klinickou praxi kalcimimetika 2. třídy. Nejvýznamnějším kalcimimetikem této třídy je cinacalcet. Jeho hlavní indikací je hyperparatyreóza provázející selhání ledvin. Bylo dokázáno, že tato látka působí přímo na CASR na povrchu příštítných tělísek a zvyšuje citlivost tohoto receptoru na extracelulární koncentraci vápníku. Výhodou cinacalcetu je, že vyvolává pokles sekrece PTH již při nižších hladinách kalcia než by k potlačení sekrece PTH bylo potřebné. Další jeho výhodou na rozdíl od ostatní terapie v léčbě hyperparatyreózy je, že nezvyšuje kalcémii ani fosfatémii, ale tyto parametry snižuje. Toho lze využít zejména u pacientů s chronickým onemocněním ledvin pro léčbu poruchy minerálového a kostního metabolismu za současného dosažení cílových sérových koncentrací PTH i fosforu (Dusilová 2005, Bubeníček 2005). Kalcimimetika 3. generace, R, B a AC-265347 prokazují u krys (Ma *et al.* 2011) tkáňově specifický efekt na uvolňování PTH a kalcitoninu prostřednictvím allosterické modulace CASR (Cook *et al.* 2015).

Negativní allosterické modulátory (kalcilytika) NPS 2143 a Calhex 231 antagonizují stimulační efekt vápenatých iontů, což je využíváno při léčbě osteoporózy (Nemeth 2002).

Je zajímavé, že nedávné studie ukázaly, že allosterické modulátory mohou působit jako farmakologické chaperony. Farmakologický chaperon nalezne mutantní CASR protein v místě jeho biosyntézy a v „protein trafficking“ procesu, tedy nejčastěji v endoplazmatickém retikulu. Stabilizuje jeho strukturu a zachrání tak expresi receptoru na buněčném povrchu. Huang a Breitweiser jako první ukázali, že pozitivní allosterický modulátor NPS-R-568 dokáže zachránit téměř 50% mutantních („loss of function“) CASR receptorů (Huang *et Breitweiser* 2007, White *et al.* 2009, Cavanaugh *et al.* 2010).

1.8. Mutace CASR receptoru

V CASR bylo popsáno více než 200 mutací, které vedou k poruše homeostázy vápníku (<http://www.casrdb.mcgill.ca/>), (Hendy *et al.* 2009). Mutace může vést k inhibici aktivity receptoru, k nadměrné aktivaci receptoru či postihuje strukturu receptoru. Většina mutací jsou typu missense, kdy dojde k záměně jedné aminokyseliny. Byly popsány mutace způsobené inzercí, delecí aminokyseliny, mutace způsobující posun čtecího rámce či mutace v místě sestřihu (Hendy *et al.* 2009). Mutace v CASR genu vedou buď k aktivaci, nebo inaktivaci kalcium senzitivního receptoru a mohou vyústit do určitých typů dědičných onemocnění.



Obrázek 7: Přehled typů mutací CASR

Transport CASR receptoru na buněčný povrch, exprese a jeho stabilizace na povrchu buňky jsou rozhodující děje pro správnou funkčnost CASR receptoru. Mutace 1. typu, tj. mutace ve vazebném místě ECD domény či v jeho těsné blízkosti, mění schopnost receptoru vázat vápník či jiný ligand. Mutace 2. typu mění zejména EC 50 či Hillův koeficient a ovlivňuje molekulární soudržnost mezi různými ligand-vazebnými místy. Mutace 3. typu narušuje kooperativu prostřednictvím interference s povrchovou expzí receptoru. Mutace 4. typu mění přenos a stabilitu proteinu prostřednictvím proteinů vázajících se na C-konec CASR receptoru (Zhang *et al.* 2016).

1.8.1. Inaktivační mutace CASR

Inaktivační mutace vedou k posunutí set-pointu buněk, které monitorují hladinu Ca^{2+} do vyšších hodnot, které pak normokalcemické hodnoty vnímají jako nízké. To má za následek nadprodukcí PTH, který způsobuje uvolňování vápníků z kostí a následnou hyperkalcémii. Buňky ledvin jsou aktivovány ve smyslu zvýšené reabsorbce kalcia z moči (hypokalciurémie) (Marx *et al.* 1982).

Inaktivační mutace jsou spojovány s fenotypem dvou autosomálních onemocnění: Familiární hypokalciurická hyperkalcémie (FHH) a Novorozenecká těžká primární hyperthyreóza (NSHPT).

1.8.1.1. Familiární hypokalcirická hyperkalcémie

FHH je definována mírnou až střední celoživotní hyperkalcémií, relativně nižší exkrecí vápníku a také hladinou PTH nad horní hranicí normy (Marx *et al.* 1981). Pacienti jsou zpravidla asymptomaticí, nebo mají nespecifické příznaky, jako je únava, slabost, bolesti kloubů a hlavy. Jedná se o autosomálně dominantní onemocnění. Jedinci s manifestní FHH jsou heterozygoty pro inaktivační mutaci *CASR* (Hendy *et al.* 2000). Dosud bylo popsáno okolo 150 mutací způsobující FHH. Většina mutací se nalézá v kódujících oblastech receptoru, jsou také nalézány zvláště v oblastech kódující N-terminální konec ECD a v signál transdukční doméně (Hendy *et al.* 2009).

FHH je heterogenní onemocnění. Autoimunitní hypokalcirická hyperkalcémie (AHH) napodobuje FHH, ale je vyvolána autoprotilátkami proti ECD kalcium senzitivního receptoru. *CASR* vykazuje defektní aktivaci extracelulárním Ca^{2+} (Kifor *et al.* 2003). Bylo dokázáno, že určitá část FHH případů není vázána na *CASR* gen na 3. chromozomu, ale je spojena s lokusy na 19. chromozomu (Heath *et al.* 1993, Lloyd *et al.* 1999, Nesbit *et al.* 2010).

1.8.1.2. Novorozenecká těžká primární hyperthyreóza

NSHPT představuje velmi závažné a vzácné onemocnění způsobené inaktivační mutací *CASR*. Je charakterizováno extrémní hyperkalcémií, která se manifestuje v prvních měsících života. Pacienti jsou hypotoničtí, trpí zácpou, zvracením, polyurií, trpí respirační tísní a celkově neprospívají. Vysoká hladina PTH způsobuje demineralizaci kostí, které jsou náchylné ke zlomeninám a deformitám (Pearce *et Brown* 1996). Pokud není NSHPT včas a správně léčena, následky jsou vážné a onemocnění může mít fatální následky.

NSHPT je nejčastěji způsobená homozygotní mutací zděděnou od obou rodičů (Hendy *et al.* 2009). Byly popsány de-novo vzniklé mutace, nebo paternálně přenesené heterozygotní inaktivační mutace. Heterozygotní mutace nemají tak závažný projev hyperkalcémie se všemi jejími následky (Pearce *et Steinmann* 1999).

1.8.2. Aktivační mutace *CASR*

Aktivační mutace *CASR* vedou k posunutí set pointu buněk, které monitorují hladinu Ca^{2+} do nižších hodnot, což vede k snížené produkci PTH a následné hypokalcémii. Buňky

tubulárního systému ledvin jsou aktivovány se smyslu snížené reabsorbce kalcia močí, což vede k hyperkalciurii.

Aktivační mutace jsou spojovány s fenotypem dvou onemocnění: Autozomálně dominantní hypokalcémií s hyperkalciurií (ADHH) a Bartterova syndromu V. typu.

1.8.2.1. Autozomálně dominantní hypokalcémie s hyperkalciurií (ADHH)

ADHH je charakterizována různým stupněm klinické manifestace, od mírné, asymptomatické formy až po velmi závažnou hypokalcémii. Hladina parathormonu bývá zpravidla na dolní hranici normy (Pearce *et al.* 1996, Thakker 2004). Klinicky se hypokalcémie může projevovat křečemi, parestéziemi. Díky zvýšenému vylučování vápníku ledvinami bývá přítomna nefrolitiáza s následkem renálního selhání.

U většiny jedinců je onemocnění spojeno s heterozygotní aktivační mutací v CASR. Bylo popsáno více než 80 mutací asociovaných s touto chorobou (Hendy *et al.* 2009, Thakker 2004).

1.8.2.2. Bartterův syndrom V. typu

Je charakterizován poruchou absorbce sodíku a chloridů tubulárním systémem ledvin. Biochemicky nalezneme vyšší ztráty těchto iontů močí, hypokalcémii, metabolickou alkalózu a elevované hladiny aldosteronu a reninu. Pacienti jsou hypertenzní a fakultativní je nález hyperkalciurie (Hendy *et al.* 2009, Thakker 2004).

1.8.3. Onemocnění asociována s jinými poruchami kalcium senzitivního receptoru

1.8.3.1. Primární hyperparathyreóza (PHPT)

PHPT je charakterizována hyperkalcémií, normální nebo zvýšenou hladinou PTH (na rozdíl od FHH) a hyperkalciurií. Typická je nefrolithiáza, častější výskyt zlomenin, únava, bolest a ochablost svalů, bolesti břicha a neurologické problémy jako deprese a úzkost. Může být přítomna hypertenze. PHPT predisponuje pacienty k inzulínové rezistenci (Habib *et Camacho* 2010).

Nejčastější příčinou PHPT je adenom jednoho z příštítných tělísek, méně častěji adenom dvou tělísek, a v určitých případech dochází k hyperplazii celých žláz. Bylo popsáno, že adenomatózní tkáň vykazuje sníženou expresi CASR receptoru v porovnání s normální tkání příštítných tělísek (Cetani *et al.* 2000). V adenomatózní tkáni byla popsána také snížená

exprese receptoru pro vitamín D (Yano *et al.* 2003). PHPT je asociován také s karcinodem příštítných tělísek, u kterého nacházíme markantně sníženou expresi *CASR*, pravděpodobně kvůli vysokému proliferačnímu indexu tkáně (Haven *et al.* 2004).

Nebyly nalezeny mutace *CASR*, které by způsobovaly neoplazii příštítných tělísek. V adenomu tělísek byla odhalena mutace v tumor supresorovém genu *MEN 1*, karcinom predominantně obsahuje mutaci v tumor supresorovém genu *HRPT2*. Jak adenom, tak karcinom tělísek over-exprimují onkogen cyklin-1 (Sharretts *et al.* 2010).

Byly zkoumány polymorfizmy v *CASR* genu, které by mohly být spojeny s diagnózou PHPT. Četné studie se zaměřily především na tyto polymorfizmy v 7. exonu: A986S, R990G a Q101 1E. V jedné studii haplotyp SQR predisponoval jedince k tvorbě ledvinových kamenů (Scillitani *et al.* 2007). Tyto výsledky korespondovaly se studií, která ukázala, že pacienti s PHPT nesoucí polymorfismus 990G mají nižší hladinu PTH a zvýšenou kalciurii v porovnání s 990R homozygoty (Corbetta *et al.* 2006). Ve 2 japonských studiích byly polymorfizmy R990G a dinukleotidový intronový polymorfismus asociovány s hodnotou PTH a korespondovaly se stupněm závažnosti u hemodialyzovaných pacientů s PHPT a SHPT (Yano *et al.* 2000, Yamauchi *et al.* 2001). V další studii byl polymorfismus R990G asociován s „gain of function“ *CASR* a se zvýšenou náchylností k hyperkalciurii (Vezzoli *et al.* 2007).

Studie rovněž ukázaly, že 2 SNP v regulační oblasti genu *CASR* jsou asociovány s idiopatickou tvorbou a PHPT-asociovanou tvorbou ledvinových kamenů (Vezzoli *et al.* 2010, Vezzoli *et al.* 2011).

1.8.3.2. Sekundární hyperparathyreóza (SHPT)

SHPT je komplikací chronického selhání ledvin (CKD) a je důsledkem souběžné poruchy vylučovací i endokrinní funkce ledvin. Při rozvoji renální insuficience dochází k narušení kalcio-fosfátové homeostázy a snížení sérové koncentrace aktivního vitamínu D (kalcitriolu). Následkem snížených hladin kalcitriolu dochází k sníženému vstřebávání kalcia ve střevě a hypokalcémii. Jako důsledek snižování glomerulární filtrace pak dochází ke sníženému vylučování fosfátu a hyperfosfatémii. Všechny tyto změny vedou ke zvyšování tvorby parathormonu a kostním změnám, typickým pro sekundární hyperparatyreózu. Jedním ze zásadních nových poznatků v patogenezi renální kostní nemoci je klíčová role fibroblastového růstového faktoru 23 (FGF-23) a jeho kofaktoru α -klotho (Taylor *et al.* 2009, Razaque 2009, Kumata *et al.* 2010). Hladiny FGF-23 se zvyšují v časných stádiích CKD (Isakova *et al.*

2011). U dialyzovaných pacientů mohou být zvýšeny i více než tisíckrát (Wolf 2012, Kovcsdy *et Quarles* 2013).

1.8.3.3. Hyperkalcémie způsobená nádory

Hyperkalcémie vzniká v souvislosti s řadou nádorových onemocnění, těmi nejčastějšími jsou karcinom prsu, prostaty, plic a ledvin.

Nádorové onemocnění vyvolává hyperkalcémii dvěmi základními způsoby. Jednak přímou destrukcí kosti nádorem, či metastázou (osteolytická hyperkalcémie) a jednak produkcí různých látek, které ovlivňují kostní metabolismus a hladinu vápníku v krvi (humorální hyperkalcémie), (Horwitz *et Stewart* 2003).

Nejčastější takovou látkou je parathormonu podobná bílkovina (PTHrP, parathyroid hormone related peptide). PTHrP sdílí sekvenční homologii s parathormonem v prvních 13ti aminokyselinách, které představují část domény, která je rozhodující pro vazbu a signalizaci PTH-1 receptoru. PTHrP působí obdobně jako parathormon, ale nepodléhá regulaci v závislosti na hladině vápníku v krvi. Je produkován nádorovou tkání neustále (Grill *et al.* 1991, Chattopadhyay 2006).

Na hyperkalcémii spojené s malignitou se podílí mnoho dalších faktorů jako vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), interleukin-8 a interleukin-11. Ačkoliv PTHrP se zdá být tím hlavním patologickým faktorem (Horwitz *et Stewart* 2003).

Byla studována role CASR při osteolytické hyperkalcémii na buněčných liniích karcinomu prsu (MCF-7 a MDA-MB-231) a buněčných liniích karcinomu prostaty (PC-3). Tyto linie metastázuji do kostí a je o nich známo, že exprimují CASR (Sanders 2000, Sanders 2001). Hladina Ca^{2+} stimuluje produkci PTHrP jak v normálních, tak maligních buňkách. CASR stimuluje produkci PTHrP rakovinnými buňkami, namísto toho, aby byl pouze vedlejším produktem malignit. Za těchto podmínek slouží CASR jako ústřední prvek ve fyziologicky nevhodném mechanismu, kdy maligní osteolýza způsobuje další osteolýzu. Sekrece PTHrP stimulací CASR receptoru přispívá k přežívání a růstu nádorových buněk, které ho vylučují (Sepulveda *et Falson* 2002, Sepulveda *et al.* 2002)

1.8.3.4. CASR a pankreatitida

CASR je exprimován endokrinním i exokrinním pankreatem, acinárními buňkami, Langerhansovými buňkami, intra-pankreatickými nervy a krevními cévami a také se hojně nachází ve vývodu pankreatu. Ve vývodu pankreatu reaguje CASR na vysokou hladinu Ca^{2+} zvýšením sekrece pankreatické šťávy. Zvýšená sekrece šťávy snižuje pravděpodobnost tvorby kamenů (Racz *et al.* 2002).

Pankreatitida byla popsána v rodinách s výskytem FHH s nalezenými mutacemi, nebo mutacemi, které odhaleny nebyly. Nebyla také nalezena kauzální spojitost s hyperglykemií nebo FHH (Stuckey *et al.* 1990, Pearce *et al.* 1996).

Pankreatitida je spojena s uzávěrem pankreatického vývodu mechanismem aktivace trypsinu. Uzávěr vývodu způsobí strukturální i funkční změny tkáně. Byla odhalena řada faktorů, které jsou spojeny s vnímavostí k tomuto typu onemocnění. Kromě CASR receptoru to jsou kationický a anionický trypsinogen, chymotrypsin C, serin proteázový inhibitor SPINK1 a „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (Whitcomb 2010).

Vysoká koncentrace Ca^{2+} v acinózních buňkách spojená s inaktivační mutací receptoru CASR, vede k aktivaci přeměny trypsinogenu na trypsin a také brání degradaci trypsinogenu chemotrypsinem C. Mutace genu *SPINK1* inaktivuje jeho proteinový produkt, který normálně reaguje na zánět v tkáni zablokováním aktivace trypsinu. V řadě studií bylo dokázáno, že tyto dvě konkurenční mutace jsou asociovány s chronickou pankreatitidou (Felderbauer *et al.* 2006, Murugaian *et al.* 2008, Muddana *et al.* 2008, Baudry *et al.* 2010).

Do jedné studie bylo zahrnuto 35 pacientů s tropickou chronickou pankreatitidou. U 8 pacientů byly nalezeny mutace. 3 pacienti nesli pouze mutaci *SPINK1* N34S a 3 pouze mutaci genu *CASR* V477A a dva pacienti vykazovali obě mutace najednou, nikdo z kontrolní skupiny skupiny nesdílel tyto mutace (Murugaian *et al.* 2008).

Podobné výsledky byly ukázány v americké studii. Mutace genu *CASR* byly spojeny s mutacemi *SPINK1*. Tato studie také ukázala, že polymorfismus *CASR* R990G je asociován s chronickou pankreatitidou vyvolanou vysokým příjmem alkoholu (Muddana *et al.* 2008). Tyto výsledky ukazují, že kromě genetického předpokladu se podílí na rozvoji pankreatitidy vlivy zevního prostředí.

1.9. CASR a sekrece inzulínu

Primárním regulátorem sekrece inzulínu je změna koncentrace glukózy v plazmě. Na zvýšenou hladinu glukózy reagují β -buňky zvýšením koncentrace vápenatých iontů v cytosolu. Zvýšení koncentrace vnitrobuněčného Ca^{2+} jejich transportem z extracelulárního prostředí dovnitř buňky vyvolá výšení poměru ATP/ADP uvnitř buňky. Toto zvýšení poměru ATP/ADP podnítí uzavření membránových K^+ kanálu typu L (VDCC) a to následně sníží odtok K^+ iontů z buňky. Zvýšená koncentrace Ca^{2+} iontů v cytosolu je způsobena aktivací různých proteinkinas a vede ke kontrakcím mikrotubulární a mikrofilamentární soustavy, které mechanismem podobné svalové kontrakci translokují sekreční granule obsahující inzulín k místům exocytózy na buněčné membráně. Jakmile sekreční granule dosáhnou k buněčné membráně, dojde k splnutí jejich membrán a vylití obsahu granulí ven z buňky (Hellman *et al.* 1994).

Před objevením CASR se předpokládalo, že vápenaté ionty mají pouze pasivní výše popsanou roli v regulaci sekrece inzulínu. Po objevu tohoto receptoru se zjistilo, že CASR má důležitou úlohu v autokrinní a intracelulární komunikaci. Úzký kontakt mezi buňkami zlepšuje funkční citlivost buněk a zvyšuje sekreci inzulínu. Aktivace CASR napomáhá sekreci inzulínu z Langerhansových ostrůvků (Gray *et al.* 2006). V nepřítomnosti extracelulárního Ca^{2+} mají kalcimimetika malý efekt na sekreci inzulínu.

Grey s kolegy zjistil, že pokud je inhibována sekrece inzulínuablokováním fosfolipázy C, uplatňují se jiné mechanismy, které vedou k aktivaci IP_3 a následnému uvolnění vápníku z β -buněk. Nеспецифická inhibice protein kinázové aktivity zabraňuje CASR zprostředkovanému uvolnění inzulínu, zatímco cílená inhibice kinázové aktivity podporuje aktivaci kinázy CAMKII. (Gray *et al.* 2006).

