

**Univerzita Karlova v Praze**

**3. lékařská fakulta**

**Disertační práce**

**MUDr. Jana Urbanová**

**Univerzita Karlova v Praze**

**3. lékařská fakulta**

## Disertační práce

VÝSKYT SPECIFICKÝCH OSTRŮVKOVÝCH AUTOPROTILÁTEK U PACIENTŮ S *HNF1A*-MODY A  
*HNF4A*-MODY

*Výskyt specifických ostrůvkových autoantilátok je asociovan s pozdější manifestací diabetu a horší glykemickou kompenzací*

THE INCIDENCE OF SPECIFIC ISLET CELL AUTOANTIBODIES IN PATIENTS WITH *HNF1A*-MODY  
AND *HNF4A*-MODY

*The incidence of specific islet cell autoantibodies is associated with later diabetes onset and worse glycaemic control*

Školitel: Prof. MUDr. Michal Anděl, CSc

**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, 23.02.2017

JANA URBANOVÁ

Podpis

**Identifikační záznam:**

URBNOVÁ, Jana. *Výskyt specifických ostrůvkových autoantilátok u pacientů s HNF1A-MODY a HNF4A-MODY. [Incidence of specific islet cell autoantibodies in patients with HNF1A-MODY and HNF4A-MODY.]*. Praha, 2017. 107 stran, 4 přílohy. Klasická závěrečná práce. Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta, II. Interní klinika FNKV; 2017. Prof. MUDr. Michal Anděl, CSc.

**Klíčová slova:** HNF-1 $\alpha$ , HNF-4 $\alpha$ , MODY, GADA, IA2A,  $\beta$ -buňky, apoptóza

**Key words:** HNF-1 $\alpha$ , HNF-4 $\alpha$ , MODY, GADA, IA2A,  $\beta$ -cells, apoptosis

Ráda bych touto cestou vyjádřila upřímné poděkování panu profesorovi Michalu Andělovi za vysoce odborné, trpělivé a entuziastické vedení mého postgraduálního studia. Rovněž bych chtěla poděkovat panu doktoru Petru Henebergovi a doktorce Blance Rypáčkové za kvalifikované vedení a vstřícnou pomoc se zpracováním veškerých vědeckých publikací a získání potřebných dovedností pro vědeckou práci. Všem pak také za pomoc se zpracováním závěrečné disertační práce. Také vděčím velké poděkování doktorce Zdeňce Procházkové za přátelské uvedení a orientaci v problematice monogenního diabetu.

## ABSTRAKT

Ostrůvkové autoantilátky jsou asociovány s autoimunitní inzultidou a patří k základním diagnostickým kritériím diabetes mellitus 1. typu. Nicméně, narůstá důkazů o jejich přítomnosti i u jiných typů diabetes mellitus. V této práci se zaměřujeme na incidenci ostrůvkových autoantilátek u českých pacientů s MODY (Maturity-onset Diabetes of the Young) a analyzujeme jejich funkční relevanci ve smyslu vzniku diabetu a glykemické kompenzace.

Autoantilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové 65 (GADA) a proteinu tyrozin fosfatázy 2 (IA-2A) byly měřeny v kohortě 28 českých MODY pacientů (s geneticky prokázanou diagnózou). Vybrané klinické a laboratorní údaje byly korelovány s expresí autoantilátek a jejich kinetikou.

Téměř jedna čtvrtina vyšetřených pacientů s MODY (7/28; 25%) měla pozitivní GADA nebo IA-2A. GADA byly prevalentnější (7/7) nežli IA-2A (1/7). Incidence těchto autoantilátek nekorelovala s HLA (Human Leukocyte Antigen) rizikovým genotypem ani s konkrétním typem mutace v MODY genech. Pacienti, kteří exprimovali ostrůvkové autoantilátky vyvinuli v porovnání s pacienty bez autoantilátek diabetes později, ale měli horší glykemickou kompenzaci. Expresie autoantilátek klesla při jakémkoliv zlepšení kompenzace diabetu. Pouze jeden pacient nekorespondoval s výše uvedeným a vykazoval známky kombinace MODY a diabetes mellitus 1. typu.