1.10. Diabetes a s ním související změny kalciového metabolismu

V roce 1979 bylo publikováno, že pacienti s diabetem nevykazují žádnou změnu plazmatické hladiny celkového a ionizovaného vápníku, PTH a vitamínu D (Heath *et al.* 1979). Studie z roku 2000 už nalézají u diabetiků narušenou homeostázu vápníku. Pacienti s hypovitaminózou D mají vyšší riziko rozvoje inzulínové rezistence, metabolického syndromu a rozvoje diabetu 2. typu (Yang *et al.* 2016). Bylo popsáno, že vysoká hladina PTH je spojena s rozvojem diabetu a liší se mezi jednotlivými etnickými skupinami. Vyšší incidence je u bělochů (Reis *et al.* 2016).

Vedle hormonů regulujících vápník narušuje chronická hyperglykémie metabolismus vápníku tím, že poškozuje orgány regulující jeho hladinu, tedy střeva, kosti a ledviny. Ve většině případů nacházíme u diabetiků zvýšené riziko zlomenin. Hlavním poškozujícím mechanismem nebývá pokles kostní hustoty, ale spíše jde o snížení kvality kosti a změnu její struktury. Významnou roli hraje nepochybně inzulin a inzulinová rezistence, uplatňuje se ale i zvýšená glykace proteinů, včetně zvýšené glykace kolagenu v kostech, změna produkce a hladiny sklerostinu, zásah do diferenciacie pluripotentních kmenových buněk a zvrát jejich diferenciacie směrem k adipocytům a mnohé další faktory (Khazai *et al.* 2009).

CASR receptor má v normálních β -buňkách řadu úloh. Můžeme tedy předpokládat, že změny v jeho expresi či funkci mohou být spojeny s rozvojem diabetu mellitu. U diabetu 1. typu vyvolaného streptozotocinem (STZ) byla exprese CASR v ledvinách snížena na polovinu a sérová hladina 1,25-dihydroxy-vitamínu D3 klesla o 80% (Ward *et al.* 2001). Zlepšení těchto parametrů by přinesl subkutánně implantovaný inzulin (Anward *et al.* 1990). Snížená exprese CASR je rovněž pozorována u diabetické kardiomyopatie u STZ-modelových zvířat. Ztráta funkce receptoru souvisí s abnormální srdeční strukturou, systolickou a diastolickou disfunkcí (Bai *et al.* 2012). Tyto progresivní změny by mohly být zpomaleny nebo dokonce by jim bylo možné předcházet aplikací agonisty CASR receptoru-sperminu. Podobná ztráta exprese a funkce CASR v mesenterických tepnách byla popsána u potkanů Zucker Diabetic Fatty. Dlouhotrvající zvýšený cévní tonus může přispívat k rozvoji vaskulárních komplikací diabetu mellitu (Weston *et al.* 2008).

V ostrůvcích pankreatu je draselný kanál (KCNJ15) asociován s diabetem 2. typu. Protein KCNJ15 je overexprimován buňkami INS-1 (Rat Insulinoma Cell). KCNJ15 snižuje sekreci inzulinu. U jedinců s diabetem 2. typu je exprese KCNJ15 mRNA zvýšená (Okamoto *et al.* 2012). KCNJ15 inhibuje CASR receptor v oocytech *Xenopus laevis* (Huang *et al.* 2007).

Knock down a ztráta exprese CASR snižuje sekreci inzulinu (Okamoto *et al.* 2012). Byla popsána přímá interakce mezi draselným kanálem KCNJ15 a CASR v ledvinách (Ohkubo *et al.* 2000).

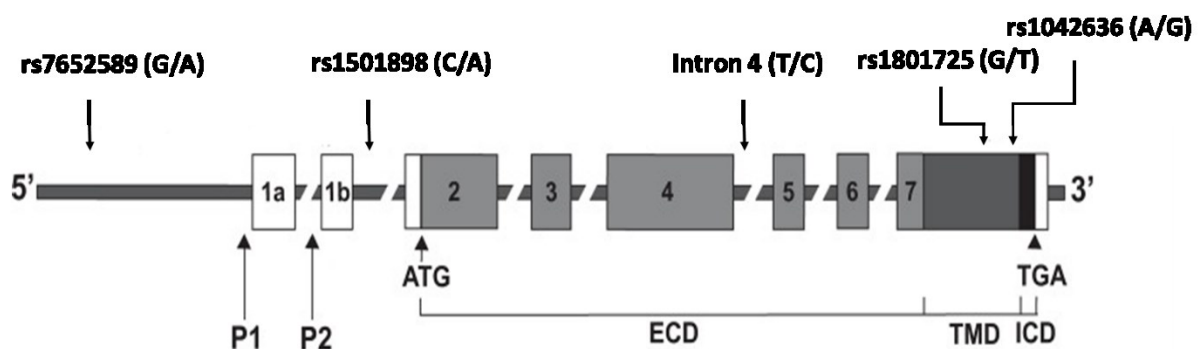
1.11. Asociační studie

Asociační studie slouží k odhalení genetické predispozice k multifaktoriálnímu onemocnění. Na všech formách diabetu se podílí genetické komponenty. Jejich identifikace je poměrně komplikovaná. Ke genetickému studiu se v současné době používají asociační a vazebné studie. Pro vazebnou analýzu komplexních znaků se používají tzv. neparametrické metody, tedy takové, kde se nepředpokládá žádný konkrétní způsob dědičnosti. Sledované rodiny s častým výskytem onemocnění jsou podrobeny analýze, zda postižení jedinci nesdílejí některé alely častěji.

Asociační studie testují vztah mezi konkrétní alelou, genotypem, haplotypem a chorobou. Spočívají ve srovnání výskytu polymorfizmu kandidátních genů mezi skupinou nepříbuzných postižených jedinců a kontrolní skupinou, kterou představují zdraví jedinci. Kandidátní geny představují takové geny, u kterých se předpokládá, že mají vliv na patogenezi diabetu, respektive diabetickou nefropatii. Sledují se statisticky významné rozdíly mezi těmito skupinami (Šeda 2005).

1.12. Námi studované polymorfizmy CASR

Jednonukleotidové polymorfizmy, které jsme studovali, byly vybrány na základě již popsaného signifikantního vztahu s ledvinovými komplikacemi, hladinou vápníku, PTH či různými civilizačními chorobami. Rs1501898 se tomuto pravidlu vymyká. Není o něm mnoho publikováno.



Obrázek 8: Přehled studovaných polymorfizmů CASR

Rs7652589 a rs1501898 se nachází v promotorové oblasti CASR genu. P1 a P2 znázorňují umístění promotorů. 2 SNP rs1801725 a rs1042636 se nachází v 7. exonu. Zbývající SNP se nalézají v intronu 4, 5' a 3' nepřepisované oblasti jsou znázorněny bílými obdélníky. Start kodon (ATG) a stop kodon (TGA) se nacházejí v 2. a 7. exonu. ECD, extracelulární doména; TMD, transmembránová doména; ICD, intracelulární doména.

rs7652589

Tento polymorfismus, který se nachází v regulační oblasti *CASR* genu, je asociován se zvýšenou náchylností k tvorbě ledvinových kamenů (Vezzoli *et al.* 2011). Alela A je asociována s rozvojem terminálního stádia ledvinového selhání (ESRD) u pacientů s nefrolithiázou. Genotyp AA je spojen se závažnější formou SHPT (vyšší koncentrace Ca^{2+} a PTH). Alela A je spojena s nižší hladinou transkriptu v mononukleárních buňkách periferní krve (Grzegorzewska *et al.* 2016).

rs1042636

Tento Arg990Gly polymorfismus se nachází v kódující oblasti. Jedná se o jeden z mála polymorfizmů, jehož kauzální účinky byly prokázány na úrovni proteinu. Tento SNP je spojen s primární hyperkalciurií (Vezzoli *et al.* 2002), s nižší hladinou cirkulujícího vápníku u zdravých jedinců (Scillitani *et al.* 2004), a s nižšími plazmatickými hladinami PTH u pacientů s primární nebo sekundární hyperparathyreózou (Corbetta *et al.* 2006, Yano *et al.* 2000). Pacienti s glycinovou alelou vykazují výraznější potlačení PTH po podání cinakalcetu ve srovnání s homozygotními nosiči argininu (Rothe *et al.* 2008). Transfekované buňky exprimující glycinovou alelu v poloze 990 reagují silněji na kalcimimetikum přidané do kultivačního media (Vezzoli *et al.* 2007).

rs1801725

Tento A986S polymorfismus v 7. exonu spolu s rs7652589 zvyšuje riziko SHPT. Homozygotní alela rs1801725 přispívá k úmrtnosti související s infekcí u HD pacientů. Rs1801725 ovlivňuje sérovou hladinu Ca, Mg, P a PTH pouze s jinými *CASR* SNP nebo interakcí s geny signální dráhy vitamínu D (Grzegorzewska *et al.* 2016).

Rs3804597

Tento polymorfismus ve 4. intronu je asociován s vyšší hladinou PTH u hemodialyzovaných pacientů a s rozvojem SHPT (Yano *et al.* 2000).

2. Cíle

Hypotéza

Předpokládáme, že polymorfizmy genů *VDR*, *PTH* a *CASR* jsou predisponující k rozvoji diabetu a jeho komplikací. Proteinové produkty těchto genů významně ovlivňují kalcium-fosfátový metabolismus, který je u diabetu a jeho ledvinových komplikací narušen.

Do správného fungování β -buněk pankreatu a fyziologické sekrece inzulínu jsou významně zapojeny jak draslíkové, tak vápenaté kanály. Chceme tedy ověřit, zda *CASR* jako významný regulátor vápníkové homeostázy, není predisponující faktor pro rozvoj samotného diabetu.

Hlavní cíle dizertační práce byly:

1. Zjistit, zda vybrané polymorfizmy (*FokI*, *BsmI*, *ApaI* a *TaqI*) genu pro receptor vitamínu D nejsou predispoziční pro rozvoj diabetu a diabetické nefropatie.
2. Odhalit, zda polymorfizmy (*BstBI* a *Drall*) genu pro parathormon nejsou predispoziční pro rozvoj diabetu a diabetické nefropatie.
3. Posoudit, zda některé haplotypy *VDR* a *PTH* nemají vliv na rozvoj diabetu a diabetické nefropatie.
4. Zjistit, zda vybrané polymorfizmy (rs3804594 a rs1042636) genu pro kalcium senzitivní receptor nejsou predispoziční pro rozvoj diabetu 1. a 2. typu a diabetické nefropatie.
5. Odhalit, zda vybrané polymorfizmy (rs1501898, rs1801725, rs7652589) genu pro kalcium senzitivní receptor nejsou asociovány s diabetem 1. a 2. typu.

3. Materiál a metody

3.1. Používaný materiál

Vysolovací metoda izolace DNA

RCLB (Red Cell Lysis Buffer): 320 mM sacharosa; 1% (v/v) Triton X100; 12 mM TRIS HCl; 5 mM MgCl₂ · 6H₂O

WCLB (White Cell Lysis Buffer): 120 mM EDTA; pH=8; 375 mM NaCl

Proteinase K z Tritirachium album 30 units/mg (Sigma Aldrich)

SDS; NaCl; 96% ethanol

Agarózová gelová elektroforéza

TBE pufr: 890 mM TRIS báze; 890 mM kyselina boritá; 20mM EDTA pH=8

Loading Dye 6× , 10× (Fermentas)

Bromophenol Blue Loading Solution (Promega)

GelRed® nucleic acid gel stain (Thermo Fisher Scientific)

Marker pUC19 DNA/MspI (Fermentas)

50 bp DNA Ladder (New England BioLabs)

Amplifikace CASR genu pomocí Taqman sond:

TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), TaqMan Discrimination Assay (Applied Biosystems)

PCR amplifikace:

PCR reakční kit (Fermentas): *Taq* DNA Polymerasa 500u/μl, 10 × Taq Buffer (NH₄)₂SO₄,

25 mM MgCl₂

dNTP: dATP, dCTP, dTTP, dGTP, 100 mM (Fermentas): ředěny H₂O (PCR-grade) na pracovní koncentraci 10 mM

Tabulka 2: Seznam použitých primerů pro amplifikaci genů VDR, PTH, CASR

Název	Sekvence	Gen
VDR0 F	CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA ^α	VDR
VDR0 R	AACCAGCGGGAAGAGGTCAAGGG	
VDR2 F	CAGAGCATGGACAGGGAGCAA ^β	VDR
VDR2 R	GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC	
VDR3 F	AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTC ^γ	
VDR3 R	ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC	VDR
PTH3 F	CATTCTGTGTACTATAGTTTG ^δ	
PTH3 R	GAGCTTTGAATTAGCAGCATG	PTH
CASR F	CAGAAGGTCATCTTTGGCAGCGGCA ^ε	
CASR R	TCTTCCTCAGAGGAAAGGAGTCTGG	CASR

V reakci byly použity primery převzaté z literatury: α, β, γ (Israni *et al.* 2009), δ (Gohda *et al.* 2002), ε (Yano *et al.* 2000).

Restrikční enzymy:

Apal (TaKaRa), *BsmI* (New England BioLabs), *BstBI* (New England BioLabs), *Eco O109I* (TaKaRa), *FokI* (TaKaRa), *TaqI* (TaKaRa), *BseRI* (TaKaRa)

3.2. Počítačové programy

7000 Sequence Detection Software 1.2.3 (Applied Biosystems)

NanoPhotometr TM PVC software 5.2.2.2 (Implen)

Kodak Molecular Imaging software 5.0. (Kodak, USA)

GraphPad Prism 5.04 (volně dostupná verze)

3.3. Vzorky pacientů a jejich rozdělení do skupin

V období 2006–2011 byl vytvořen hodnotný soubor pacientů střeoevropské populace. Pacienti jsou evidováni ve Fakultní nemocnici Královské Vinohrady v Praze. Část souboru je tvořena německými pacienty, kteří jsou evidováni ve Fakultní nemocnici v Mannheimu. Kontrolní soubor, který postihuje průřez populace, představují zdraví dárči krve. Do studia byli zařazeni pacienti, kteří splňují následující vstupní kritéria. Diabetičtí

pacienti byli diagnostikováni na základě obecně přijímaných kritérií pro diagnózu diabetu. Skupina DM1 a DM2 je tvořena diabetiky 1. a 2. typu, bez ledvinného poškození (CDK, chronic kidney disease). Skupina NDRD (nediabetická nefropatie) je tvořena pacienty s CDK 2. - 4. stupně na podkladu nediabetické nefropatie. Skupina DN (diabetická nefropatie) je představována pacienty s CDK 2. - 4. stupně na podkladu diabetické nefropatie. Kritéria pro stanovení typu nefropatie jsou klinicko-laboratorní. Projevy manifestní diabetické nefropatie (DN) jsou: proteinurie > 0,5 gramů proteinů v moči za 24 h s anamnézou předcházející mikroalbuminurie, doba trvání diabetu delší než 10 let, normální velikost ledvin na ultrasonografii, nejlépe i přítomnost diabetické retinopatie.

Kritéria pro zařazení do skupiny NDRD typu renovaskulárního onemocnění ledvin (RVO) jsou: negativní proteinurie, negativní mikroalbuminurie, doba trvání diabetu delší než 10 let, zmenšená velikost ledvin na ultrasonografii, nepřítomnost diabetické retinopatie.

Skupina NWD je představována nediabetickými pacienty s chronickým selháním ledvin.

Tabulka 3: Charakteristika souborů pacientů

	DM1	DM2	DN	NDRD	NWD	zdraví dárce
Diabetes	ano	ano	ano	ano	ne	ne
Selhání ledvin diabetického původu	ne	ne	ano	ne	ne	ne
Selhání ledvin nediabetického původu	ne	ne	ne	ano	ano	ne

DM 1 – pacienti s diabetem 1. typu, DM 2 – pacienti s diabetem 2. typu, DN – pacienti s diabetickou nefropatií, NDRD – diabetičtí pacienti s nediabetickou nefropatií, NWD – nediabetičtí pacienti s chronickým selháním ledvin

3.4. Pracovní postupy

3.4.1. Sběr vzorků

Rozšíření a doplnění studie bylo schváleno etickou komisí 3. LF UK a od každého jedince byl před odběrem získán informovaný souhlas. Od každého pacienta bylo odebráno 2 x 5 ml plné periferní krve do zkumavky s antikoagulační látkou EDTA. DNA byla izolována z 0,5 ml plné krve pomocí vysolovací metody dle Millera (Miller *et al.* 1988).

3.4.2 Izolace DNA

K 500 μ l plné krve byl přidán 1 ml RCLB pufru a směs byla 30 s třepána lehce obrácením zkumavky. Poté byla zkumavka stočena 3 min při 16 000 g. Supernatant byl slit a pomocí gázy byla zkumavka zbavena zbytku supernatantu. Sediment byl resuspendován v 1 ml destilované vody a stočen při 16 000 g. Promývání bylo opakováno, dokud nebyl sediment světlý, bez erytrocytů. K sedimentu bylo přidáno 235 μ l dH₂O, 80 μ l WCLB a obsah byl resuspendován. Poté bylo přidáno 40 μ l 10 % SDS a 15 μ l proteinázy K a zkumavka byla inkubována na otáčecím rotátoru při 55 °C 60 min. Po inkubaci byl obsah zkumavky zchlazen na pokojovou teplotu. Poté bylo přidáno 100 μ l 6M NaCl a následně bylo se zkumavkou silně třepáno 15 s. Obsah byl stočen 6 min při 16 000 g a supernatant byl přenesen do nové zkumavky. Supernatant byl smísen s 1 ml čistého etanolu vychlazeného na – 20 °C. DNA byla vysrážena lehkým obrácením zkumavky a poté inkubována 20 min na ledě. Po inkubaci byl obsah stočen 2 min při 16000 g a supernatant byl slit. DNA byla promyta 1 ml 70 % etanolu a stočena 2 min při 16 000 g. Gázou byly stěny zkumavky opatrně zbaveny zbytky etanolu. Poté byla DNA sušena po dobu cca 30 min v laminárním boxu a následně rozpouštěna 24 hod. při 4 °C ve 200 μ l dH₂O. Výtěžek DNA byl kolem 70 - 100 ng/ μ l. DNA byla uchovávána při 4 °C.

3.4.3. Stanovení čistoty a kvality DNA

Kvalita a kvantita DNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí nanofotometru v křemenných kyvetách při vlnové délce λ 260 a 280 nm. Kontaminace DNA proteiny a RNA byla určena porovnáním podílu absorbancí A260/A280 a A260/240 v doporučeném rozmezí pro čistotu DNA 1,8-2,0.

Výtěžek DNA se pohyboval kolem 70 - 100 ng/ μ l. DNA byla uchovávána při 4 °C.

3.4.4. Genotypizace *VDR* a *PTH*

Genotypizace *VDR* a *PTH* byla provedena metodou PCR-RFLP. Pro PCR reakci by použit protokol uvedený v tabulce 4. Podmínky PCR reakcí pro konkrétní polymorfismus jsou uvedeny níže.

Tabulka 4: Obecné složení směsi pro jednu PCR

Složka	Množství (μl)
Taq Buffer (NH ₄) ₂ SO ₄ (10 ×)	5
dNTPs (2 mM)	5
MgCl	3
Forward Primer (100 μM)	0,25
Reverse Primer (100 μM)	0,25
Taq polymerasa (5U/ μl)	0,2
H ₂ O	33,3
DNA (30 ng/ μl)	3
celkový objem	47

Podmínky PCR pro polymorfismus *BsmI* genu *VDR*:

1. krok 60 s při 95 °C
2. krok 60 s při 95 °C
3. krok 60 s při 68 °C
4. krok 60 s při 72 °C opakování kroků 1- 4 (30krát)
5. krok 5 min při 72 °C

Podmínky PCR pro polymorfizmy *Apal* a *TaqI* genu *VDR*:

1. krok 5 min při 95 °C
2. krok 60 s při 95 °C
3. krok 60 s při 66 °C
4. krok 60 s při 72 °C opakování kroků 1- 4 (30krát)
5. krok 5 min při 72 °C

Podmínky PCR pro polymorfismus *FokI* genu *VDR*:

1. krok 1 min. při 95 °C
2. krok 30 s při 95 °C
3. krok 30 s při 66 °C
4. krok 30 s při 72 °C opakování kroků 1- 4 (30krát)
5. krok 5 min při 72 °C

Podmínky PCR pro polymorfizmy *DraIII* a *BstBI* genu *PTH*:

1. krok 5 min při 95 °C
2. krok 30 s při 95 °C
3. krok 30 s při 52 °C
4. krok 30 s při 72 °C opakování kroků 1- 4 (35krát)
5. krok 5 min při 72 °C

Po PCR byla amplifikace požadovaného produktu ověřena elektroforézou v 2% agarózovém gelu a vyhovující produkty byly podrobeny enzymatickému štěpení příslušnou restriční endonukleázou podle podmínek uvedených v tabulkách 5, 6, 7, 8, 9, 10:

FokI polymorfismus

Tabuka 5: Složení reakční směsi pro jednu RFLP reakci

Komponenty	Objem (μl)
H ₂ O	10,45
Buffer 10 × M	2
BSA 0,1 %	0,25
<i>FokI</i>	0,3
PCR produkt	7
celkový objem	20

Reakce probíhala 12 hod při 65°C.

***BsmI* polymorfismus**

Tabulka 6: Složení reakční směsi pro jednu RFLP reakci

Komponenty	Objem (μl)
H ₂ O	12,2
Buffer 10 × M	2,5
<i>BsmI</i>	0,3
PCR produkt	10
celkový objem	25

Reakce probíhala 10 hod při 65 °C.

***TaqI* polymorfismus**

Tabulka 7: Složení reakční směsi pro jednu RFLP reakci

Komponenty	Objem (μl)
H ₂ O	11,95
Buffer 10 × M	2,5
BSA 0,1 %	0,25
<i>TaqI</i>	0,3
PCR produkt	10
celkový objem	25

Reakce probíhala 12 hod při 65 °C.

***ApaI* polymorfismus**

Tabulka 8: Složení reakční směsi pro jednu RFLP reakci

Komponenty	Objem (μl)
H ₂ O	12,2
Buffer 10 × M	2,5
<i>ApaI</i>	0,3
PCR produkt	10
celkový objem	25

Reakce probíhala 12 hod při 37 °C.

***Bst*BI polymorfismus**

Tabulka 9: Složení reakční směsi pro jednu RFLP reakci

Komponenty	Objem (μl)
H ₂ O	15,2
Buffer 10 × M	2,5
<i>Bst</i> BI	0,3
PCR produkt	7
celkový objem	25

Reakce probíhala 12 hod. při 65°C.

***Dra*II polymorfismus**

Tabulka 10: Složení reakční směsi pro jednu RFLP reakci

Komponenty	Objem (μl)
H ₂ O	15,2
Buffer 10 × M	2,5
<i>Dra</i> II	0,3
PCR produkt	7
celkový objem	25

Reakce probíhala 12 hod. při 37 °C.

Naštěpené fragmenty byly podrobeny elektroforetické separaci na 3% agarózovém gelu.

3.4.5. Genotypizace *CASR*

Genotypizace rs3804594 byla provedena metodou PCR-RFLP a genotypizace polymorfizmů rs1042636, rs1801715, rs765289, rs1501898 pomocí TaqMan sond.

3.4.5.1. PCR-RFLP genotypizace

Pro PCR reakci by použit protokol uvedený v tabulce 11. Podmínky PCR reakce jsou uvedeny níže.

Tabulka 11: Složení směsi pro jednu PCR

Složka	Množství (μl)
Taq Buffer (NH ₄) ₂ SO ₄ (10 ×)	2,5
dNTPs (2 mM)	1,25
MgCl (25mM)	2
Forward Primer (100 μM)	0,2
Reverse Primer (100 μM)	0,2
Taq polymerasa (5U/ μl)	0,2
H ₂ O	17,25
DNA (30ng/ul)	1,4
celkový objem	25

Podmínky PCR pro rs3804594:

1. krok	5 min při 94	
2. krok	30 s při 94	
3. krok	30 s při 68	
4. krok	30 s při 72	opakování kroků 1-4 (34krát)
5. krok	5 min při 72	

Po PCR byla amplifikace požadovaného produktu ověřena elektroforézou v 2% agarózovém gelu a vyhovující produkty byly podrobeny enzymatickému štěpení restrikční endonukleázou *BseRI* podle podmínek uvedených v tabulce 12.

Tabulka 12: Složení reakční směsi pro jednu RFLP reakci

Komponenty	Objem (μl)
H ₂ O	14,2
Buffer 10 × M	2,5
<i>BseRI</i>	0,3
PCR produkt	8
celkový objem	25

Reakce probíhala 14 hod při 37°C.

3.4.5.2. Genotypizace pomocí TaqMan sond

Pro každý testovaný polymorfismus byla připravena reakční směs podle pokynů výrobce (tabulka 14). Reakce pro každý vzorek probíhaly v duplikátech. 96-jamková destička byla po napitování všech reagensů uzavřena optickou fólií a centrifugována 2 min při 900 x g. Genotypizace probíhala v termocykleru 7500 Fast Real Time system s příslušným teplotním programem a podmínkami doporučeným výrobcem uvedenými níže.

Tabulka 13: Cílové sekvence polymorfizmů CASR

SNP	Cílová sekvence[VIC/FAM]	Genotypy
rs1042636	TAATTGGCTGCATAATCGGGCGCCA[A/G]GGCGC	AA
	CAACATTAATGAGATCCGCC	AG
		GG
rs1801725	GAGCTTTGATGAGCCTCAGAAGAAC[G/T]CCATG	GG
	GCCACAGGAATTCTACGCA	GT
		TT
rs7652589	AAGCATCGGGTTTAGAGGAGCCAAA[C/T]TGGTG	CC
	AGGATGTGGGAATCTGGGAA	CT
		TT
rs1501899	ATCATTCAAATGTTTATAGAGTGC[A/C]TGGCT	AA
	ATGTGCCAGTCACTGGGAAC	AC
		CC

Teplotní program a podmínky genotypizace:

1. krok 60 s při 60 °C
2. krok 10 min při 95 °C
3. krok 15 s při 95 °C
4. krok 60 s při 60 °C opakování kroků 1- 4 (30krát)
5. krok 5 min při 72 °C

Tabulka 14: Složení reakční směsi pro jednu TaqMan reakci

H ₂ O	2,5
2x TagMan Universal PCR Master mix	2,5
Sonda	0,5
DNA (20ng/ul)	2,5
Celkový objem 7,5 ul	

3.4.6. Agarózová elektroforéza

Pro identifikaci PCR produktů a separaci produktů enzymatického štěpení byla provedena horizontální gelová elektroforéza. Agarózový gel byl připraven z příslušného množství agarózy rozpuštěné v 1% TBE pufru. Vizualizace fragmentů byla provedena přidáním 2,5 µl interkalačního činidla GelRed na 100 ml gelu. Vzorky byly smíchány a nanášeny spolu s 6x koncentrovaným nanášecím pufrům a pro identifikaci velikosti byl do jedné z jamek přidán marker velikosti. Elektroforetická separace probíhala při 5 V/cm a hodnocení fragmentů po proběhnuté elektroforéze probíhalo pod UV kamerou.

4. Výsledky

4.1. Genotypizace VDR a PTH

Byla provedena genotypizace 4 polymorfizmů VDR: rs1544410 (*BsmI*), rs7975232 (*Apal*), rs731236 (*TaqI*) a rs2228570 (*FokI*) a 2 polymorfizmů PTH rs6254 (*BstBI*) a rs6256 (*DraII*) u pacientů a zdravých kontrol, jejichž charakteristika je shrnuta v tabulce 15.

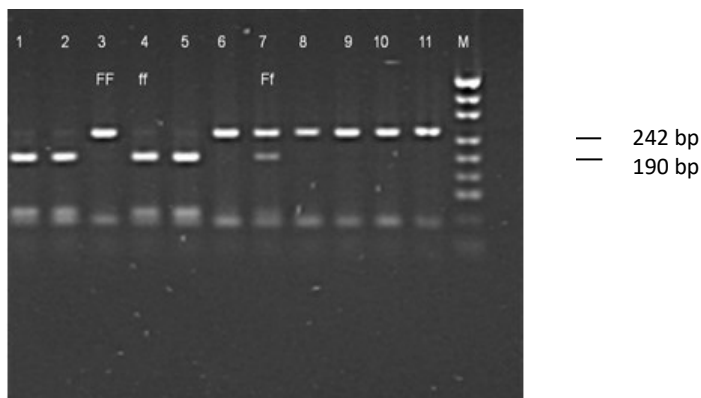
Tyto výsledky byly publikovány v článku Vedralové a kol. 2012 (viz příloha 1) a navazují na moji diplomovou práci. Ve výsledcích uvádím tabulky s frekvencemi genotypů a alel polymorfizmů, u kterých jsme zjistili statisticky významné zastoupení genotypu nebo alel.

Tabulka 15: Rozdělení vyšetřovaného souboru pacientů

skupina	NDRD	DM1	DM2	DN	zdraví
počet pacientů ve skupině	47	54	116	132	118
pohlaví	19 žen 28 mužů	22 žen 32 mužů	54 žen 92 mužů	57 žen 75 mužů	67 žen 51 mužů
průměrný věk	80±1,16	41±16,9	67±12,44	70±13	45±7,31
arteriální hypertenze	77 % ano	14 % ano	56 % ano	80 % ano	ne
diabetická retinopatie	13 % ano	14 % ano	21 % ano	83 % ano	ne
U–alb. (g/24h)	0,08±0,12	0,004±0,004	0,04±0,15	0,82±0,12	<0,15g/24
DU–proteinurie (g/24h)	0,30±0,27	0,01±0,001	0,12±0,39	2,80±3,14	<0,03g/24
S–Cr (μmol/l)	162±44,6	90,42±15,51	112,94±60,72	308±227,12	44-110 muži 44-104 ženy
HbA1C (%)	7,8±1,89	6,27±0,77	6,09±2,01	7,21±2,13	2,8±4

U–alb = albuminurie, DU–protein = celkový protein v moči za 24 hod, S–Cr = sérový kreatinin, HbA1C = glykovaný hemoglobin, DM1 – pacienti s diabetem 1. typu, DM2 – pacienti s diabetem 2. typu, DN – pacienti s diabetickou nefropatií, NDRD – pacienti s nediabetickou nefropatií.

4.1.1. Genotypizace polymorfizmu *FokI* genu *VDR*



Obrázek 9: Genotypizace polymorfizmu *FokI* genu *VDR*

Výsledek restriktivního štěpení náhodně vybraných vzorků pacientů s DN označených 1-11. Homozygot FF je detekován přítomností fragmentu o délce 242 bp (vzorky 3, 6, 8, 9, 10, 11). Heterozygot je detekován přítomností fragmentů o délce 256 bp, 196 bp a 69 bp (vzorek 7). Homozygot ff je detekován přítomností fragmentů o délce 196 bp a 69 bp (vzorek 1, 2, 4, 5). Značkou M je označen žebříček.

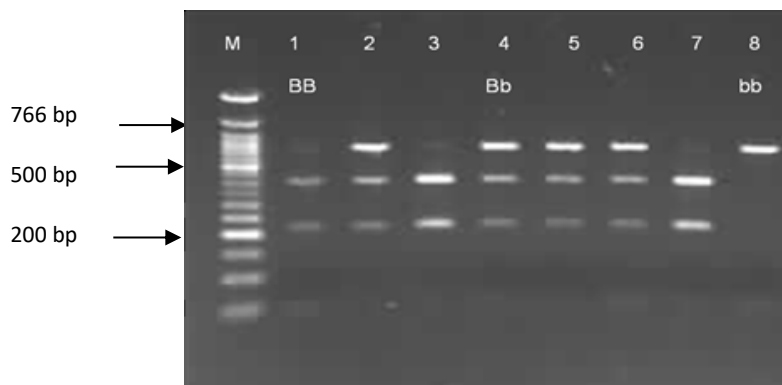
Frekvence genotypů a alel polymorfizmu *FokI* byla porovnávána mezi skupinami pacientů a zdravými kontrolami (tabulka 16). Nalezli jsme statisticky významné rozdíly v distribuci genotypů u DM1 ($P=0,034$) a u DN (10^{-4}). Alela F se zdá být predispoziční pro rozvoj diabetické nefropatie ($P=0,002$).

Tabulka 16: Frekvence genotypů a alel *FokI* polymorfizmu *VDR* genu

<i>VDR</i>	NDRD	DM1	DM2	DN	zdraví
Genotyp/alela	N (frekvence)	(frekvence)	(frekvence)	(frekvence)	(frekvence)
ff	3 (0,064)	10 (0,185)	18 (0,155)	11 (0,083)	12 (0,106)
Ff	28 (0,596)	25 (0,463)	60 (0,517)	58 (0,439)	76 (0,673)
FF	16 (0,340)	19 (0,352)	38 (0,328)	63 (0,477)	25 (0,221)
HWE P	0,047	0,474	0,476	0,644	0,000
P–hodnota	0,25	0,034	0,0571	10^{-4}	
f	34 (0,362)	45 (0,416)	96 (0,438)	80 (0,303)	100 (0,442)
F	60 (0,638)	63 (0,584)	136 (0,586)	184 (0,697)	126 (0,558)
P–hodnota	0,214	0,724	0,571	0,002	
OR	1,401	0,900	1,124	1,825	
95%CI	0,958–1,267	0,566–1,431	0,776–1,628	1,259–2,646	

N–počet vyšetřených pacientů v dané skupině s výsledným genotypem/alelou. Podle Hardy – Weinbergova zákon (HWE): $P < 0,05$ populace není v souladu HWE. Hodnota P udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro Fisherův dvoustranný test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti 95%CI.

4.1.2. Genotypizace polymorfizmu *BstBI* genu *PTH*



Obrázek 10: Genotypizace polymorfizmu *BstBI* genu *PTH*

Výsledek restričního štěpení náhodně vybraných vzorků pacientů s DN označených 1-8. Homozygot BB je detekován přítomností fragmentů o délce 387 bp a 213 bp (vzorek 1, 3, 7). Heterozygot Bb je detekován přítomností fragmentů 600 bp, 387 bp, a 213 bp (vzorky 2, 4, 5, 6). Homozygot bb je detekován přítomností fragmentu o délce 600 bp (vzorek 8). Značkou M je označen žebříček.

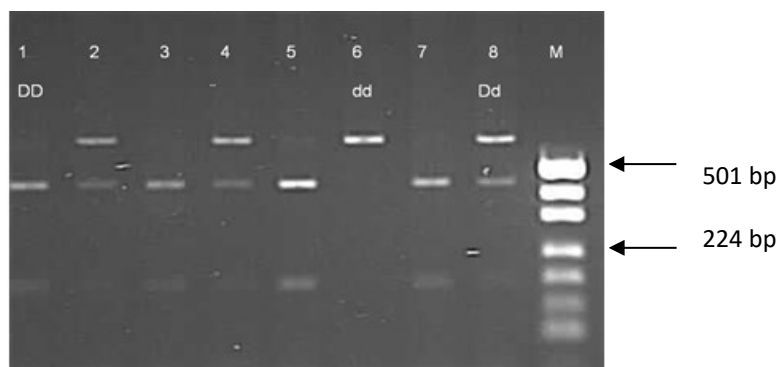
Frekvence genotypů a alel polymorfizmu *BstBI* byla porovnávána mezi skupinami pacientů a zdravými kontrolami (tabulka 17). Nalezli jsme statisticky významné rozdíly v distribuci genotypů u DN ($P=0,023$). Alela B se zdá být predispoziční pro rozvoj diabetické nefropatie ($P=0,011$).

Tabulka 17: Frekvence genotypů a alel *BstBI* polymorfizmu *PTH* genu

<i>PTH</i>	NDRD	DM1	DM2	DN	zdraví
Genotyp/alela	N (frekvence)	N (frekvence)	N (frekvence)	N (frekvence)	N (frekvence)
bb	5 (0,111)	7 (0,137)	14 (0,135)	12 (0,106)	20 (0,241)
Bb	25 (0,556)	26 (0,509)	47 (0,452)	46 (0,407)	33 (0,398)
BB	15 (0,333)	18 (0,354)	43 (0,413)	55 (0,487)	30 (0,361)
HWE P	0,257	0,543	0,000	0,029	0,079
P–hodnota	0,123	0,620	0,173	0,023	
b	35 (0,338)	40 (0,392)	75 (0,360)	70 (0,309)	73 (0,439)
B	55 (0,662)	62 (0,608)	133 (0,640)	156 (0,691)	93 (0,561)
P–hodnota	0,508	0,524	0,136	0,011	
OR	1,233	0,822	1,392	1,749	
95%CI	0,731–2,081	0,497–1,358	0,917–2,113	1,153–2,653	

N–počet vyšetřených pacientů v dané skupině s výsledným genotypem/alelou. Podle Hardy – Weinbergova zákon (HWE): $P < 0,05$ populace není v souladu HWE. Hodnota P udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro Fisherův dvoustranný test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti 95%CI.

4.1.3. Genotypizace *Drall* polymorfizmu *PTH* genu



Obrázek 11: Genotypizace *Drall* polymorfizmu *PTH* genu

Výsledek restrikčního štěpení náhodně vybraných vzorků pacientů s DN označených 1-8. Homozygot DD je detekován přítomností fragmentů o délce 420 bp a 180 bp (vzorky 1, 3, 5, 7). Heterozygot Dd je detekován fragmenty o délce 600 bp, 420 bp a 180 bp (vzorky 2, 4, 8). Homozygot dd je detekován přítomností fragmentů o délce 600 bp (vzorek 6). Značkou M je označen žebříček.

Frekvence genotypů a alel polymorfizmu *Drall* byla porovnávána mezi skupinami pacientů a zdravými kontrolami (tabulka 18). Nalezli jsme statisticky významné rozdíly v distribuci genotypů u všech skupin pacientů: u NDRD ($P=0,003$), DM1 ($P=10^{-4}$), DM2 ($P=10^{-4}$) a DN ($P=10^{-3}$). Alela D je predispoziční pro rozvoj diabetu a jeho komplikací: NDRD ($P=0,015$), DM1 ($P=0,005$), DM2 ($P=0,007$) a DN ($P=0,003$).

Tabulka 18: Frekvence genotypů a alel *Drall* polymorfizmu *PTH* genu

<i>PTH</i>	NDRD	DM1	DM2	DN	zdraví
Genotyp/alela	N (frekvence)	N (frekvence)	N (frekvence)	N (frekvence)	N (frekvence)
dd	1 (0,022)	2 (0,039)	5 (0,049)	1 (0,009)	1 (0,0011)
Dd	15 (0,326)	14 (0,269)	32 (0,311)	42 (0,375)	56 (0,636)
DD	30 (0,652)	36 (0,692)	66 (0,641)	69 (0,616)	31(0,352)
HWE P	0,576	0,708	0,663	0,047	0,000
P–hodnota	0,003	10^{-4}	10^{-4}	10^{-3}	
d	17 (0,185)	18 (0,173)	42 (0,204)	44 (0,196)	58 (0,329)
D	75 (0,815)	86 (0,827)	164 (0,796)	180 (0,804)	118 (0,671)
P–hodnota	0,015	0,005	0,007	0,003	
OR	2,168	0,426	1,919	2,011	
95%CI	1,174–4,004	0,234–0,774	1,209–3,047	1,275–3,171	

N–počet vyšetřených pacientů v dané skupině s výsledným genotypem/alelou. Podle Hardy – Weinbergova zákon (HWE): $P < 0,05$ populace není v souladu HWE. Hodnota P udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro Fisherův dvoustranný test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti 95%CI.

4.1.4. Porovnání kombinací genotypů *VDR* a *PTH* mezi skupinami DN, DM2 a zdravými kontrolami

Při porovnání všech možných kombinací genotypů *VDR* mezi zdravými kontrolami a skupinou DN jsme našli haplotyp **BBFFAATt** ($P=0,046$) u 7 jedinců (6,5 %) s DN. Tento haplotyp u zdravých kontrol nalezen nebyl.