Data naznačují transientní, ale vysoce prevalentní expresi specifických ostrůvkových autoantilátek u českých MODY pacientů. Autoantilátky byly nalezeny u pacientů s pozdějším vznikem diabetu a v době nedostatečné glykemické kompenzace. Jelikož zlepšení glykemické kompenzace bylo asociována s poklesem hladiny autoantilátek, jejich přítomnost může reflektovat kinetiku  $\beta$ -buněčné destrukce indukovanou jinými než autoimunitními faktory.

## ABSTRACT

Islet cell autoantibodies are associated with autoimmune insulinitis and belong to the diagnostic criteria of Type 1 diabetes mellitus. However, growing evidence suggests that autoantibodies are present in other types of diabetes. Here, we focus on the autoantibody incidence in Czech patients with maturity-onset diabetes of the young (MODY) and analyze their functional relevance in terms of diabetes onset and control.

Autoantibodies against glutamic acid decarboxylase 65 (GADA) and protein tyrosine phosphatase islet antigen 2 (IA-2A) were measured in a cohort of 28 Czech patients with MODY (all confirmed by genetic testing). Selected clinical data were correlated to the status and kinetics of autoantibodies.

One quarter of patients with MODY examined (7/28; 25%) was positive for GADA or IA-2A. GADA were more prevalent (7/7) than IA-2A (1/7). The incidence of autoantibodies did not correlate with human leukocyte antigen status, nor with particular mutation in MODY genes. The patients who were positive for the autoantibodies developed diabetes later than those who were autoantibody-negative, but had worse glycaemic control. Expression of autoantibodies decreased with any

improvement of diabetes compensation. Only one patient did not correspond to the above and displayed signs of combined signs of MODY and Type 1 diabetes.

The data suggest transient but highly prevalent islet cell autoantibody expression in Czech patients with MODY. The autoantibodies were found in patients with delayed diabetes onset, and in times of insufficient diabetes control. As improvement of glycaemic control was associated with a decrease in levels of autoantibodies, their presence may reflect the kinetics of  $\beta$ -cell destruction induced by causes other than autoimmune ones.

|   |    |
|---|----|
| <b>1. ÚVOD A TEORETICKÉ PODKLADY</b>  |    |
| <b>1.1. MONOGENNÍ DIABETES MELLITUS</b>   | 10 |
| 1.1.1. Definice monogenního diabetu   | 10 |
| 1.1.2. Klasifikace monogenního diabetu  | 10 |
| 1.1.3. Terminologie   | 10 |
| 1.1.4. Prevalence monogenního diabetu   | 11 |
| 1.1.5. Historie monogenního diabetu (MODY)  | 11 |
| <b>1.2. MONOGENNÍ DIABETES MELLITUS TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ</b>                                      | 12 |
| 1.2.1. Transkripční faktory   | 12 |
| 1.2.2. Hepatální nukleární faktory (HNF)  | 13 |
| 1.2.3. Transkripční faktor HNF-1 $\alpha$   | 14 |
| 1.2.4. Transkripční faktor HNF-4 $\alpha$   | 23 |
| 1.2.5. Patofyziologie a klinická manifestace <i>HNF1A</i> -MODY a <i>HNF4A</i> -MODY                | 31 |
| <b>1.3. SPECIFICKÉ OSTRŮVKOVÉ AUTOPROTIILÁTKY</b>   | 39 |
| 1.3.1. Přehled specifických ostrůvkových autoprotilátek   | 39 |
| 1.3.2. Význam specifických ostrůvkových autoprotilátek v klinické praxi                             | 41 |
| 1.3.3. Prevalence specifických ostrůvkových autoprotilátek u jednotlivých typů diabetes mellitus    | 42 |
| <b>2. CÍLE A HYPOTÉZY</b>   | 46 |
| 2.1. Cíle práce   | 47 |
| 2.2. Hypotézy   | 47 |
| <b>3. METODIKA</b>  | 50 |
| 3.1. Molekulárně genetické vyšetření  | 51 |
| 3.2. Charakteristika sledované kohorty pacientů s monogenním diabetem                               | 51 |
| 3.3. Vyšetření ostrůvkových autoprotilátek  | 52 |
| 3.4. Vyšetřované klinické a laboratorní parametry   | 53 |
| 3.5. Statistické zpracování   | 53 |
| <b>4. VÝSLEDKY</b>  | 56 |
| 4.1. Případ <i>HNF1A</i> -MODY rodiny s ostrůvkovými autoprotilátkami                               | 56 |
| 4.2. Diskriminace MODY a diabetes mellitus 1. typu na základě stanovení ostrůvkových autoprotilátek | 58 |
| 4.3. Incidence ostrůvkových autoprotilátek u MODY pacientů  | 58 |
| 4.4. Dynamika ostrůvkových autoprotilátek   | 63 |
| 4.5. Klinická charakteristika pacientů s ostrůvkovými autoprotilátkami                              | 64 |
| <b>5. DISKUZE</b>   | 70 |
| 5.1. Diskuze výsledků práce a kauzálních souvislostí MODY s ostrůvkovými autoprotilátkami           | 71 |
| 5.2. Význam studie a diskuze nad klinickými výstupy   | 75 |
| <b>6. ZÁVĚR</b>   | 76 |
| <b>7. SOUHRN</b>  | 76 |
| <b>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>   | 77 |
| <b>9. SEZNAM PUBLIKACÍ</b>  | 98 |