Při porovnání všech možných kombinací genotypů *VDR* mezi skupinou DM2 a DN jsme našli haplotyp **BbFFAaTt** ($P=0,018$) u 21 jedinců (19,4 %) skupiny DN. Tento haplotyp byl nalezen u 9 jedinců (8,6 %) s DM2.

Při porovnání všech možných kombinací genotypů *PTH* mezi zdravými kontrolami a skupinou DN jsme našli 2 statisticky významné haplotypy. Haplotyp **bbDd** ($P=10^{-4}$) byl nalezen u 16 zdravých kontrol (19,8 %) a u 1 jedince (0,9 %) s DN. Haplotyp **BBDD** ($P=0,002$) byl nalezen u 30 jedinců (27 %) s DN a 8 zdravých jedinců (9,9 %).

Při porovnání všech možných kombinací genotypů *PTH* mezi zdravými kontrolami a DM2 jsme našli 2 statisticky významné haplotypy. Haplotyp **bbDd** (10^{-4}) byl nalezen u 16 zdravých kontrol (19,8 %) a u 2 jedinců s DM2 (1,9 %). Haplotyp **BBDD** ($P=0,019$) byl nalezen u 8 zdravých kontrol (9,9 %) a u 23 jedinců s DM2 (22,3%).

Tabulka 19: Haplotypy *VDR* *BsmI-FokI-ApaI-TaqI* a *PTH* *BstBI-DraIII* mezi DN, DM2 a zdravými kontrolami

Haplotyp	DN vs. zdraví P–hodnota OR (95%CI)	DM2 vs. zdraví P–hodnota OR (95%CI)	DN vs. DM2 P–hodnota OR (95%CI)
Gen <i>VDR</i>			
BBFFAATt	0,046 0,935 (0,890–0,983)	NS	NS
BBFFAaTt	NS	NS	0,018 2,575 (1,119–5,923)
Gen <i>PTH</i>			
bbDd	10^{-4} 2,623 (1,105–6,229)	10^{-4} 0,080 (0,018–0,361)	NS
BBDD	0,002 3,380 (1,457–7,841)	0,019 2,623 (1,105–6,229)	NS

Vzhledem k nízkému počtu pacientů byly skupiny NDRD a DM1 vyřazeny z dalšího statistického hodnocení. Porovnávány byly pouze 2 skupiny pacientů DN a DM2 vs. zdravé kontroly. V tabulce jsou uvedené kombinace genotypů, které splňují podmínku $P<0,05$. Zbylé kombinace genotypů nebyly statisticky významné, a proto z důvodů přehlednosti uváděny nebyly.

4.2. Genotypizace CASR

4.2.1. Genotypizace polymorfizmů rs1042636 a rs3804594 genu CASR

Byla provedena genotypizace polymorfizmů rs1042636 a rs3804594 genu CASR u pacientů a zdravých kontrol a další kontrolní skupiny NWD (nediabetičtí pacienti s ledvinovým selháním). Parametry vyšetřovaného souboru pacientů jsou uvedeny v tabulce 20. Výsledky této genotypizace byly publikovány v článku Železníkové a kol. 2014 (viz. příloha 2).

Rs3804594 byl vyšetřován metodou PCR-RFLP a rs1042636 byl vyšetřován metodou PCR s využitím genotypizačních TaqMan sond.

Tabulka 20: Parametry vyšetřovaného souboru a laboratorní charakteristika pacientů

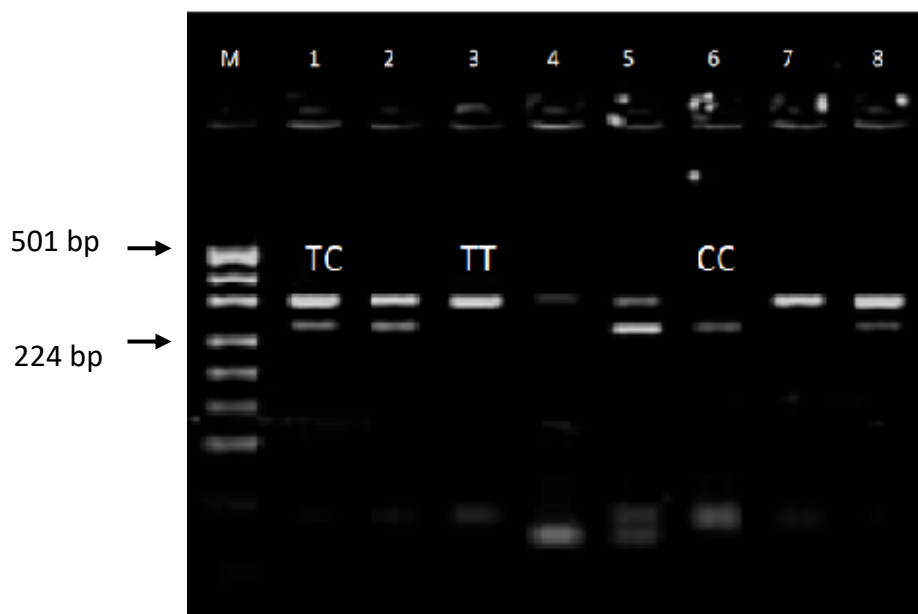
skupina	DM2	DN	NDRD	NWD	Kontroly
počet pacientů ve skupině	48	58	52	66	93
pohlaví (% žen)	54	53	42	40	56
věk	66	70	79	55	34
trvání diabetu	24	21	26	-	-
diabetická retinopatie (%)	21	100	24	ne	ne
DU-proteinurie (g/24hod)	0,001	3,55 (2,25–14,8)	0,41 (0,02–1,24)	0,89 (0–5,32)	ne
S–creatinin (μmol/l)	72,06	276,55	168,06	245,42	44-110 muži 44-104 ženy
S–Ca (mmol/l)	2,42	2,25	2,44	2,37	n/a
S–P (mmol/l)	1,09	1,56	1,12	1,11	n/a
S–PTH (pmol/l)	n/a	17,94	32,75	135,23	n/a

DU–proteinurie = celkový protein v moči za 24 hod, S–Cr = sérový kreatinin, S–Ca=sérový vápník, S–P=sérový fosfor, S–PTH=sérový parathormon, NWD skupina–nediabetici s chronickým selháním ledvin. DM2 – diabetici 2. typu, DN – diabetici s diabetickou nefropatií, NDRD – diabetici s nediabetickou nefropatií, NWD – nediabetičtí pacienti s chronickým selháním ledvin, n/a nebylo měřeno

Laboratorní hodnoty sérového vápníku, fosforu a parathormonu (tabulka 20) se mezi skupinami pacientů signifikantně neliší. Tyto hodnoty se nachází ve fyziologických mezích. To může být způsobeno korekcí hladin Ca²⁺, P a PTH léky. U zdravých dárců krve není rutinně stanovován vápník, fosfor a parathormon, avšak je stanovován sérový kreatinin a jiné biochemické ukazatelé, které všechny musí být ve fyziologických mezích.

4.2.1.1. Genotypizace rs3804594 genu *CASR*

Pomocí PCR byl namnožen produkt o délce 320 bp. Pokud je přítomna substituce T→C, restriktáza *BSeRI* tento produkt štěpí na dva fragmenty o délce 260 bp a 60 bp. Homozygot TT je detekován přítomností fragmentu o délce 320 bp. V případě heterozygota TC byly detekovány 3 fragmenty o délce 320 bp, 260 bp a 60 bp. V případě CC homozygota byly detekovány 2 fragmenty o délce 260 bp a 60 bp.



Obrázek 12: Genotypizace rs3804594 genu *CASR*

Výsledek restriktivního štěpení náhodně vybraných vzorků pacientů s DM2 označených 1-8.

Homozygot TT byl detekován přítomností fragmentu o velikosti 320 bp (vzorky v dráze 3, 4 a 7).

Heterozygot TC byl detekován přítomností fragmentů o velikosti 320, 260 a 60 bp (vzorky v dráze 1, 2,

8). Homozygot CC byl detekován přítomností fragmentů o velikosti 260 a 60 bp (vzorky v dráze 5 a 6).

Jako M byl označen žebříček.

Frekvence genotypů a alel polymorfizmu rs3804594 byla porovnávána mezi skupinami pacientů a zdravými kontrolami a mezi skupinami pacientů a kontrolní skupinou NWD (nediabetičtí pacienti s ledvinovým selháním). Zjištěné frekvence genotypů a alel jsou ukázány v tabulce 21. Nalezli jsme statisticky významné rozdíly mezi frekvencemi genotypů u všech skupin pacientů v porovnání se zdravými kontrolami, kromě skupiny DN: DM2 ($P=0,002$); NDRD ($P=0,0001$); NWD ($P=0,0005$).

Nenalezli jsme statisticky významné rozdíly mezi genotypy u zkoumaných skupin pacientů a kontrolní skupinou NWD kromě skupiny DN (P=0,03).

Nenalezli jsme staticky významné rozdíly mezi frekvencemi alel u žádné skupiny pacientů.

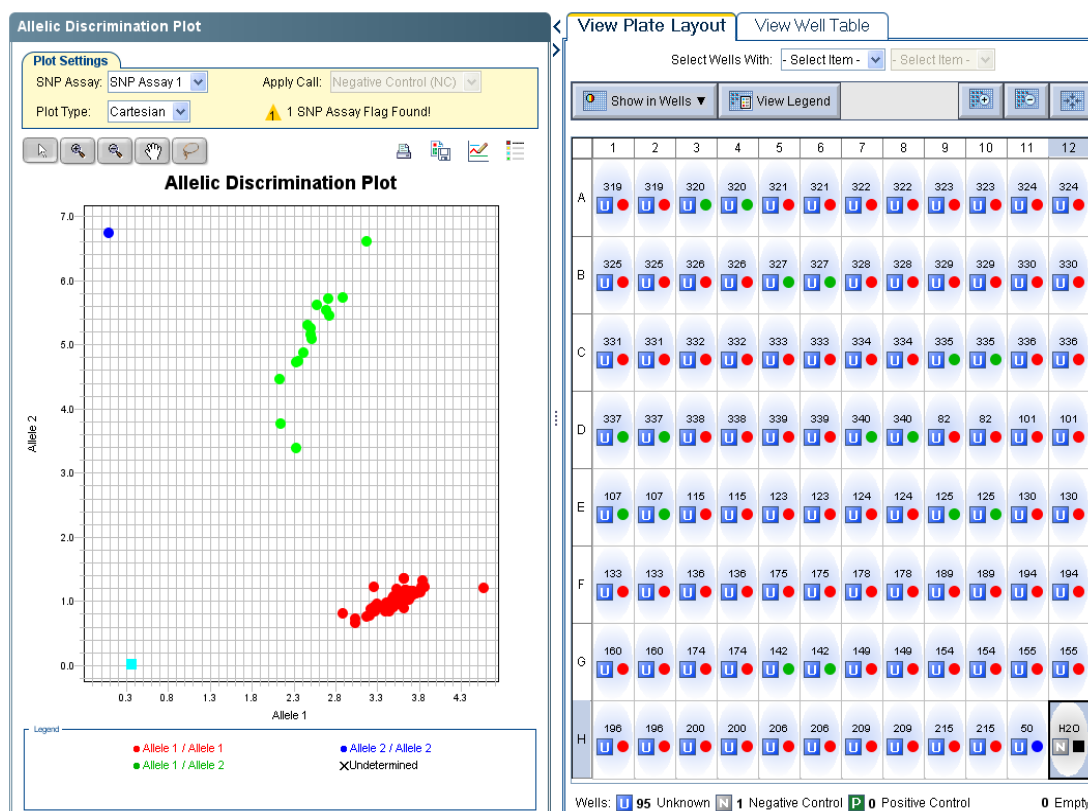
Tabulka 21: Frekvence genotypů a alel rs3804594

CASR genotyp/alela	DM2 % (N=48)	DN % (N=58)	NDRD % (N=52)	NWD % (N=65)	zdraví % (N=93)
TT	56,25 (27)	32,76 (19)	50,00 (26)	52,86 (34)	33,33 (31)
TC	37,50 (18)	63,79 (37)	34,61 (18)	39,99 (26)	66,67 (62)
CC	6,25(3)	3,45 (2)	15,38 (8)	7,15 (5)	0
HWE P	1,00	0,002	0,123	0,99	0,000
P–hodnota (vs. zdraví)	0,002	0,19	0,0001	0,0005	-
P–hodnota (vs. NWD)	0,98	0,03	0,41	-	-
T alela	75,00 (72)	64,66 (75)	69,91 (70)	72,08 (94)	66,67 (124)
C alela	25,00 (24)	35,34 (41)	30,09 (34)	27,92 (36)	33,33 (62)
P–hodnota, OR (95%CI) (vs. zdraví)	0,17; 0,67 (0,38–1,16)	0,80; 1,01 (0,67–1,78)	1,00; 0,97 (0,58–1,62)	0,32; 1,31 (0,79–2,13)	- -
P–hodnota, OR (95%CI) (vs. NWD)	0,76; 0,87 (0,48–1,59)	0,22; 1,43 (0,83–2,45)	0,47; 1,27 (0,72–2,22)	- -	- -

Zkratky použité v tabulce: N – počet vyšetřených pacientů v dané skupině s výsledným genotypem, % – zastoupení genotypů v jednotlivých skupinách v procentech. P – hodnota udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro Fisherův dvoustranný test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti 95%CI. Podle Hardy – Weinbergova zákon (HWE): P < 0,05 populace není v souladu HWE.

4.2.1.2. Genotypizace rs1042636 genu *CASR*

Genotypizace rs1042636 genu *CASR* byly provedena TaqMan sondami. TaqMan sondy jsou oligonukleotidy s navázanou fluorescenční značkou na 5'-konci. Na 3'-konci se nachází nefluorescenční zhášec a molekula vázající se do malého žlábků DNA, tzv. MBP (minor groove binder). Pokud se zhášec nalézá v blízkosti značky na 5'-konci, tlumí její fluorescenci. Naopak pokud se fluorescenční značka nachází dostatečně daleko od zhášeče, dojde k emisi fluorescence.



Obrázek 13: Reálný výstup grafického zobrazení diskriminace alel pomocí 7000 Sequence Detection Software 1.2.3. u vybraných pacientů polymorfizmu rs1042636 genu *CASR*

Každý vzorek byl vyšetřen v dupletu, jako negativní kontrola byla k reakční směsi pipetována voda. Alely byly přiřazeny k jednotlivým vzorkům na základě naměřené fluorescence ve fázích pre-read a post-read. Vzorky byly rozděleny do 3 skupin: červeně vyznačený vzorek alela 1/ alela 1 představuje homozygota s navázanou VIC sondou, zeleně označený vzorek alela 1/ alela 2 představuje heterozygota s navázanou VIC a FAM sondou a modře označený vzorek alela 2/alela 2 představuje homozygota s navázanou FAM sondou.

Frekvence genotypů a alel polymorfizmu rs1042636 genu *CASR* byla porovnávána mezi skupinami pacientů a zdravými kontrolami a mezi skupinami pacientů a kontrolní skupinou NWD (nediabetičtí pacienti s ledvinovým selháním). Zjištěné frekvence genotypů a alel jsou ukázány v Tabulce 22. Nenezli jsme žádné statisticky významné rozdíly mezi genotypy. Nalezli jsme pouze mírný statistky významný rozdíl mezi alelami ve skupině DN a zdravými kontrolami ($P=0,03$).

Tabulka 22: Frekvence genotypů a alel rs1042636

CASR genotyp/alela	DM2 % (N=48)	DN % (N=58)	NDRD % (N=52)	NWD % (N=66)	zdraví % (N=93)
AA	91,67 (44)	94,82 (55)	94,23 (49)	88,73 (59)	87,10 (81)
AG	8,33 (4)	5,18 (3)	5,77 (3)	9,09 (6)	7,52 (7)
GG	0	0	0	1,51 (1)	5,38 (5)
HWE P	0,82	0,83	0,83	0,101	0,000
P–hodnota (vs. zdraví)	0,26	0,16	0,21	0,44	-
P–hodnota (vs. NWD)	0,68	0,42	0,53	-	-
A alela	95,83 (92)	97,41 (113)	97,15 (101)	93,66 (124)	90,86 (169)
G alela	4,17 (4)	2,59 (3)	2,85 (3)	6,34 (8)	9,14 (17)
P–hodnota, OR (95%CI) (vs. zdraví)	0,16; 0,43 (0,14–1,16)	0,03 ; 0,26 (0,08–0,92)	0,05; 0,29 (0,08–1,01)	0,54; 1,38 (0,60–3,21)	- -
P–hodnota, OR (95%CI) (vs. NWD)	0,57; 0,59 (0,18–2,01)	0,15; 0,37 (0,30–1,85)	0,24; 0,41 (0,10–1,39)	- -	- -

Zkratky použité v tabulce: N – počet vyšetřených pacientů v dané skupině s výsledným genotypem, % – zastoupení genotypů v jednotlivých skupinách v procentech. P – hodnota udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro Fisherův dvoustranný test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti 95 % CI. Podle Hardy – Weinbergova zákon (HWE): $P < 0,05$ populace není v souladu HWE.

4.2.2. Genotypizace rs1501898, rs1801725 a rs7652589 genu *CASR*

Genotypizace rs1501898, rs1801725 a rs7652589 genu *CASR* byla provedena TaqMan sondami u pacientů s DM1 a DM2 a zdravých kontrol. Výsledky této studie nebyly publikovány.

4.2.2.1. Genotypizace rs1501898 genu *CASR*

Zjištěné frekvence genotypů a alel jsou ukázány v tabulce 23. Nenalezli jsme žádný statisticky významný rozdíl mezi frekvencemi genotypů a alel u zkoumaných skupin pacientů.

Tabulka 23: Frekvence genotypů a alel rs1501898

CASR genotyp/alela	DM1 % (N=76)	DM2 % (N=80)	zdraví % (N=87)
AA	6,58 (5)	3,75 (3)	2,06 (2)
AC	22,37 (17)	32,50 (26)	30,97 (30)
CC	71,05 (54)	63,75 (51)	66,97 (65)
HWE P	0,04	0,88	0,49
P–hodnota (vs. zdraví)	0,18	0,76	-
A alela	17,76 (27)	20,00 (32)	17,52 (34)
C alela	82,24 (125)	80,00 (128)	82,48 (160)
P–hodnota, OR (95%CI) (vs. zdraví)	1,00; 1,016 (0,58–1,77)	0,58; 1,176 (0,69–2,01)	-

DM1 – diabetici 1. typu, DM2 – diabetici 2. typu, N – počet vyšetřených pacientů v dané skupině s výsledným genotypem, % – zastoupení genotypů v jednotlivých skupinách v procentech. P – hodnota udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro Fisherův dvoustranný test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti 95 %CI Podle Hardy – Weinbergova zákon (HWE): $P < 0,05$ populace není v souladu HWE.

4.2.2.2. Genotypizace rs1801725

Zjištěné frekvence genotypů a alel jsou ukázány v tabulce 24. Nenalezli jsme žádný statisticky významný rozdíl mezi frekvencemi genotypů a alel u zkoumaných skupin pacientů.

Tabulka 24: Frekvence genotypů a alel CASR rs1801725

CASR genotyp/alela	DM1 % (N=80)	DM2 % (N=90)	zdraví % (N=101)
GG	70,00 (56)	64,44 (58)	74,51 (76)
GT	28,75 (23)	33,33 (30)	24,51 (24)
TT	1,25 (1)	2,23 (2)	0,98 (1)
HWE P	0,42	0,40	0,55
P–hodnota (vs. zdraví)	0,79	0,29	-
G alela	84,38 (135)	81,11(146)	86,76 (177)
T alela	15,62 (25)	18,89 (34)	13,24 (27)
P–hodnota, OR (95%CI) (vs. zdraví)	0,55; 0,82 0,46–1,48	0,16; 0,66 0,38–1,14	-

DM1 – diabetici 1. typu, DM2 – diabetici 2. typu, N – počet vyšetřených pacientů v dané skupině s výsledným genotypem, % – zastoupení genotypů v jednotlivých skupinách v procentech. P – hodnota udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro Fisherův dvoustranný test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti CI 95 %. Podle Hardy – Weinbergova zákon (HWE): $P < 0,05$ populace není v souladu HWE.