## 1. ÚVOD A TEORETICKÉ PODKLADY

### 1.1. MONOGENNÍ DIABETES MELLITUS

Pacienti s monogenním diabetem byli donedávna víceméně opomíjenou skupinou pacientů s diabetes mellitus, rozptýlenou bez správné diagnózy mezi pacienty s nejběžnějšími typy cukrovky. Rostoucí zájem o jeho diagnostiku umožnila až širší dostupnost genetického vyšetření a především poznání, že frekvence monogenního diabetu v populaci je významně vyšší než se původně předpokládalo.

#### 1.1.1 Definice monogenního diabetu

Monogenní diabetes je vzácnou a heterogenní skupinou dědičného diabetu, zapříčiněný mutací v jednom z genů kontrolující vývoj, diferenciaci a funkci  $\beta$ -buněk. Mutace v takovém konkrétním genu pak podmiňuje vrozený defekt sekrece inzulínu  $\beta$ -buňkami rezultující v diabetes. Genový defekt se dědí autozomálně dominantním způsobem, takže riziko jeho vzniku u potomka nemocného je 50% (Sperling M. et al., 1999). Takto vysoká pravděpodobnost onemocnění zaručuje výskyt cukrovky prakticky ve všech generacích postižené rodiny, v linii jednoho z rodičů. Onemocnění však může vzniknout také na podkladě spontánní de novo mutace (Pearson E. R. et al., 2005), a popsány jsou též případy recesivní dědičnosti (Murphy R. et al., 2008; Colclough K. et al., 2014).

Nejčastějším kauzálním genem je *GCK* gen [kódující enzym *glukokinázu* (*GCK*)] a *HNF1A* [kódující transkripční faktor *hepatální nukleární faktor 1 $\alpha$*  (*HNF-1 $\alpha$* )] nebo (vzácněji) gen *HNF4A* [kódující transkripční faktor *hepatální nukleární faktor 4 $\alpha$*  (*HNF-4 $\alpha$* )] (Průhová Š. et al., 2003). Celkem je však s monogenním diabetem asociováno okolo dvaceti různých genů (Molven A. & Njolstad P. R., 2011).

#### 1.1.2 Klasifikace monogenního diabetu

Monogenní formy cukrovky jsou v rámci klasifikace diabetes mellitus zařazeny do samostatné kategorie mezi *ostatní specifické typy cukrovky* jako diabetes způsobený genetickým defektem  $\beta$ -buněk, vzácněji genetickým defektem účinku inzulínu (Pelikánová T. a kolektiv, 2012). Obě skupiny lze podle konkrétního genového defektu podrobněji rozčlenit.