4.2.2.3. Genotypizace rs7652589

Nalezli jsme statisticky významný rozdíl mezi frekvencemi genotypů mezi skupinou DM1 a zdravými kontrolami ($P=0,0098$). Nalezli jsme mírný statisticky významný rozdíl mezi alelami u DM1 a zdravými kontrolami ($P=0,04$).

Tabulka 25: Frekvence genotypů a alel rs7652589

CASR genotyp/alela	DM1 % (N=80)	DM2 % (N=90)	zdraví % (N=102)
GG	22,5 (18)	12,22 (11)	6,86 (7)
AG	43,75 (35)	47,77 (43)	52,94 (54)
AA	33,75 (27)	40,01 (36)	40,20 (41)
HWE P	0,31	0,73	0,05
P–hodnota (vs. zdraví)	0,0098	0,42	-
G alela	44,38 (71)	36,11 (65)	33,33 (68)
A alela	55,62 (89)	63,89 (115)	66,67 (136)
P–hodnota, OR (95%CI) (vs. zdraví)	0,04 ; 0,66 (0,38–1,14)	0,59; 1,13 (0,74–1,72)	-

DM1 – diabetici 1. typu, DM2 – diabetici 2. typu, N – počet vyšetřených pacientů v dané skupině s výsledným genotypem, % – zastoupení genotypů v jednotlivých skupinách v procentech. P – hodnota udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro Fisherův dvoustranný test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti CI 95 %. Podle Hardy – Weinbergova zákon (HWE): $P < 0,05$ populace není v souladu HWE.

5. Diskuze

Zaměřili jsme se na studium vybraných jednonukleotidových polymorfizmů v genech kódující receptor pro vitamín D (*VDR*), parathormon (*PTH*) a kalcium senzitivní receptor (*CASR*) u diabetických pacientů střeoevropského původu. Diabetes mellitus je onemocnění komplexní a postihuje kromě metabolismu glukózy i metabolismus vápníku a fosfátu. Onemocnění ledvin u diabetiků vzniká v důsledku diabetické metabolické poruchy a dosud nepřesně definované genetické predispozice. Poruchy kalciofosfátového metabolismu ovlivňují u diabetických pacientů progresi chronického onemocnění ledvin.

Vyšetřované skupiny pacientů byly rozděleny na diabetiky 1 a 2. typu bez komplikací (DM1 a DM2), diabetiky trpící diabetickou nefropatií (DN) a diabetiky trpící selháním ledvin nediabetického původu (NDRD). Uvědomujeme si, že takové rozdělení pacientů může být sporné, neboť u diabetických pacientů se mohou rozvíjet ledvinové komplikace po mnoha letech trvání diabetu a nelze tedy dopředu říct, zda pacient z diabetické skupiny bez komplikací nebude po několika letech trpět také ledvinovým selháním diabetického původu. Z genetického hlediska se tedy jedná o obtížně definovatelnou skupinu pacientů s heterogenním genetickým pozadím.

Jako kontrolní skupiny jsme použili 2 soubory. První soubor tvořili zdraví dárce krve a další samostatnou kontrolní skupinu představovali nediabetičtí pacienti s nediabetickým ledvinovým selháním (NWD). Kontrolní skupina NWD se zdá být vhodnější skupinou než zdraví dárce krve. Věkově je NWD (průměrný věk 55 let) bližší skupinám zkoumaných pacientů a lze u nich s větší pravděpodobností předpokládat, že se u nich s přibývajícím věkem nebude rozvíjet diabetes tak jako u zdravých dárců krve (průměrný věk 34 let).

Pokud bychom se blíže zaměřili na typ nefropatie, musíme konstatovat, že většina pacientů nepodstoupila renální biopsii. Ta bývá jako invazivní metoda indikována pouze v určitých případech. Pro naši studii je tedy renální biopsie nedostupný materiál, a my jsme se tento nedostatek snažili kompenzovat zpřísněním kritérií pro diagnózu diabetické nefropatie.

Volba metody genotypizace u našeho projektu byla závislá na počtu zkoumaných SNP a počtu vzorků DNA. Pro rozsáhlý genotypový projekt s vysokým počtem zkoumaných SNP a malým počtem vzorků jsou ideální čipové technologie. Vzhledem k limitům našeho projektu a k malému počtu zkoumaných SNP, ale relativně velkému počtu vzorků, jsme se zaměřili na použití hybridizačních TaqMan sond. Výhodou TaqMan sond je vysoká přesnost, časová

efektivnost a finanční dostupnost. Vedle této metody jsme dále použili klasickou metodu založenou na selektivním restriktivním štěpení daných polymorfizmů (PCR-RFLP).

Dosud nebyly odhaleny žádné obecné „velké“ kandidátní geny predisponující k diabetu. Kandidátních genů „malého účinku“ byla vytipována celá řada, ale bohužel se opakovaně stalo, že asociace daného genu s nemocí se při testování na jiném souboru pacientů nepotvrdila.

Polymorfizmy genu *VDR* a *PTH*

V souvislosti s poruchou kalcium–fosfátového metabolismu byly zkoumány geny, jejichž proteinové produkty významně ovlivňují kalcium–fosfátový metabolismus v ledvinách, a u nichž se předpokládá vliv na patogenezi jak samotného diabetu, tak ledvinného poškození. Receptor vitamínu D (*VDR*) patří do velké rodiny nukleárních receptorů a transkripčních faktorů. Mezi nejvýznamnější regulátory kalciového a fosfátového metabolismu patří též parathormon (*PTH*).

V genu *VDR* byly pomocí restriktivních endonukleáz *BsmI*, *FokI*, *TaqI* a *ApaI* nalezeny strejnojmenné polymorfizmy, u kterých byla prokázána asociace s některými chronickými onemocněními. Vyšetřili jsme výše zmíněné polymorfizmy *BsmI*, *FokI*, *TaqI* a *ApaI* genu *VDR* a polymorfizmy *Drall* a *BstBI* genu *PTH* u diabetiků 1. a 2. typu a pacientů s ledvinovými komplikacemi (Vedralová a kol. 2012; viz příloha1).

Ukázali jsme, že polymorfismus *FokI* je predispoziční pro rozvoj diabetu 1. typu a diabetické nefropatie. Naše výsledky jsou v souladu se studií Ponsonby a kol. (Ponsonby *et al.* 2008). U diabetiků 1. typu je polymorfismus *FokI* asociován s diabetickou retinopatií (Taverna *et al.* 2005). U hemodialyzovaných pacientů se saturací transferinu <20% je alela F zastoupena častěji než u hemodialyzovaných pacientů se saturací transferinu >20%. Alely genu *VDR* jsou asociovány s hladinami železa a nutričními markery, které jsou vysoce prediktivní proměnné kardiovaskulární morbidity a mortality u hemodialyzovaných pacientů (Amato *et al.* 2008). Polymorfismus *FokI* může určovat odezvu příštítných tělísek u pacientů s chronickým selháním ledvin (Gago *et al.* 2005). Naše výsledky potvrzují toto zjištění, protože jsme našli vyšší frekvenci alely F u pacientů s diabetickou nefropatií.

Nenalezli jsme signifikantní asociaci polymorfizmů *BsmI*, *ApaI* a *TaqI* u vyšetřovaných skupin pacientů. Některé studie rovněž nepotvrdily signifikantní asociaci uvedených polymorfizmů u pacientů s diabetem 1. a 2. typu (Dilmec *et al.* 2010, Oh *et al.* 2002). Naopak

jiné studie provedené v Německu a Taiwanu asociaci s diabetem 1. typu nalezly (Pani *et al.* 2000, Chang *et al.* 2000).

V naší studii nás dále zájímalo, zda některé kombinace genotypů *VDR* a *PTH* nelze využít v prediktivní diagnostice rozvoje ledvinových komplikací u diabetiků.

Shledali jsme haplotypy BBFFAATt a BbFFAaTt genu *VDR* jako rizikové pro rozvoj diabetické nefropatie. S diabetem 1. typu jsou asociovány haplotypy BFAt a BfAT (Israni *et al.* 2009). V chorvatské populaci byla označena kombinace BBAAtt jako riziková pro rozvoj diabetu 1. typu (Škrabič *et al.* 2003).

Naše výsledky ukazují, že haplotyp BBDD je asociován s diabetem 2. typu a diabetickou nefropatií, ale nemá prediktivní hodnotu, podle které bychom mohli předpovědět, zda se u diabetika rozvinou ledvinové komplikace.

Haplotyp bbDd, resp. alely b a d mají podle našich výsledků protektivní roli před rozvojem diabetu 2. typu a jeho ledvinových komplikací.

Kanzawa a kol. ve své studii porovnával vztah mezi polymorfizmy *Drall* a *BstBI* a rozvojem primární hyperparathyreózy, ale nenalezl žádnou asociaci genotypů *PTH* a zkoumaného onemocnění (Kanzawa *et al.* 1999). U hemodialyzovaných pacientů se sekundární hyperparathyreózou nebyl nalezen rozdíl ve frekvenci genotypů *PTH* (Gohda *et al.* 2002).

Polymorfizmy genu *CASR*

CASR vykazuje funkční mnohostrannost a aktivuje množství různých signálních drah. Svými účinky se stal rozhodujícím faktorem pro fyziologické a patofyziologické procesy související s homeostázou vápníku a zdá se být vhodným kandidátním genem pro naši studii.

Analyzovali jsme celkem 5 polymorfizmů v genu *CASR*. Výsledky genotypizace byly rozděleny do 2 studií. Polymorfizmy rs1042636 a rs3804594 byly vyšetřeny u diabetiků 2. typu s ledvinovými komplikacemi a bez ledvinových komplikací a byly porovnávány se skupinou zdravých dárců krve a se skupinou NWD (Zelesnikova *et al.* 2014, viz příloha 2). Polymorfizmy rs1501898, rs7652589 a rs1801725 byly vyšetřeny u diabetiků 1. a 2. typu a byly porovnány pouze se zdravými dárci krve. Výsledky této studie publikovány nebyly.

Naše výsledky ukazují, že v porovnání se zdravými kontrolami, je polymorfismus rs3804594 rizikovým faktorem pro rozvoj diabetu 2. typu a NWD ne však DN. Z těchto zjištění

Ize předpokládat jeho ochrannou roli polymorfizmu v rozvoji této mikrovaskulární chronické komplikace diabetu.

Z hlediska rozložení genotypů je zvláštní, že naše kontrolní skupina obsahuje 33 % TT a 67 % TC, ale genotyp CC nalezen nebyl. Yano s kolegy vyšetřoval tento polymorfismus u japonských hemodialyzovaných pacientů. Část pacientů měla diabetes, přičemž původ ledvinového selhání uveden není. Zastoupení genotypů u hemodialyzovaných pacientů bylo následující: n (TT)=73, n (TC)=29 a n (CC)=20. CC genotyp byl zastoupen v 16 %. Zdravý jedinci genotypizováni nebyli. Naše výsledky vykazují CC genotyp u skupiny DN 3 %, u NDRD 15 % a u skupiny NWD 7 %. Proč jsme nenalezli žádný CC genotyp u zdravých kontrol je tedy těžké zodpovědět. Z těchto zjištění bychom mohli usuzovat, že CC genotyp je predispoziční pro rozvoj ledvinových komplikací a diabetu. Metoda PCR-RFL, kterou jsme použili pro analýzu polymorfizmu nacházejícího se v intronu 4, byla převzata od tohoto autora (Yano *et al.* 2000). Pokud jsme porovnávali rs3804594 u skupin pacientů s NWD skupinou, našli jsme statisticky významné rozdíly u zkoumaných genotypů pouze pro jednu skupinu pacientů, a to DN.

Genotypizace polymorfizmu rs1042636 neodhalila statisticky významné rozdíly v zastoupení genotypů či alel u zkoumaných skupin.

Polymorfismus rs1042636 byl poměrně intenzivně zkoumán jako kandidátní gen pro studium etiopatogeneze urolitiázy. Řada prací se zabývala hledáním asociace mezi urolitiázou a vysokou hladinou vápníku. Výsledky těchto analýz zůstávají stále rozporuplné. Corbetta s kolegy nenašel rozdíl ve frekvenci genotypů mezi kontrolní skupinou a pacienty s PHPT (Corbetta *et al.* 2006). Výzkumy provedené na německé a italské kohortě pacientů s PHPT (Miedlish *et al.* 2001, Cetani *et al.* 2002) jsou v souladu s těmito zjištěními.

Zmíněné studie dokládají, že tento polymorfismus se nezdá být predispoziční pro rozvoj PHPT. V souladu s těmito zjištěními se autoři těchto prací zaměřili na to, zda určitý genotyp může ovlivnit klinický průběh PHPT. Zjistili, že záměna argininu za glycin na pozici 990 může souviset s klinickým fenotypem PHPT. Pacienti s genotypy G/G a G/A vykazují nižší sérovou hladinu PTH, vyšší kalciurii a zvýšenou náchylností k urolitiáze. Tato data jsou tedy v rozporu s předchozími zjištěními autorů, kteří nenalezli asociaci rs1042636 s PHPT (Miedlish *et al.* 2001, Cetani *et al.* 2002). Rozpor je pravděpodobně způsoben nízkým počtem pacientů zařazených do předchozích studií a vzácným výskytem tohoto polymorfizmu u kavkazské populace.

Asociace alely G s nižšími hladinami PTH byla pozorována u japonských pacientů s primární a sekundární HPT, kde je tento polymorfismus zastoupen mnohem častěji, pravděpodobně v souvislosti s odlišným etnickým a genetickým pozadím (Yamauchi *et al.* 2001).

Nenalezli jsme žádnou asociaci rs1801725 a rs1501898 u zkoumaných skupin pacientů. Zjistili jsme však, že polymorfismus rs7652589 je asociován s diabetem 1. typu. Statistickou analýzou byla prokázána významnost alely A pro rozvoj diabetu 1. typu.

Bylo zjištěno, že polymorfismus rs7652589 je rizikovým faktorem pro rozvoj nefrolithiázy v čínské populaci (Li *et al.* 2018). V evropské populaci polymorfismus rs7652589 zvyšuje u PHPT pacientů riziko rozvoje ledvinových kamenů (Vezzoli *et al.* 2011). Tento polymorfismus leží v regulační oblasti genu CASR a souvisí zřejmě s úrovní genové exprese.

Kalciové a kaliové kanály v sekreci inzulínu

Není překvapující, že kalcium senzitivní receptor je predisponující faktor pro rozvoj samotného diabetu mellitu. Do fungování β -buněk pankreatu a fyziologické sekrece inzulínu jsou významně zapojeny jak draslíkové tak vápenaté kanály.

Zvýšená hladina glukózy indukuje zvýšený tok draselných iontů do buňky draslíkovým kanálem KATP. Protein kalium/potassium inward rectifier 6.2 (KIR6.2) spojený se sulfonylureovým receptorem 1 (SUR1) formuje kanál KATP. Protein KIR6.2 je kódovaný genem *KCNJ11*. Protein SUR1 je kódovaný genem *ABCC8*. Gen *KCNJ11* je lokalizován hned za genem *ABCC8*, v té samé oblasti chromozomu 11. Obě molekuly, KIR6.2 a SUR1, se vzájemně ovlivňují fyzicky i funkčně, protože společně regulují draslíkový vnitřní usměrňovač proudu a tím depolarizaci β -buněk, která spouští uvolnění inzulínu (Ashcroft 2006).

Metabolismus glukózy změní poměr ADP/ATP, což aktivuje vnější část draslíkového kanálu SUR1 a uzavře přilehlou vnitřní část draslíkového kanálu KIR6.2. Uzavření draslíkových kanálů změní membránový potenciál a otevře vápenaté/kalciové kanály. Kationty vápníku iniciují uvolnění vytvořených vezikul obsahujících inzulín. Mutace v genu *KCNJ11* mohou způsobit diabetes kvůli snížené schopnosti ATP inhibovat aktivitu kanálu KATP a zvýšené schopnosti MgATP současně stimulovat funkci tohoto kanálu. Tím dochází k nedostatečné stimulaci sekrece inzulínu, což se nakonec manifestuje DM.

Iontové, draslíkové i vápenaté, kanály byly podle celogenomových asociačních studií (GWAS) označeny jako predispoziční pro poruchu inzulínové sekrece. Z literatury je zřejmé, že

několik variant genu *KCNJ11* je spojeno s různými typy DM, jak multifaktoriálními (DM1 a DM2), tak monogenními (novorozenecký DM). Tím je rozkryt plynulý přechod od monogenní formy přes polygenní k multifaktoriální, který závisí na stupni poškození funkce proteinu danou mutací/variantou. Mutace genu *KCNJ11* mohou vést k monogennímu autozomálně dominantnímu typu, přechodnému či trvalému novorozeneckému DM (Madani *et al.* 2016).

KCNJ11 obsahuje 219 SNP, z nichž šesti byla věnována větší pozornost právě kvůli asociaci s diabetem. Těchto šest SNP zahrnuje rs5219, rs5215, rs5210, rs5218, rs886288 a rs2285676.

Nejvýznamnější asociace byla nalezena pro nonsynonymní polymorfismus aminokyselin rs 5219 (E23K, substituce kladně nabitého lyzinu K za záporně nabitou kyselinu glutamovou E na proteinové pozici 23), a to ve velkých studiích i v následných meta-analýzách (Hani *et al.* 1998; Gloyn *et al.* 2001; Gloyn *et al.* 2003; Nielsen *et al.* 2003; Love-Gregory *et al.* 2003; Florez *et al.* 2004; van Dam *et al.* 2005). Funkční studie ukázaly, že varianta rs5219 může změnit náboj oblasti vázající ATP a snížit citlivost kanálu na ATP, což vede k nadměrné aktivitě kanálu a následnému potlačení sekrece inzulínu.

Tento účinek na sekreci inzulínu je významnější u nositelů genotypu AA ve srovnání s nosiči genotypu GA (Liu *et al.* 2006). Podobné výsledky byly pozorovány u hladiny plazmatické glukózy nalačno a postprandiální plazmatické glukózy u pacientů s DM2. Alela A u těchto pacientů zvyšuje hladinu glukózy v plazmě nalačno a hladinu postprandiální plazmatické glukózy (Gonen *et al.* 2012, Shaat *et al.* 2005).

Hypertenze je hlavní komplikací DM2. Četné publikace nezávisle pozorovaly, že polymorfismus rs5219 hraje v tomto onemocnění významnou roli. Nosiči alely A měli vyšší hladiny HbA1c a krevní tlak v porovnání s nosiči alely G (He *et al.* 2008; Sakamoto *et al.* 2007; Koo *et al.* 2007; Lang *et al.* 2012).

Polymorfismus rs5215 je umístěn v exonu 1 genu *KCNJ11*. Jedná se o nesynonymní mutaci způsobenou substitucí aminokyseliny isoleucinu G za valin A na proteinové pozici 250 (A250G, GTC → ATC). Valin je hydrofobní, zatímco isoleucin je jednou ze tří aminokyselin s rozvětvenými uhlovodíkovými postranními řetězci. Několik studií prokázalo silnou asociaci mezi touto variantou genu a DM2 (Chavali *et al.* 2011; Liu *et al.* 2006; Sakamoto *et al.* 2007). V jiné studii byla nalezena asociace tohoto polymorfismu s hypertenzí (Koo *et al.* 2007).

Polymorfismus rs5210 je umístěn ve vysoce konzervované 3' netranslatované oblasti genu *KCNJ11*. Studie potvrdily predispozici tohoto polymorfismu k DM2 (Liu *et al.* 2006; Koo *et*

al. 2007). Alela G působí jako potencionální cíl pro miR-1910, zatímco alela A ruší vazbu miRNA na tuto oblast. MiRNA regulují syntézu a uvolňování inzulínu z β -buněk (Dehwah *et al.* 2012; Alvarez *et DiStefano* 2013).