Na základě doby manifestace lze rozlišit tzv. *neonatální diabetes* objevující se u dětí do šesti měsíců od narození, a *MODY* (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*), manifestující se obvykle v době adolescence a časně dospělosti. *MODY* zahrnuje skupinu tzv. glukokinázového diabetu (*GCK-MODY*) a diabetu transkripčních faktorů (především *HNF1A-MODY* a *HNF4A-MODY*). Jednotlivé subtypy se mezi sebou liší patofyziologií, klinickou symptomatologií, léčbou a prognózou. Do dnešní doby je známo již 13 kauzálních *MODY* genů (Molven A. & Njolstad P. R., 2011), nicméně lze předpokládat, že celosvětově intenzivně probíhající molekulárně-genetické studie přinesou objev dalších genů v rodinách s *MODY* fenotypem, u nichž nebyl kauzální gen doposud objeven (tzv. *MODY X* rodiny). Odhaduje se, že asi u 11% *MODY* případů, není doposud stanovena konkrétní genetická příčina (McCarthy M. I. & Hattersley A. T., 2008).

#### 1.1.3 Terminologie

V minulosti se pro označení jednotlivých subtypů MODY používalo označení číslicí (např. MODY1, MODY2 atd.). Jelikož masivní rozvoj molekulárně-genetického vyšetření umožnil přesné stanovení genetické odchylky v identifikovaných kauzálních genech, od použití termínu MODY1, 2, 3 atd. se postupně upustilo (Murphy R. et al., 2008). Současná terminologie vychází z konkrétní genetické odchylky (např. *HNF1A*-MODY nebo též *HNF1A*-diabetes, jenž nahradil starší termín MODY3; *GCK*-MODY anebo *GCK*-diabetes označuje dříve užívaný MODY2 atd.).

#### 1.1.4 Prevalence monogenního diabetu

Monogenní diabetes (MODY) zodpovídá přibližně za 1-3% všech případů cukrovky (Molven A. & Njolstad P. R., 2011). Skutečná prevalence však není známa. Mnoho pacientů s MODY doposud správné diagnostice uniká a je nesprávně zařazeno mezi pacienty s diabetem 1. a 2. typu. Odhadovaná populační prevalence se v případě *GCK*-MODY odhaduje na 0,04-0,10% a u *HNF1A*-MODY 0,02-0,04% (Murphy R. et al., 2008).

V prevalenci jednotlivých podtypů MODY navíc existuje velká diverzita napříč populacemi; prevalence kupříkladu *GCK*-MODY tak osciluje mezi 8% až 63% a v případě *HNF1A*-MODY mezi 13% a 64% (Průhová Š. et al., 2003). V České republice patří k nejčastějším typům MODY *GCK*-MODY s prevalencí 31% a *HNF1A*-MODY s asi 11,5%, *HNF4A*-MODY reprezentuje asi 5% všech MODY pacientů (Průhová Š. et al., 2003). Naopak ve Velké Británii tvoří asi 52% všech případů pacienti s *HNF1A*-MODY, s *GCK*-MODY 32% a s *HNF4A*-MODY 10% (Shields B. M. et al., 2010).

#### 1.1.5 Historie monogenního diabetu

MODY a dědičný charakter tohoto, jinak klinicky značně heterogenního onemocnění u mladých dospělých jedinců, byl postupně rozpoznáván od 50. a 60. let minulého století. Teprve na začátku 90. let 20. století byl genetickými studiemi prokázán konkrétní genový defekt asociovaný s MODY, následovaný kaskádou dalších kauzálních genů. V těchto letech došlo k explozivnímu rozvoji moderních technik molekulární genetiky, jenž mimo jiné prokázal značnou genetickou různorodost MODY.

V době, kdy byl diabetes mellitus považován za čistě polygenní onemocnění, zahrnující *juvenilní (juvenile-onset) diabetes* u dětí a mladých, vyžadující léčbu inzulinem (tzv. inzulin dependentní diabetes mellitus – IDDM) a *stařecký (maturity-onset) diabetes* u dospělých středního věku a starších dospělých kompenzovatelný dietou nebo perorálními antidiabetiky (tzv. non-inzulin dependentní diabetes mellitus – NIDDM) Stefan Fajans poprvé představil termín „*maturity-onset type diabetes of childhood or of the young*“. Psal se rok 1964 a Fajans tehdy na pátém sjezdu IDF (International Diabetes Federation) v Torontu popsal typ diabetu u dětí a mladistvých se silným dědičným podkladem, vymykající se svým charakterem doposud zavedeným, dvěma výše uvedeným, skupinám pacientů s diabetem (Fajans S. S. & Conn J. W., 1965; Fajans S. S. & Bell G. I., 2011).

Vycházel při tom z pozorování skupiny blízkých (prvostupňových) příbuzných pacientů s diabetes mellitus, které, tehdy ještě jako postgraduální student v prvním ročníku na Michiganské Universitě v Ann Arbor, rekrutoval v letech 1949-1950 do dlouhodobé prospektivní studie analyzující

možnosti diagnostiky, přirozený vývoj a klinickou genetiku diabetu (Fajans S. S. & Bell G. I., 2011). Po provedení rutinního orálního glukózového tolerančního testu (oGTT) překvapivě zjistil, že 19% prvostupňových příbuzných pacientů s cukrovkou má diabetogenní oGTT křivku, a navíc, že řada z nich je mladší deseti let (Fajans S. S. & Conn J. W., 1954; Fajans S. S. & Conn J. W., 1959). Sledování této skupiny mladých pacientů s asymptomatickým diabetem nabralo nový rozměr v roce 1958, po setkání se sedmdesátiletým mužem trpícím cukrovkou od 41 let věku, v jehož rodině identifikoval plně manifestovaný diabetes mellitus, lačnou hyperglykémii či poruchu glukózové tolerance u více než sedmnácti rodinných příslušníků, celkem v šesti generacích. Většině z nich bylo mezi 11 až 30 lety (Fajans S. S. & Bell G. I., 2011). V roce 1960 pak Fajans u příležitosti prvního mezinárodního endokrinologického sjezdu v Kodani, představil skupinu neobézních dětí, adolescentů a mladých dospělých s mírným, asymptomatickým diabetem, jejichž porušená glukózová tolerance a lačná hyperglykémie se zlepšila po podání derivátů sulfonylurey (Fajans S. S. & Conn J. W., 1960; Fajans S. S. & Bell G. I., 2011).

O 14 let později, tentokrát v Londýně roku 1974, popsal Robert Tattersall u tří rodin z King's College Hospital v „neobvykle časném věku“ mírnou formu diabetu, jež nebylo zapotřebí léčit inzulínem. Právě Tattersall rozpoznal v těchto rodinách autozomálně dominantní charakter dědičnosti diabetu (Tattersall R. B., 1974).

Robert Tattersall společně se Stefanem Fajensem následně potvrdili (na základě dat z prospektivní studie probíhající v Ann Arbor od roku 1949) autozomálně dominantní charakter dědičnosti diabetu u 23 rodin, odlišující se od dědičných znaků juvenilního diabetu [dnes diabetes mellitus 1. typu] (Tattersall R. B., & Fajans S. S., 1975; Fajans S. S. & Bell G. I., 2011). Ve společně publikovaném článku, v roce 1975, pak poprvé použili akronym MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young), jež definovali jako trvalou hyperglykémii diagnostikovanou před 25. rokem věku, která může být léčena bez inzulínu déle než dva roky a v rodinách se dědí. Původně se domnívali, že se jedná o podtyp diabetes mellitus 2. typu s manifestací v mladém věku a autozomálně dominantním typem dědičného přenosu.