Regulace uvolňování inzulínu je zprostředkována genem *KCNJ11* v interakci s různými jinými geny, jako je *ABCC8*, *ABCC9* a *CACNA1A-G*. *CACNA1A-G* kódují různé typy vápníkových (VSCC) kanálů, které interagují s draslíkovým kanálem na úrovni buněčné membrány.

KATP interagují na intracelulární úrovni s proteinem PRKACG kódovaným stejnojmenným genem. Tento protein je gama katalytická podjednotka proteinové kinázy, která se podílí na exocytóze zprostředkované různými cestami (signalizace zprostředkovaná vápníkem či hormonem) a rovněž aktivuje buněčné procesy pomocí intracelulární proteinkinázy A (Soberg *et al.* 2013). Kir6.2 interaguje dále s proteiny RAPGEF4, FOXA2 a ENSA, kódovanými stejnojmennými geny. RAPGEF4 je protein, který aktivuje cAMP. FOXA2 funguje jako aktivátor transkripce pro geny kódující alfa-fetoprotein, albumin a tyrosinaminotransferázu. ENSA je endogenní ligand pro SUR1, který stimuluje sekreci inzulínu (Guttula *et al.* 2010; Fogarty *et al.* 2014). Snížená koexprese těchto genů může zvýšit riziko rovoje diabetu. Přesný funkční vztah vyplývající z propojení těchto genů uplatňujících se při regulaci uvolňování inzulínu však musí být teprve stanoven.

Gen kódující kalium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1 (*KCNQ1*) je lokalizován v oblasti chromozomu 11p15, která je známá tím, že se zde nacházejí dvě seskupení imprintovaných genů, *H19/IGF2* a *KCNQ1*. V genu *KCNQ1* je kolokalizován transkript *KCNQ1OT1*, který kontroluje regionální imprinting a ovlivňuje expresi sousedních genů včetně genu cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (*CDKN1C*), známého regulátora vývoje β -buněk. V samotné oblasti genu *KCNQ1* jsou přítomné dva SNPs, které jsou asociované s DM2, jen pokud je od matky děděna predispoziční exprimovaná alela. Další SNP, ležící blíže druhého seskupení imprintovaných genů, *H19/IGF2*, nese riziko pouze tehdy, když je děděn paternálně, ale je protektivní, když je děděn maternálně (Kong *et al.* 2009).

Dvě nezávislé GWAS u japonských pacientů identifikovaly varianty genů *KCNQ1*, které jsou spojeny s DM2 (Unoki *et al.* 2008, Yasuda *et al.* 2008). Tyto varianty genů byly zkoumány u nizozemské populace a bylo potvrzeno, že jsou významně asociovány se zvýšeným rizikem rozvoje DM2 také u evropské populace, ale nejsou rizikové pro rozvoj diabetických komplikací (van Vliet Ostaptchouk *et al.* 2012).

Gen *KCNQ1* je rovněž exprimován v ledvinách. INDEL (inzerční/deleční) polymorfismus v intronu 12 genu *KCNQ1* představuje rizikový faktor pro zhoršenou funkci ledvin. Inzerční alela je obecně spojena se sníženou glomerulární filtrací nezávislé na diagnóze DM2 (Riobello *et al.* 2016).

6. Závěr

1. Zjistili jsme statisticky významné rozdíly v distribuci genotypů polymorfizmu *FokI* genu *VDR* u DM1 ($P=0,034$) a DN (10^{-4}). Alela F je predispoziční pro rozvoj diabetické nefropatie ($P=0,002$).

2. Nalezli jsme statisticky významné rozdíly v distribuci genotypů polymorfizmu *BstBI* genu *PTH* u DN ($P=0,023$). Alela B je predispoziční pro rozvoj diabetické nefropatie ($P=0,011$).

Nalezli jsme statisticky významné rozdíly v distribuci genotypů polymorfizmu *DraIII* genu *PTH* u všech skupin pacientů: u NDRD ($P=0,003$), DM1 ($P=10^{-4}$), DM2 ($P=10^{-4}$) a DN ($P=10^{-3}$). Alela D je predispoziční pro rozvoj diabetu a jeho komplikací: NDRD ($P=0,015$), DM1 ($P=0,005$), DM2 ($P=0,007$) a DN ($P=0,003$).

3. Haplotypy **BBFFAATt** ($P=0,046$) a **BbFFAaTt** ($P=0,018$) genu *VDR* jsou predispoziční pro rozvoj diabetické nefropatie.

Haplotyp **bbDd** genu *PTH* má protektivní účinek před rozvojem diabetické nefropatie ($P=10^{-4}$) a samotného diabetu (10^{-4}).

Haplotyp **BBDD** je rizikový pro rozvoj diabetické nefropatie ($P=0,002$) i samotného diabetu ($P=0,019$). Nelze ho tedy využít v prediktivní diagnostice rozvoje ledvinových komplikací u diabetu.

4. Nalezli jsme statisticky významné rozdíly mezi frekvencemi genotypů rs3804594 u všech skupin pacientů v porovnání se zdravými kontrolami, kromě skupiny DN: DM2 ($P=0,002$); NDRD ($P=0,0001$); NWD ($P=0,0005$). Polymorfizmus rs3804594 je rizikovým faktorem pro rozvoj diabetu a jeho ledvinových komplikací.

5. Nalezli jsme statisticky významný rozdíl mezi frekvencemi genotypů polymorfizmu rs7652589 mezi skupinou DM1 ($P=0,0098$) a zdravými kontrolami. Nalezli jsme mírný statisticky významný rozdíl mezi alelami u DM1 a zdravými kontrolami ($P=0,04$). Polymorfizmus rs7652589 je predispoziční pro rozvoj diabetu 1. typu.

7. Literatura

- [1] Alvarez M. L., DiStefano J. K. (2013): The role of non-coding RNAs in diabetic nephropathy: potential applications as biomarkers for disease development and progression. *Diabetes Research and Clinical Practice* 99: 1–11.
- [2] Amato M., Pacini S., Aterini S., Punzi T., Gulisano M., Ruggiero M. (2008): Iron indices and vitamin D receptor polymorphisms in hemodialysis patients. *Advances in Chronic Kidney Disease* 15: 186–190.
- [3] American Diabetes Association (2010): Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 33 (Supplement 1): S62–S90.
- [4] Anwand A. B., Garland H. O. (1990): Renal calcium and magnesium handling in experimental diabetes mellitus in the rat. *Acta Endocrinologica* 122: 479–486.
- [5] Ashcroft F. M. (2006): KATP channels and insulin secretion: a key role in health and disease. *Biochemical Society Transactions* 34: 243–246.
- [6] Awazu M., Ishikura K., Hida M., Hoshiya M. (1999): Mechanisms of Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in Experimental Diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology* 10: 738–745.
- [7] Bach J. F. (2002): The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *The New England Journal of Medicine* 347: 911–920.
- [8] Bai M. (2004): Structure-function relationship of the extracellular calcium-sensing receptor. *Cell Calcium* 35: 197–207.
- [9] Bai M., Trivedi S., Kifor O., Quinn S. J., Brown E. M. (1999): Intermolecular interactions between dimeric calcium-sensing receptor monomers are important for its normal function. *PNAS* 96: 2834–2839.
- [10] Bai S. Z., Sun J., Wu H., Zhang N., Li H. X., Li G. W. (2012): Decrease in calcium-sensing receptor in the progress of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Research and Clinical Practice* 95: 378–385.
- [11] Bartoš V., Pelikánová T. (2003): *Praktická diabetologie*, 3. vydání. 1–496: 49–50.
- [12] Baudry C., Rebours V., Houillier P., Hammel P., Ruzniewski P., Levy P. (2010): Recurrent acute pancreatitis caused by association of a novel mutation of the calcium-sensing receptor gene and a heterozygous mutation of the SPINK1 gene. *Pancreas* 39: 420–421.
- [13] Benson V. S., Vanleeuwen J. A., Taylor J., Somers G. S., McKinney P. A., Van Til L. (2010): Type 1 diabetes mellitus and components in drinking water and diet: a population-

- based, case-control study in Prince Edward Island, Canada. *Journal of the American College of Nutrition* 29: 612–624.
- [14] Berndt T., Kumar R. (2009): Novel mechanisms in the regulation of phosphorus homeostasis. *Physiology* 24: 17–25.
- [15] Berridge M. J., Lipp P., Bootman M. D. (2000): The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1: 11–21.
- [16] Bingham P., Brazell I. A., Owen M. (1969): The effect of parathyroid extract on cellular activity and plasma calcium levels in vivo. *Journal of Endocrinology* 45: 387–400.
- [17] Brown E. M. (2007): The calcium-sensing receptor: physiology, pathophysiology and CaR-based therapeutics. *Subcellular Biochemistry* 45: 139–167.
- [18] Brown E. M., Bai M., Pollak M. (1997): Familial benign hypocalciuric hypercalcemia and other syndromes of altered responsiveness to extracellular calcium. In: *Metabolic Bone Diseases* (3rd ed.): 479–499.
- [19] Brown E. M., Fuleihan G. E. H., Chen C. J., Kifor O. (1990): A comparison of the effects of divalent and trivalent cations on parathyroid hormone release, 30,50-cyclic-adenosine monophosphate accumulation, and the levels of inositol phosphates in bovine parathyroid cells. *Endocrinology* 127: 1064–1071.
- [20] Brown E. M., Gamba G., Riccardi D., Lombardi M., Butters R., Kifor O., Sun A., Hediger M. A., Lytton J., Hebert S. C. (1993): Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366: 575–580.
- [21] Brown E. M., MacLeod R. J. (2001): Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiological Reviews* 81: 239–297.
- [22] Bubeníček P. (2005): Cinacalcetum. *Remedia* 15: 107–109.
- [23] Canaff L., Hendy G. N. (2002): Human calcium-sensing receptor gene. Vitamin D response elements in promoters P1 and P2 confer transcriptional responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin. *Journal of Biological Chemistry* 277: 30337–30350.
- [24] Canaff L., Hendy G. N. (2005): Calcium-sensing receptor gene transcription is up-regulated by the proinflammatory cytokine, interleukin-1 β . Role of the NF-kappaB PATHWAY and kappaB elements. *Journal of Biological Chemistry* 280: 14177–14188.
- [25] Cardwell C. R., Stene L. C., Joner G. (2010): Birthweight and the risk of childhood-onset type 1 diabetes: a meta-analysis of observational studies using individual patient data. *Diabetologia* 53: 641–651.

- [26] Cavanaugh A., McKenna J., Stepanchick A., Breitwieser G. E. (2010): Calcium-sensing receptor biosynthesis includes a cotranslational conformational checkpoint and endoplasmic reticulum retention. *Journal of Cell Biology* 285: 19854–19864.
- [27] Ceriello A. (2011): Diabetic complications: from oxidative stress to inflammatory cardiovascular disorders. *Medicographia* 33: 29–34.
- [28] Cetani F., Borsari S., Vignali E., Pardi E., Picone A., Cianferotti L., Rossi G., Miccoli P., Pinchera A., Marcocci C. (2002): Calcium-sensing receptor gene polymorphisms in primary hyperparathyroidism. *Journal of Endocrinological Investigation* 25: 614–619.
- [29] Cetani F., Picone A., Carrai P., Vignali E., Borsari S., Pardi E., Viacava P., Naccarato G. A., Miccoli P., Kifor O., Brown E. M., Pinchera A., Marcocci C. (2000): Parathyroid expression of calcium-sensing receptor protein and in vivo parathyroid hormone- Ca^{2+} set point in patients with primary hyperparathyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85: 4789–4794.
- [30] Cohen M. P., Urdanivia E., Surma M., Wu V. Y. (1980): Increased glycosylation of glomerular basement membrane collagen in diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 95: 765–769.
- [31] Colella M., Gerbino A., Hofer A. M., Curci, S. (2016): Recent advances in understanding the extracellular calcium-sensing receptor. *F1000Research*, 5, F1000 Faculty Rev–2535.
- [32] Cook A. E., Mistry S. N., Gregory K. J., Furness S. G., Sexton P. M., Scammells P. J., Conigrave A. D., Christopoulos A., Leach K. (2015): Biased allosteric modulation at the cas receptor engendered by structurally diverse calcimimetics. *British Journal of Pharmacology* 172: 185–200.
- [33] Corbetta S., Eller-Vainicher C., Filopanti M., Saeli P., Vezzoli G., Arcidiacono T., Loli P., Syren M. L., Soldati L., Beck-Peccoz P., Spada A. (2006): R990G polymorphism of the calcium-sensing receptor and renal calcium excretion in patients with primary hyperparathyroidism. *European Journal of Endocrinology* 155: 687–692.
- [34] Dahlquist G. G., Blom L. G., Persson L. A., Sandström A. I., Wall S. G. (1990): Dietary factors and the risk of developing insulin dependent diabetes in childhood. *British Medical Journal* 300: 1302–1306.
- [35] de Boer I. H., Rue T. C., Hall Y. N., Heagerty P. J., Weiss N. S., Himmelfarb J. (2011): Temporal trends in the prevalence of diabetic kidney disease in the United States. *JAMA* 305: 2532–2539.
- [36] Deftos L. J., Weisman M. H., Williams G. W., Karpf D. B., Frumar A. M., Davidson B. J., Parthemore J. G., Judd H. L. (1980): Influence of age and sex on plasma calcitonin in human beings. *The New England Journal of Medicine* 302: 1351–1353.

- [37] Dehwah M. A. S., Xu A., Huang Q. (2012): MicroRNAs and type 2 diabetes/obesity. *Journal of Genetics and Genomics* 39: 11–18.
- [38] Deng S., Vatamaniuk M., Huang X., Doliba N, Lian M. M., Frank A., Velidedeoglu E., Desai N. M., Koeberlein B., Wolf B., Barker C. F., Naji A., Matschinsky F. M., Markmann J. F. (2004): Structural and Functional Abnormalities in the Islets Isolated From Type 2 Diabetic Subjects. *Diabetes* 53: 624–632.
- [39] Dilmeç F., Uzer E., Akkafa F., Kose E., van Kuilenburg A. B. (2010): Detection of VDR gene Apal and TaqI polymorphisms in patients with type 2 diabetes mellitus using PCR-RFLP method in a Turkish population. *Journal of Diabetes and its Complications* 24: 186–191.
- [40] Dusilová Sulková S. (2005): Cinacalceti hydrochloridum. *Remedia* 15: 235–245.
- [41] Felderbauer P., Klein W., Bulut K., Ansorge N., Dekomien G., Werner I., Epplen J. T., Schmitz F., Schmidt W. E. (2006): Mutations in the calcium-sensing receptor: a new genetic risk factor for chronic pancreatitis? *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 41: 343–348.
- [42] Florez J. C., Burt N., de Bakker P. I., Almgren P., Tuomi T., Holmkvist J., Gaudet D., Hudson T. J., Schaffner S. F., Daly M. J., Hirschhorn J. N., Groop L., Altshuler D. (2004): Haplotype structure and genotype-phenotype correlations of the sulfonylurea receptor and the islet ATP-sensitive potassium channel gene region. *Diabetes* 53: 1360–1368.
- [43] Fogarty M. P., Cannon M. E., Vadlamudi S., Gaulton K. J. (2014): Identification of a regulatory variant that binds FOXA1 and FOXA2 at the CDC123/CAMK1D type 2 diabetes GWAS locus. *PLoS Genetics* 10: e1004633.
- [44] Frye E. B., Degenhardt T. P., Thorpe S. R., Baynes J. W. (1998): Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. Advanced glycation end product – dependent increase in imidazolium cross- links in human lens proteins. *Journal of Biological Chemistry* 273: 18714–18719.
- [45] Fudge N. J., Kovacs C. S. (2004): Physiological studies in heterozygous calcium sensing receptor (CaSR) gene-ablated mice confirm that the CaSR regulates calcitonin release in vivo. *BMC Physiology* 4, Article number: 5.
- [46] Gago E. V., Suárez C. C., Perez-Fernandez R., Burgos R. R., Mugica J. D., Iglesias C. S. (2005): Association between vitamin D receptor FokI. Polymorphism and serum parathyroid hormone level in patients with chronic renal failure. *Journal of Endocrinological Investigation* 2: 117–121.
- [47] Gale E. A. (2002): A missing link in the hygiene hypothesis? *Diabetologia* 45: 588–594.

- [48] Gama L., Breitwieser G. E. (1998): A carboxyl-terminal domain controls the cooperativity for extracellular Ca²⁺ activation of the human calcium sensing receptor. A study with receptor-green fluorescent protein fusions. *Journal of Biological Chemistry* 273: 29712–29718.
- [49] Garabedian M., Holick M. F., Deluca H. F., Boyle I. T. (1972): Control of 25 hydroxycholecalciferol metabolism by parathyroid glands. *Cell Biology* 69: 1673–1676.
- [50] Garrett J. E., Capuano I. V., Hammerland L. G., Hung B. C., Brown E. M., Hebert S. C., Nemeth E. F., Fuller F. (1995): Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNAs. *Journal of Biological Chemistry* 270: 12919–12925.
- [51] Geng Y., Xiong D., Mosyak L., Malito D. L., Kniazeff J., Chen Y., Burmakina S., Quick M., Bush M., Javitch J. A., Pin J. P., Fan Q. R. (2012): Structure and functional interaction of the extracellular domain of human GABAB receptor GBR2. *Nature Neuroscience* 15: 970–978.
- [52] Gloyn A. L., Hashim Y., Ashcroft S. J., Ashfield R., Wiltshire S., Turner R. C. (2001): Association studies of variants in promoter and coding regions of beta-cell ATP-sensitive K-channel genes SUR1 and Kir6.2 with type 2 diabetes mellitus (UKPDS 53). *Diabetic Medicine* 18: 206–212.
- [53] Gloyn A. L., Weedon M. N., Owen K. R., Turner M. J., Knight B. A., Hitman G., Walker M., Levy J. C., Sampson M., Halford S., McCarthy M. I., Hattersley A. T., Frayling T. M. (2003): Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell K ATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 568–572.
- [54] Gohda T., Shou I., Fukui M., Funabiki K., Horikoshi S., Shirato S., Tomino Y. (2002): Parathyroid Hormone, Gene Polymorphism and Secondary Hyperparathyroidism in Hemodialysis Patients. *American Journal of Kidney Disease* 39: 1255–1260.
- [55] Gonen M. S., Arikoglu H., Erkoc Kaya D., Ozdemir H., Ipekci S. H., Arslan A., Kayis S. A., Gogebakan B. (2012): Effect of single nucleotide polymorphisms in KATP channel genes on type 2 diabetes in a Turkish population. *Archives of Medical Research* 43: 317–323.
- [56] Gray E., Muller D., Squires P. E., Asare-Anane H., Huang G. C., Amiel S., Persaud S. J., Jones P. M. (2006): Activation of the extracellular calcium-sensing receptor initiates insulin secretion from human islets of Langerhans: involvement of protein kinases. *Journal of Endocrinology* 190: 703-710.
- [57] Greenwald I., Gross J. (1925): The effect of the administration of a potent parathyroid extract upon the excretion of nitrogen, phosphorus, calcium and magnesium, with

- some remarks on the solubility of calcium phosphate in serum and on the pathogenesis of tetany. *Journal of Biological Chemistry* 66: 217–227.
- [58] Grill V., Ho P., Body J. J., Johanson N., Lee S. C., Kukreja S. C., Moseley J. M., Martin T. J. (1991): Parathyroid hormonerelated protein: elevated levels in both humoral hypercalcemia of malignancy and hypercalcemia complicating metastatic breast cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 73: 1309–1315.
- [59] Grzegorzewska A. E., Paciorkowski M., Mostowska A., Frycz B., Warchoń W., Stolarek I., Figlerowicz M., Jagodziński P. P. (2016): Associations of the calcium-sensing receptor gene CASR rs7652589 SNP with nephrolithiasis and secondary hyperparathyroidism in haemodialysis patients. *Scientific Reports* 6: 35188.
- [60] Gutierrez O., Isakova T., Rhee E., Shah A., Holmes J., Collerone G., Jüppner H., Wolf M. (2005): Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 16: 2205–2215.
- [61] Guttula S. V., Rao A., Sridhar G., Chakravarthy M., Nageshwararo K., Rao P. (2010): Cluster analysis and phylogenetic relationship in biomarker identification of type 2 diabetes and nephropathy. *International Journal of Diabetes in Developing Countries* 30: 52–56.
- [62] Habib Z., Camacho P. (2010): Primary hyperparathyroidism: an update. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 17: 554–560.
- [63] Hani E. H., Boutin P., Durand E., Inoue H., Permutt M. A., Velho G., Froguel P. (1998): Missense mutations in the pancreatic islet beta cell inwardly rectifying K⁺ channel gene (KIR6.2/BIR): a meta-analysis suggests a role in the polygenic basis of type II diabetes mellitus in Caucasians. *Diabetologia* 41: 1511–1515.
- [64] Harder T., Roepke K., Diller N., Stechling Y., Dudenhausen J. W., Plagemann A. (2009): Birth Weight, Early Weight Gain, and Subsequent Risk of Type 1 Diabetes: Systematic Review and Meta-Analysis. *American Journal of Epidemiology* 169: 1428–1436.
- [65] Hauache O. M. (2001): Extracellular calcium-sensing receptor: structural and functional features and association with diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34: 577–584.
- [66] Haven C. J., van Puijenbroek M., Karperien M., Fleuren G., Morreau H. (2004): Differential expression of the calcium sensing receptor and combined loss of chromosome 1q and 11q in parathyroid carcinoma. *The Journal of Pathology* 202: 86–94.