Průlom ve výzkumu MODY nastal v 90. letech minulého století v souvislosti s rozvojem molekulární genetiky a jejím využitím v klinické praxi. Postupně byly identifikovány kauzální geny *GCK* (Froguel P. et al., 1992; Hattersley A. T. et al., 1992), *HNF4A* (Yamagata K. et al. 1996) a současně *HNF1A* (Yamagata K. et al., 1996). Pak následovaly další – gen kódující IPF1 (insulin promoter factor 1) nebo-li PDX-1 (Stoffers D. A., 1997) a transkripční faktor HNF-1 $\beta$  (Horikawa Y., 1997). Klíčovým poznatkem bylo, že drtivá většina genů, jejichž mutace podmiňuje MODY, vede ke snížení funkce  $\beta$ -buněk spíše než ke zvýšené inzulínové rezistenci.

## **1.2 MONOGENNÍ DIABETES MELLITUS TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ**

### **1.2.1 Transkripční faktory**

Transkripční faktory jsou bílkoviny, jež se zásadně uplatňují v regulaci genové exprese. V buněčném jádře řídí její první krok – transkripci. Hlavní charakteristikou těchto bílkovin, jež je odlišuje od ostatních proteinových molekul, je přítomnost jedné či více DNA-vazebných domén, které

transkripčním faktorům propůjčují schopnost vázat se na specifickou DNA sekvenci v blízkosti genu, jehož expresi regulují (Mitchell P. J. & Tjian R., 1989; Ptashne, M. & Gann A., 1997).

Transkripční faktory nesou na svém aminokyselinovém řetězci kromě unikátní DNA-vazebné domény také signální a transaktivační doménu (Latchman D. S., 1997). *DNA-vazebná doména* rozpoznává specifickou DNA sekvenci – promotor či enhancer příslušného genu, se kterým se pojí. *Signální doména* přenáší do transkripčního komplexu vnější podněty, které prostřednictvím up- či down-regulace ovlivňují míru genové exprese (Latchman D. S., 1997). *Transaktivační doména* obsahuje vazebná místa pro další bílkoviny, například koregulátory transkripce. Po navázání ligandu (glukózy, xenobiotika, endobiotika aj.) dojde k aktivaci transkripčního faktoru, navázání na DNA spolu s koaktivátory a dalšími přídatnými proteiny, jež spustí acetylaci histonů a aktivaci transkripce genu.

Tak jako veškeré ostatní bílkoviny v těle jsou i transkripční faktory zapsány genetickým kódem v DNA na příslušném chromosomu, transkribovány v buněčném jádře a translatovány v cytoplasmě.

Transkripční faktory mají schopnost číst a interpretovat genetický záznam zapsaný v DNA, podle kterého systematicky řídí genovou transkripci. Přepis některých genů mohou iniciovat, pozitivně stimulovat (up-regulace), jiných naopak brzdit (down-regulace). Takto kontrolují míru transkripce a ovlivňují množství výsledného genového produktu dostupného buňce (Latchman D. S., 1997).

Tzv. *obecné transkripční faktory* jsou důležité pro samotný běh transkripce v buňce a jsou proto přítomné ve všech tělesných buňkách (Reese J. C., 2003). Některé se váží přímo na specifickou sekvenci promotoru příslušného genu zvanou TATA box, avšak většinou nejprve interagují s RNA-polymerázou a spolu s dalšími pomocnými proteiny vytváří tzv. preiniciační komplex, který se poté váže na promotorovou oblast transkribovaného genu. Jiné, tzv. *specifické transkripční faktory* pracují typicky jen v některých buňkách či tkáních. Váží se přímo na DNA (upstream element promoter), kde spínají (či vypínají) přepis konkrétních cílových genů. Tímto ovlivňují například vlastní morfologii buňky a její diferenciaci, jež dává vzniku nejrůznějším buněčným typům, tkáním a orgánům; následně určují aktivitu jednotlivých buněk, jakož i celý jejich osud (Lobe C. G., 1992; Pawson T., 1993; Evan G. et al., 1994). Sahrávají tedy důležitou úlohu již při samotném vývoji organismu a participují na regulaci buněčného cyklu, tj. na buněčném růstu a apoptóze.