- [67] He Y. Y., Zhang R., Shao X. Y., Hu C., Wang C. R., Lu J. X., Bao Y. Q., Jia W. P., Xiang K. S. (2008): Association of KCNJ11 and ABCC8 genetic polymorphisms with response to repaglinide in Chinese diabetic patients. *Acta Pharmacologica Sinica* 29: 983–989.
- [68] Heath H., Jackson C. E., Otterud B., Leppert M. F. (1993): Genetic linkage analysis in familial benign (hypocalciuric) hypercalcemia: evidence for locus heterogeneity. *American Journal of Human Genetics* 53: 193–200.
- [69] Heath H., Lambert P. W., Service F. J., Arnaud S. B. (1979): Calcium homeostasis in diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 49: 462–466.
- [70] Hellman B., Gylfe E., Bergsten P., Grapengiesser E., Lund P. E., Berts A., Tengholm A., Pipeleers D. G., Ling Z. (1994): Glucose induces oscillatory Ca²⁺ signalling and insulin release in human pancreatic beta cells. *Diabetologia* 37: S11–S20.
- [71] Hendy G. N., D'Souza-Li L., Yang B., Canaff L., Cole D. E. (2000): Mutations of the calcium-sensing receptor (CASR) in familial hypocalciuric hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia. *Human Mutation* 16: 281–296.
- [72] Hendy G. N., Guarnieri V., Canaff L. (2009): Calcium-sensing receptor and associated diseases. *Progress in molecular biology and translational science* 89: 31–95.
- [73] Ho C., Conner D. A., Pollak M. R., Ladd D. J., Kifor O., Warren H. B., Brown E. M., Seidman J. G., Seidman C. E. (1995): A mouse model of human familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Nature Genetics* 11: 389–394.
- [74] Hofer M. A., Brown E. M. (2003): Extracellular calcium sensing and signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4: 530–538.
- [75] Holick M. F. (2004): Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 80: 1678–1688.
- [76] Holmberg H., Wahlberg J., Vaarala O., Ludvigsson J. (2007): Short duration of breast-feeding as a risk-factor for beta-cell autoantibodies in 5-year-old children from the general population. *British Journal of Nutrition* 97: 111–116.
- [77] Horwitz M. J., Stewart A. F. (2003): Humoral hypercalcemia of malignancy. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, edited by Favus MJ (5th ed.). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 246–250.

- [78] Hu J., Hauache O., Spiegel A. M. (2000): Human Ca²⁺ Receptor Cysteine-rich Domain. Analysis of function of mutant and chimeric receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 16382–16389.
- [79] Hu J., Spiegel A. M. (2003): Naturally occurring mutations of the extracellular Ca²⁺-sensing receptor: implications for its structure and function. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 14: 282–288.
- [80] Huang C., Sindic A., Hill C. E., Hujer K. M., Chan K. W., Sassen M., Wu Z., Kurachi Y., Nielsen S., Romero M. F., Miller R. T. (2007): Interaction of the Ca²⁺-sensing receptor with the inwardly rectifying potassium channels Kir4.1 and Kir4.2 results in inhibition of channel function. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 292: F1073–F1081.
- [81] Huang Y., Breitwieser G. E. (2007): Rescue of calcium-sensing receptor mutants by allosteric modulators reveals a conformational checkpoint in receptor biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 282: 9517–9525.
- [82] Hyppönen E., Kenward M. G., Virtanen S. M., Piitulainen A., Virta-Autio P., Tuomilehto J., Knip M., Akerblom H. K. (1999): Infant feeding, early weight gain, and risk of type 1 diabetes. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetes Care* 22: 1961–1965.
- [83] Chang T. J., Lei H. H., Yeh J. I., Chiu K. C., Lee K. Ch., Chen M. Ch., Tai T. Y, Chuang L. M. (2000): Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population. *Clinical Endocrinology* 52: 575 – 580
- [84] Chakravarti B., Chattopadhyay N., Brown E. M. (2012): Signaling through the extracellular calcium-sensing receptor (CaSR). *Advances in Experimental Medicine and Biology* 740: 103–142.
- [85] Chattopadhyay N. (2006): Effects of calcium-sensing receptor on the secretion of parathyroid hormone-related peptide and its impact on humoral hypercalcemia of malignancy. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 290: 761–770.
- [86] Chavali S., Mahajan A., Tabassum R., Dwivedi O. P., Chauhan G., Ghosh S., Tandon N., Bharadwaj D. (2011): Association of variants in genes involved in pancreatic B-cell development and function with type 2 diabetes in North Indians. *Journal of Human Genetics* 56: 695–700.
- [87] Chikatsu N., Fukumoto S., Takeuchi Y., Suzawa M., Obara T., Matsumoto T., Fujita T. (2000): Cloning and characterization of two promoters for the human calcium-sensing receptor (CaSR) and changes of CaSR expression in parathyroid adenomas. *Journal of Biological Chemistry* 275: 7553–7557.

- [88] Informační systém Zemřelí, ČSÚ.
- [89] Israni N., Goswami R., Kumar A., Rani R. (2009): Interaction of Vitamin D Receptor with HLA DRB1 0301 in Type 1 Diabetes Patients from North India. *PLoS ONE* 4: 8023.
- [90] Isakova T., Wahl P., Vargas G. S., Gutiérrez O. M., Scialla J., Xie H., Appleby D., Nessel L., Bellovich K., Chen J., Hamm L., Gadegbeku C., Horwitz E., Townsend R. R., Anderson C. A., Lash J. P., Hsu C. Y., Leonard M. B., Wolf M. (2011): Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney International* 79: 1370–1378.
- [91] Ishii H., Koya D., King G. L. (1998): Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *Journal of Molecular Medicine* 76: 21–31.
- [92] Janicic E., Soliman Z., Pausova M. F., Seldin M., Rivière J., Szpirer C., Szpirer G., Hendy N. (1995): Mapping of the calcium-sensing receptor gene (CASR) to human Chromosome 3q13.3-21 by fluorescence in situ hybridization, and localization to rat Chromosome 11 and mouse Chromosome 16. *Mammalian Genome* 6: 798–801.
- [93] Johansson C., Samuelsson U., Ludvigsson J. (1994): A high weight gain early in life is associated with an increased risk of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 37: 91–94.
- [94] Jurutka P. W., Whitfield G. K., Hsieh J. C., Thompson P. D., Haussler C. A., Haussler M. R. (2001): Molecular nature of the vitamin D receptor and its role in regulation of gene expression. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2: 203–216.
- [95] Kahn R., Buse J., Ferrannini E., Stern M. (2005): Metabolic syndrome: time for a critical appraisal. Joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia* 48: 1684–1699.
- [96] Kantham L., Quinn S. J., Egbuna O. I., Baxi K., Butters R., Pang J. L., Pollak M. R., Goltzman D., Brown E. M. (2009): The calcium-sensing receptor (CaSR) defends against hypercalcemia independently of its regulation of parathyroid hormone secretion. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 297: E915–E923.
- [97] Kanzawa M., Sugimoto T., Kobayashi A., Chihara K. (1999): Parathyroid hormone gene polymorphisms in primary hyperparathyroidism. *Clinical Endocrinology* 50: 583 - 588.
- [98] Kaprio J., Tuomilehto J., Koskenvuo M., Romanov K., Reunanen A., Eriksson J., Stengård J., Kesäniemi Y. A. (1992): Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia* 35: 1060–1067.

- [99] Khazai N. B, Beck G. R., Guillermo E. U. (2009): Diabetes and Fractures — An overshadowed association. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 16: 435–445.
- [100] Kiefer L., Beaumard F., Gorojankina T., Faure H., Ruat M., Dodd R. H. (2015): Design and synthesis of calindol derivatives as potent and selective calcium sensing receptor agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 24: 554–569.
- [101] Kiefer L., Leiris S., Dodd R. H. (2011): Novel calcium sensing receptor ligands: A patent survey. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 21: 681–698.
- [102] Kifor O., Moore F. D., Delaney M., Garber J, Hendy G. N., Butters R. (2003): A syndrome of hypocalciuric hypercalcemia caused by auto-antibodies directed at the calcium-sensing receptor. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88: 60–72.
- [103] Klee C. B., Means A. R. (2002): Keeping up with calcium: conference on calcium-binding proteins and calcium function in health and disease. *EMBO Rep* 3: 823–827.
- [104] Kong A., Steinhorsdottir V., Masson G. et al. (2009). Parental origin of sequence variants associated with complex diseases. *Nature* 462: 868–874.
- [105] Koo B. K., Cho Y. M., Park B. L., Cheong H. S., Shin H. D., Jang H. C., Kim S. Y., Lee H. K., Park K. S. (2007): Polymorphisms of KCNJ11 (Kir6.2 gene) are associated with type 2 diabetes and hypertension in the Korean population. *Diabetic Medicine* 24: 178–186.
- [106] Kovesdy C. P., Quarles L. D. (2013): Fibroblast growth factor-23: what we know, what we don't know, and what we need to know. *Nephrology Dialysis Transplantation* 18: 2228–2236.
- [107] Kumata C., Mizobuchi M., Ogata H., Koiwa F., Nakazawa A., Kondo F., et al. (2010): Involvement of the alpha-klotho and fibroblast growth factor receptor in the development of secondary hyperparathyroidism. *American Journal of Nephrology* 31: 230–238.
- [108] Kunishima N., Shimada Y., Tsuji Y., Sato T., Yamamoto M., Kumasaka T., Nakanishi S., Jingami H., Morikawa K. (2000): Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407: 971–977.
- [109] Lang V. Y., Fatehi M., Light P. E. (2012): Pharmacogenomic analysis of ATP-sensitive potassium channels coexpressing the common type 2 diabetes risk variants E23K and S1369A. *Pharmacogenetics and Genomics* 22: 206–214.
- [110] Larsson H. E., Vehik K., Haller M. J., Liu X., Akolkar B., Hagopian W., Krischer J., Lernmark A., She J. X., Simell O., Toppari J., Ziegler A. G., Rewers M. (2016): the TEDDY study. Growth and risk for islet autoimmunity and progression to type 1 diabetes in early

- childhood: The Environmental Determinants of Diabetes in the Young Study. *Diabetes* 65: 1988-1995.
- [111] Li H., Zhang J., Long J., Shi J., Luo Y. (2018): Calcium-sensing receptor gene polymorphism (rs7652589) is associated with calcium nephrolithiasis in the population of Yi nationality in Southwestern China. *Annals of Human Genetics* 82: 265–271.
- [112] Liu Z., Zhang Y. W., Feng Q. P., Li Y. F., Wu G. D., Zuo J., Xiao X. H., Fang F. D. (2006): Association analysis of 30 type 2 diabetes candidate genes in Chinese Han population. *Acta Academiae Medicinae Sinicae* 28: 124–128.
- [113] Lloyd S. E., Pannett A. A., Dixon P. H., Whyte M. P., Thakker R. V. (1999): Localization of familial benign hypercalcemia, Oklahoma variant (FBHOk) to chromosome 19q13. *American Journal of Human Genetics* 64: 189–195.
- [114] Love-Gregory L., Wasson J., Lin J., Skolnick G., Suarez B., Permutt M. A. (2003): E23K single nucleotide polymorphism in the islet ATPsensitive potassium channel gene (Kir6.2) contributes as much to the risk of type II diabetes in Caucasians as the PPAR γ Pro12Ala variant. *Diabetologia* 46: 136–137.
- [115] Ma J. N., Owens M., Gustafsson M., Jensen J., Tabatabaei A., Schmelzer K., Olsson R., Burstein E. S. (2011): Characterization of highly efficacious allosteric agonists of the human calcium-sensing receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 337: 275–284.
- [116] Madani H. A., Fawzy N., Afif A., Abdelghaffar S., Gohar N. (2016): Study of KCNJ11 gene mutations in association with monogenic diabetes of infancy and response to sulfonylurea treatment in a cohort study in Egypt. *Acta Endocrinologica-Bucharest* 12: 157–160.
- [117] Magnus M. C., Olsen S. F., Granström C., Joner G., Skriverhaug T., Svensson J., Johannesen J., Njølstad P., Magnus P., Størdal K., Stene L. C. (2015): Infant growth and risk of childhood-onset type 1 diabetes in children from 2 Scandinavian birth cohorts. *JAMA Pediatr* 169: e153759.
- [118] Mannstadt M., Bilezikian J. P., Thakker R. V., Hannan F. M., Clarke B. L., Rejnmark L., Mitchell D. M., Vokes T. J., Winer K. K., Shoback D. M. (2017): Hypoparathyroidism. *Nature Reviews Disease* 3: Article number 17055.
- [119] Marx S., Attie M., Spiegel A., Levine M., Lasker R., Fox M. (1982): An association between neonatal severe primary hyperparathyroidism and familial hypocalciuric hypercalcemia in three kindreds. *Journal of Biological Chemistry* 306: 257–284.

- [120] Marx S. J., Attie M. F., Levine M. A., Spiegel A. M., Downs R. W., Lasker R. D. (1981): The hypocalciuric or benign variant of familial hypercalcemia: clinical and biochemical features in fifteen kindreds. *Medicine* 60: 397–412.
- [121] Maslowski K. M., Mackay C. R. (2011): Diet, gut microbiota and immune responses. *Nature Immunology* 12: 5–9.
- [122] Miedlich S., Lamesch P., Mueller A., Paschke R. (2001): Frequency of the calcium-sensing receptor variant A986S in patients with primary hyperparathyroidism. *European Journal of Endocrinology* 145: 421–427.
- [123] Miedlich S. U., Gama L., Seuwen K., Wolf R. M., Breitwieser G. E. (2004): Homology modeling of the transmembrane domain of the human calcium sensing receptor and localization of an allosteric binding site. *Journal of Biological Chemistry* 279: 7254–7263.
- [124] Miller S. A., Dykes D. D., Polesky H. F. (1988): A simple salting out procedure extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16: 1215–1215.
- [125] Moltchanova E., Rytönen M., Kousa A., Taskinen O., Tuomilehto J., Karvonen M. (2004): Zinc and nitrate in the ground water and the incidence of Type 1 diabetes in Finland. *Diabetic Medicine* 21: 256–261.
- [126] Muddana V., Lamb J., Greer J. B., Elinoff B., Hawes R. H., Cotton P. B., Anderson M. A., Brand R. E., Slivka A., Whitcomb D. C. (2008): Association between calcium sensing receptor gene polymorphisms and chronic pancreatitis in a US population: role of serine protease inhibitor Kazal 1 type and alcohol. *World Journal of Gastroenterology* 14: 4486–4491.
- [127] Muntoni S., Cocco P., Muntoni S., Aru G. (2006): Nitrate in community water supplies and risk of childhood type 1 diabetes in Sardinia, Italy. *European Journal of Epidemiology* 21: 245–247.
- [128] Murugaian E. E., Premkumar R. M. R., Radhakrishnan L., Vallath B. (2008): Novel mutations in the calcium sensing receptor gene in tropical chronic pancreatitis in India. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 43: 117–121.
- [129] Muto T., Tsuchiya D., Morikawa K., Jingami H. (2007): Structures of the extracellular regions of the group II/III metabotropic glutamate receptors. *PNAS* 104: 3759–3764.
- [130] Nemeth E. F. (1990): Regulation of cytosolic calcium by extracellular divalent cations in c-cells and parathyroid cells. *Cell Calcium* 11: 323–327.
- [131] Nemeth E. F. (2002): The search for calcium receptor antagonists (calcilytics). *Journal of Molecular Endocrinology* 29: 15–21.

- [132] Nemeth E. F., Goodman W. G. (2016): Calcimimetic and calcilytic drugs: Feats, flops, and futures. *Calcified Tissue International* 98: 341–358.
- [133] Nemeth E. F., Steffey M. E., Hammerland L. G., Hung B. C., vanWagenen B. C., DelMar E. G., Balandrin M. F. (1998): Calcimimetics with potent and selective activity on the parathyroid calcium receptor. *PNAS* 95: 4040–4045.
- [134] Nesbit M. A., Hannan F. M., Graham U., Whyte M. P., Morrison P. J., Hunter S. J., Thakker R. V. (2010): Identification of a second kindred with familial hypocalciuric hypercalcemia type 3 (FHH3) narrows localization to a b3.5 megabase pair region on chromosome 19q13.3. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95: 1947–1954.
- [135] Nessar A. (2005): Advanced glycation endproducts- role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practise* 67: 3–21.
- [136] Nielsen E. M., Hansen L., Carstensen B., Echwald S. M., Drivsholm T., Glümer C., Thorsteinsson B., Borch-Johnsen K., Hansen T., Pedersen O. (2003): The E23K variant of Kir6.2 associates with impaired post-OGTT serum insulin response and increased risk of type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 573–577.
- [137] Noble J. A., Valdes A. M., Cook M., Klitz W., Thomson G., Erlich H. A. (1996): The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: Molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. *American Journal of Human Genetics* 59: 1134–1148.
- [138] Obšil T., Pavlíček Z. (1997): Glykace proteinů a fosfolipidů: Maillardova reakce in vivo. *Chemické Listy* 91, 558–569.
- [139] Oh J. Y., Barrett-Connor E. (2002): Association between vitamin D receptor polymorphism and type 2 diabetes or metabolic syndrome in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study. *Metabolism* 51: 356–359.
- [140] Ohkubo E., Aida K., Chen J., Hayashi J. I., Isobe K., Tawata M., Onaya T. (2000): A patient with type 2 diabetes mellitus associated with mutations in calcium sensing receptor gene and mitochondrial DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 278: 808–813.
- [141] Okamoto K., Iwasaki N., Doi K., Noiri E., Iwamoto Y., Uchigata Y., Fujita T., Tokunaga K. (2012): Inhibition of glucose-stimulated insulin secretion by KCNJ15, a newly identified susceptibility gene for type 2 diabetes. *Diabetes* 61: 1734–1741.
- [142] Pani M. A., Knapp M., Donner H., Braun J., Baur M. P., Usade H.K., Badenhop K. (2000): Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. *Diabetes* 49: 504 - 507.

- [143] Pearce S., Steinmann B. (1999): Casting new light on the clinical spectrum of neonatal severe hyperparathyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 50: 691–693.
- [144] Pearce S. H., Brown E. M. (1996): Disorders of calcium ion sensing. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81: 2030–2035.
- [145] Pearce S. H. S., Wooding C., Davies M., Tollefsen S. E., Whyte M. P., Thakker R. V. (1996): Calcium sensing receptor mutations in familial hypocalciuric hypercalcemia with recurrent pancreatitis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 45: 675–680.
- [146] Pidasheva S., Grant M., Canaff L., Ercan O., Kumar U., Hendy G. N. (2006): Calcium-sensing receptor dimerizes in the endoplasmic reticulum: biochemical and biophysical characterization of CASR mutants retained intracellularly. *Human Molecular Genetics* 15: 2200–2209.
- [147] Pondel M. (2000): Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *International Journal of Experimental Pathology* 81: 405–422.
- [148] Ponsonby A. L., Pezis A., Ellis J., Morley R., Cameron F., Carlin J., Dwyer T. (2008): Variation in association between allelic variation of the vitamin D receptor gene and onset of type 1 diabetes mellitus by ambient winter ultraviolet radiation levels: a meta-regression analysis. *American Journal of epidemiology* 168: 358–365
- [149] Potts J. T., Gardella T. J. (2007): Progress, paradox, and potential: parathyroid hormone research over five decades. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1117: 196–208.
- [150] Quinn S. J., Ye C. P., Diaz R., Kifor O., Bai M., Vassilev P., Brown E. (1997): The Ca²⁺-sensing receptor: A target for polyamines. *American Journal of Physiology* 273: C1315–C1323.
- [151] Racz G. Z., Kittel A., Riccardi D., Case R. M., Elliott A. C., Varga G. (2002): Extracellular calcium sensing receptor in human pancreatic cells. *Gut* 51: 705–711.
- [152] Ray K., Clapp P., Goldsmith P. K., Spiegel A. M. (1998): Identification of the sites of N-linked glycosylation on the human calcium receptor and assessment of their role in cell surface expression and signal transduction. *Journal of Biological Chemistry* 273: 34558–34567.
- [153] Razzaque M. S. (2009): The FGF23-Klotho axis: endocrine regulation of phosphate homeostasis. *Nature Reviews Endocrinology* 5: 611–619.

- [154] Reis J. P., Selvin E., Pankow J. S., Michos E. D., Rebholz C. M., Lutsey P. L. (2016): Parathyroid hormone is associated with incident diabetes in white, but not black adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Diabetes & Metabolism* 42: 162–169.
- [155] Riobello C., Gómez J., Gil-Peña H., Tranche S., Reguero J. R., de la Hera J. M., Delgado E., Calvo D., Morís C., Santos F., Coto-Segura P., Iglesias S., Alonso B., Alvarez V., Coto E. (2016): KCNQ1 gene variants in the risk for type 2 diabetes and impaired renal function in the Spanish Renastur cohort. *Molecular and Cellular Endocrinology* 427: 86–91.
- [156] Risch S. S. (1990): Mapping genes in diabetes. *Diabetes* 39: 1315–1319.
- [157] Rodriguez L., Tu C., Cheng Z., Chen T. H., Bikle D., Shoback D., Chang W. (2005): Expression and functional assessment of an alternatively spliced extracellular Ca²⁺-sensing receptor in growth plate chondrocytes. *Endocrinology* 146: 5294–5303.
- [158] Rosolowsky E. T., Skupien J., Smiles A. M., Niewczas M., Roshan B., Stanton R., Eckfeldt J. H., Warram J. H., and Krolewski A. S. (2011): Risk for ESRD in type 1 diabetes remains high despite renoprotection. *Journal of the American Society of Nephrology* 22: 545–553.
- [159] Rothe H., Shapiro W. B., Sun W. Y., Matalon A. (2008): Calcium-sensing receptor gene polymorphism Arg⁹⁹⁰Gly influences the response to calcimimetic agents in end-stage kidney disease patients with secondary hyperparathyroidism. *Future Medicine* 5: 109–116.
- [160] Sakamoto Y., Inoue H., Keshavarz P., Miyawaki K., Yamaguchi Y., Moritani M., Kunika K., Nakamura N., Yoshikawa T., Yasui N., Shiota H., Tanahashi T., Itakura M. (2007): SNPs in the KCNJ11-ABCC8 gene locus are associated with type 2 diabetes and blood pressure levels in the Japanese population. *Journal of Human Genetics* 52: 781–793.
- [161] Sanders J. L., Chattopadhyay N., Kifor O., Yamaguchi T., Brown E. M. (2001): Ca²⁺-sensing receptor expression and PTHrP secretion in PC-3 human prostate cancer cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 281: 1267–1274.
- [162] Sanders J. L., Chattopadhyay N., Kifor O., Yamaguchi T., Butters R. R., Brown E. M. (2000): Extracellular calcium-sensing receptor expression and its potential role in regulating parathyroid hormone-related peptide secretion in human breast cancer cell lines. *Endocrinology* 141: 4357–4364.
- [163] Scillitani A., Guarnieri V., Battista C., De Geronimo S., Muscarella L. A., Chiodini I., Cignarelli M., Minisola S., Bertoldo F., Francucci C. M., Malavolta N., Piovesan A., Mascia M. L., Muscarella S., Hendy G. N., D'Agruma L., Cole D. E. (2007): Primary hyperparathyroidism and the presence of kidney stones are associated with different

- haplotypes of the calcium-sensing receptor. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92: 277–283.
- [164] Scillitani A., Guarneri V., De Geronimo S., Muscarella L. A., Battista C., D'Agruma L., Bertoldo F., Florio C., Minisola S., Hendy G. N., Cole D. E. (2004): Blood ionized calcium is associated with clustered polymorphisms in the carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89: 5634–5638.
- [165] Sepulveda T. V. A., Falzon M. (2002): Parathyroid hormone-related protein enhances PC-3 prostate cancer cell growth via both autocrine/paracrine and intracrine pathways. *Regulatory Peptides* 105: 109–120.
- [166] Sepulveda T. V. A., Shen X., Falzon M. (2002): Intracrine PTHrP protects against serum starvation-induced apoptosis and regulates the cell cycle in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 143: 596–606.
- [167] Shaat N., Ekelund M., Lernmark Å., Ivarsson S., Almgren P., Berntorp K., Groop L. (2005): Association of the E23K polymorphism in the KCNJ11 gene with gestational diabetes mellitus. *Diabetologia* 48: 2544–2551.
- [168] Sharretts J., Simonds W. F. (2010): Clinical and molecular genetics of parathyroid neoplasms. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 24: 491–502.
- [169] Shimada T., Hasegawa H., Yamazaki Y., Muto T., Hino R., Takeuchi Y., Fujita T., Nakahara K., Fukumoto S., Yamashita T. (2004): FGF-23 Is a Potent Regulator of Vitamin D Metabolism and Phosphate Homeostasis. *Journal of Bone and Mineral Research* 19: 429–435.
- [170] Shimada T., Mizutani S., Muto T., Yoneya T., Hino R., Takeda S., Takeuchi Y., Fujita T., Fukumoto S., Yamashita T. (2001): Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *PNAS* 98: 65005.
- [171] Sjøberg K., Jahnsen T., Rognes T., Skålhegg B. S., Laerdahl J. K. (2013): Evolutionary paths of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) catalytic subunits. *PLoS One* 8: e60935.
- [172] Stuckey B. G. A., Kent G. N., Gutteridge D. H., Reed W. D. (1990): Familial hypocalciuric hypercalcaemia and pancreatitis: no causal link proven. *Australian and New Zealand Journal of Medicine* 20: 718–719.
- [173] Šeda O. (2005): Genetika diabetu. In: Perušičová J. (ed): *Diabetologie 2005*. 1. vydání, Triton s.r.o., Praha, 91–95.

- [174] Škrabič V., Zemunik T., Šitum M., Terzič J. (2003): Vitamin D receptor polymorphism and susceptibility to type 1 diabetes in the Dalmatian population. *Diabetes Research and Clinical Practice* 59: 31–35.
- [175] Taverna M. J., Selam J. L., Slama G. (2005): Association between a protein polymorphism in the start codon of the vitamin D receptor gene and severe diabetic retinopathy in C-peptide-negative type 1 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90: 4803–4808.
- [176] Taylor J. G., Bushinsky D. A. (2009): Calcium and phosphorus homeostasis. *Blood Purification* 227: 387–394.
- [177] Thakker R. V. (2004): Diseases associated with the extracellular calcium-sensing receptor. *Cell Calcium* 35: 275–282.
- [178] Tillil H., Köbberling J. (1987): Age-corrected empirical genetic risk estimates for first-degree relatives of IDDM patients. *Diabetes* 36: 93–99.
- [179] Todd J. A., Walker N. M., Cooper J. D., Smyth D. J., Downes K., Plagnol V., Clayton D. G. (2007): Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nature Genetics* 39: 857–864.
- [180] Tracy S., Drescher K. M., Chapman N. M. (2011): Enteroviruses and type 1 diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 27: 820–823.
- [181] Unoki H., Takahashi A., Kawaguchi T., Hara K., Horikoshi M., Andersen G., Ng D. P., Holmkvist J., Borch-Johnsen K., Jørgensen T., Sandbaek A., Lauritzen T., Hansen T., Nurbaya S., Tsunoda T., Kubo M., Babazono T., Hirose H., Hayashi M., Iwamoto Y., Kashiwagi A., Kaku K., Kawamori R., Tai E. S., Pedersen O., Kamatani N., Kadowaki T., Kikkawa R., Nakamura Y., Maeda S. (2008): SNPs in *KCNQ1* are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations. *Nature Genetics* 40: 1098–1102.
- [182] UZIS ČR, Aktuální informace č. 2/2015.
- [183] Van Dam R. M., Hoebee B., Seidell J. C., Schaap M. M., de Bruin T. W., Feskens E. J. (2005): Common variants in the ATP-sensitive K⁺ channel genes *KCNJ11* (Kir6.2) and *ABCC8* (*SUR1*) in relation to glucose intolerance: population-based studies and meta-analyses. *Diabetic Medicine* 22: 590–598.
- [184] van Vliet-Ostaptchouk J. V., van Haeften T. W., Landman G. W., Reiling E., Kleefstra N., Bilo H. J., Klungel O. H., de Boer A., van Diemen C. C., Wijmenga C., Boezen H. M., Dekker J. M., van 't Riet E., Nijpels G., Welschen L. M., Zavelova H., Bruin E. J., Elbers C. C., Bauer F., Onland-Moret N. C., van der Schouw Y. T., Grobbee D. E., Spijkerman A. M., van der A DL, Simonis-Bik A. M., Eekhoff E. M., Diamant M., Kramer M. H., Boomsma

- D. I., de Geus E. J., Willemsen G., Slagboom P. E., Hofker M. H., 't Hart L. M. (2012): Common Variants in the Type 2 Diabetes KCNQ1 Gene Are Associated with Impairments in Insulin Secretion During Hyperglycaemic Glucose Clamp. *PLoS One* 7: e32148.
- [185] Vedralova M., Kotrbova-Kozak A., Zeleznikova V., Zoubkova H., Rychlik I., Cerna M. (2012): Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and parathyroid hormone gene in the development and progression of diabetes mellitus and its chronic complications, diabetic nephropathy and non-diabetic renal disease. *Kidney Blood Pressure Research* 36: 1–9.
- [186] Verge C. F., Gianani R., Kawasaki E., Yu L., Pietropaolo M., Jackson R. A., Chase H. P., Eisenbarth G. S. (1996): Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 45: 926–933.
- [187] Vezzoli G., Scillitani G., Corbetta S., Terranegra A., Dogliotti E., Guarnieri V., Arcidiacono T., Paloschi V., Rainone F., Eller-Vainicher C., Borghi L., Nouvenne A., Guerra A., Meschi T., Allegri F., Cusi D., Spada A., Cole D. E., Hendy G. N., Spotti D., Soldati L. (2011): Polymorphisms at the regulatory regions of the CASR gene influence stone risk in primary hyperparathyroidism. *European Journal of Endocrinology* 164: 421–427.
- [188] Vezzoli G., Tanini A., Ferrucci L., Soldati L., Bianchin C., Franceschelli F., Malentacchi C., Porfirio B., Adamo D., Terranegra A., Falchetti A., Cusi D., Bianchi G., Brandi M. L. (2002): Influence of calcium-sensing receptor gene on urinary calcium excretion in stone-forming patients. *Journal of the American Society of Nephrology* 13: 2517–2523.
- [189] Vezzoli G., Terranegra A., Arcidiacono T., Biasion R., Coviello D., Syren M. L., Paloschi V., Giannini S., Mignogna G., Rubinacci A., Ferraretto A., Cusi D., Bianchi G., Soldati L. (2007): R990G polymorphism of calcium-sensing receptor does produce a gain-of-function and predispose to primary hypercalciuria. *Kidney International* 71: 1155–1162.
- [190] Vezzoli G., Terranegra A., Arcidiacono T., Gambaro G., Milanese L., Mosca E., Soldati L., GENIAL network (Genetics and Environment in Nephrolithiasis Italian Alliance) (2010): Calcium kidney stones are associated with a haplotype of the calcium-sensing receptor gene regulatory region. *Nephrology Dialysis Transplantation* 25: 2245–2252.
- [191] Wang L., Nancollas G. H., Henneman Z. J., Klein E., Weiner S. (2006): Nanosized particles in bone and dissolution insensitivity of bone mineral. *Biointerphases* 1: 106–111.
- [192] Wang Y., Pontesilli O., Gill R. G., La Rosa F. G., Lafferty K. J. (1991): The role of CD4+ and CD8+ T cells in the destruction of islet grafts by spontaneously diabetic mice. *PNAS* 88: 527–531.

- [193] Ward D. T. (2004): Calcium receptor-mediated intracellular signalling. *Cell Calcium* 35: 217–228.
- [194] Ward D. T., Yau S. K., Mee A. P., Mawer E. B., Miller C. A., Garland H. O., Riccardi D. (2001): Functional, molecular, and biochemical characterization of streptozotocin induced diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology* 12: 779–790.
- [195] Weets I., Kaufman L., Van der Auwera B. (2004): Seasonality in clinical onset of type 1 diabetes in Belgian patients above the age of 10 is restricted to HLA-DQ2/DQ8-negative males, which explains the male to female excess in incidence. *Diabetologia* 47: 614–621.
- [196] Wen L., Ley R. E., Volchkov P. Y. (2008): Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* 455: 1109–1113.
- [197] Weston A. H., Absi M., Harn E., Geraghty A. R., Ward D. T., Ruat M., Dodd R. H., Dauban P., Edwards G. (2008): The expression and function of Ca²⁺-sensing receptors in rat mesenteric artery; comparative studies using a model of type II diabetes. *British Journal of Pharmacology* 154: 652–662.
- [198] Whitcomb D. C. (2010): Genetic aspects of pancreatitis. *Annual Review of Medicine* 61: 413–424.
- [199] White E., McKenna J., Cavanaugh A., Breitwieser G. E. (2009): Pharmacochaperone-mediated rescue of calcium-sensing receptor loss-of-function mutants. *Molecular Endocrinology* 23: 1115–1123.
- [200] White E. K., Evans W. E., Jeffery L. H., O’Riordan J. L. H., Speer M. C., Econs M. J., Lorenz-Depiereux B., Grabowski M., Meitinger T., Strom T. M. (2000): Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nature Genetics* 26: 345–348.
- [201] Wilkin T. J. (2001): The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between type I and type II diabetes. *Diabetologia* 44: 914–922.
- [202] Williamson J. R., Chang K., Frangos M., Hasan K. S., Ido Y., Kawamura T., Nyengaard J. R., van den Enden M., Kilo C., Tilton R. G. (1993): Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 42: 801–813.
- [203] Wolf M. (2012): Update of fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease. *Kidney International* 82: 737–747.
- [204] Yamauchi M., Sugimoto T., Yamaguchi T., Yano S., Kanzawa M., Kobayashi A., Chihara K. (2001): Association of polymorphic alleles of the calcium-sensing receptor gene with

- the clinical severity of primary hyperparathyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 55: 373–379.
- [205] Yáñez M., Gil-Longo G., Campos-Toimil M. (2012): Calcium Signaling 461–482.
- [206] Yang Y., Zhang X., Bao M., Liu L., Xian Y., Wu J., Li P. (2016): Effect of serum 25-hydroxyvitamin D3 on insulin resistance and β -cell function in newly diagnosed type 2 diabetes patients. *Journal of Diabetes Investigation* 7: 226–232.
- [207] Yano S., Sugimoto T., Kanzawa M., Tsukamoto T., Hattori T., Hattori S., Chihara K. (2000): Association of polymorphic alleles of the calcium-sensing receptor gene with parathyroid hormone secretion in hemodialysis patients. *Nephron* 85: 317–323.
- [208] Yano S., Sugimoto T., Tsukamoto T., Chihara K., Kobayashi A., Kitazawa S., Maeda S., Kitazawa R. (2003): Decrease in vitamin D receptor and calcium-sensing receptor in highly proliferative parathyroid adenomas. *European Journal of Endocrinology* 148: 403–411.
- [209] Yasuda K., Miyake K., Horikawa Y., Hara K., Osawa H., Furuta H., Hirota Y., Mori H., Jonsson A., Sato Y., Yamagata K., Hinokio Y., Wang H. Y., Tanahashi T., Nakamura N., Oka Y., Iwasaki N., Iwamoto Y., Yamada Y., Seino Y., Maegawa H., Kashiwagi A., Takeda J., Maeda E., Shin H. D., Cho Y. M., Park K. S., Lee H. K., Ng M. C., Ma R. C., So W. Y., Chan J. C., Lysenko V., Tuomi T., Nilsson P., Groop L., Kamatani N., Sekine A., Nakamura Y., Yamamoto K., Yoshida T., Tokunaga K., Itakura M., Makino H., Nanjo K., Kadowaki T., Kasuga M. (2008): Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nature Genetics* 40: 1092–1097.
- [210] Zeleznikova V., Vedralova M., Kotrbova-Kozak A., Zoubkova H., Cerna M., Rychlik I. (2014): The intron 4 polymorphism in the calcium-sensing receptor gene in diabetes mellitus and its chronic complications, diabetic nephropathy and non-diabetic renal disease. *Kidney Blood Pressure Research* 39: 399–407.
- [211] Zhang C., Miller C. L., Brown E. M., Yang J. J. (2015): The calcium sensing receptor: From calcium sensing to signaling. *Science China Life Sciences* 58: 14–27.
- [212] Zhang C., Miller C. L., Gorkhali R., Zou J., Huang K., Brown E. M., Yang J. J. (2016): Molecular Basis of the Extracellular Ligands Mediated Signaling by the Calcium Sensing Receptor. *Frontiers in Physiology* 7: 441.
- [213] Zhang Z., Sun S., Quinn S. J., Brown E. M., Bai M. (2001): The extracellular calcium-sensing receptor dimerizes through types of intermolecular interactions. *Journal of Biological Chemistry* 276: 5316–5322.

- [214] Zhao H. X., Mold M. D., Stenhouse E. A., Bird S. C., Wright D. E., Demaine A. G., Millward B. A. (2001): Drinking water composition and childhood-onset Type 1 diabetes mellitus in Devon and Cornwall, England. *Diabetic Medicine* 18: 709–717.
- [215] Zheng Y, Ley S. H., Hu F. B. (2018): Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews Endocrinology* 14: 88–98.
- [216] Ziegler A. G, Schmid S., Huber D., Hummel M., Bonifacio E. (2003): Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *JAMA* 290: 1721–1728.
- [217] Ziyadeh F. N., Sharma K., Ericksen M., Wolf G. (1994): Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth faktor-beta. *Journal of Clinical Investigation* 9: 536–542.

8. Přílohy

1. Vedralova M., Kotrbova-Kozak A., Zeleznikova V., Zoubkova H., Rychlik I., Cerna M. (2012): Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and parathyroid hormone gene in the development and progression of diabetes mellitus and its chronic complications, diabetic nephropathy and non-diabetic renal disease. *Kidney Blood Pressure Research* 36: 1–9.

2. Zeleznikova V., Vedralova M., Kotrbova-Kozak A., Zoubkova H., Cerna M., Rychlik I. (2014): The intron 4 polymorphism in the calcium-sensing receptor gene in diabetes mellitus and its chronic complications, diabetic nephropathy and non-diabetic renal disease. *Kidney Blood Pressure Research* 39: 399–407.