Transkripční faktory obvykle nepracují samostatně, ale spolupracují s mnoha dalšími v tzv. *transkripční regulační síti*. Každá buňka disponuje nejen specifickou kombinací transkripčních faktorů, ale také specifickou strukturou transkripční regulační sítě, ve které jednotlivé transkripční faktory přímo regulují promotory genů kódující další transkripční faktory regulační sítě (Servitja J. M. & Ferrer J., 2004).

### 1.2.2 Hepatocytární nukleární faktory

Hepatocytární nukleární faktory (HNF) jsou skupinou fylogeneticky nepříbuzných transkripčních faktorů, jejichž název byl odvozen od místa jejich dominantní exprese – v játrech. HNF nejčastěji

asociované s MODY – HNF-1 $\alpha$  a HNF-4 $\alpha$  – byly objeveny díky studiím, které původně pátraly po proteinech zodpovědných za tkáňově specifickou regulaci genové exprese v játrech (Cereghini S., 1996). Později byla jejich existence prokázána také v buňkách mnoha jiných tkání, například gastrointestinálním traktu, ledvinách či pankreatu (Pontoglio M. et al., 1996).

HNF-1 $\alpha$  a HNF-4 $\alpha$  jsou součástí specifické transkripční regulační sítě, ve které společně regulují transkripci širokého spektra genů (Hansen S. K. et al., 2002). Z funkčního významu lze cílové geny rozdělit do tří skupin: *a*) metabolické geny; *b*) geny jiných transkripčních faktorů; a *c*) geny regulující buněčný cyklus [apoptózu a proliferaci] (Johnson J. D., 2007). Jejich prostřednictvím se významnou měrou podílejí již při samotném embryonálním vývoji organismu a buněčné diferenciaci řady tkání (Maestro M. et al., 2007), například endokrinního pankreatu (Johnson J. D., 2007; Chakrabarti S. K., & Mirmira R. G., 2003), jater, ledvin a střeva (Chen W. S. et al., 1994; Li J. et al., 2000; Boyd M. et al., 2009). V již vyvinutém organismu se bílkovinné produkty jimi kódovaných genů uplatňují při řízení řady metabolických procesů (např. metabolismu a transportu cholesterolu, mastných kyselin, glukózy a bílkovin) a udržení metabolické homeostázi (Pontoglio M. et al., 1996; Pontoglio M. et al., 1998; Lee Y. H. et al., 1998; Shih D. Q. et al., 2001; Wobser H. et al., 2006). Není pochyb ani o řízení transkripce klíčových genů rozhodujících o osudu celé buňky (Johnson J. J., 2007; Wobser H. et al., 2002; Yamagata K. et al., 2002).

Při pohledu na takto pestrý výčet cílových genů je zřejmé, že jakákoliv porucha jejich funkce bude mít zřejmý klinický důsledek. Homozygotní mutace v genu kódující jakýkoliv z těchto transkripčních faktorů jsou s životem neslučitelné. Heterozygotní mutace jsou spojovány zejména s poruchou stimulované sekrece inzulínu a snížením  $\beta$ -buněčné masy pankreatu rezultující v diabetes (MODY). Je však zajímavé, že jedinci s *HNF1A* a podobně také s *HNF4A* mutací mají zřetelný, klinicky závažný defekt pouze v pankreatu a jen nepatrnou abnormalitu v jiných tkáních, ve kterých byla klíčová role těchto HNF prokázána (Servitja J. M. et al., 2009) – např. poruchu glukózové renální reabsorpce a selektivní aminoacidurii při dysfunkci HNF-1 $\alpha$ . V jiných tkáních exprimující tyto transkripční faktory (třeba v játrech) klinicky relevantní odchylky známy nejsou.

### 1.2.3 Transkripční faktor HNF-1 $\alpha$

HNF-1 $\alpha$  (označovaný též jako Tcf-1 protein) je tkáňově specifický transkripční faktor, patřící do homeodoménové rodiny, obsahující POU A-homeodoménu (Cereghini S., 1996). Do této rodiny patří také variantní HNF1 (vHNF1) neboli HNF-1 $\beta$ , nukleární protein s podobnou strukturou, rozpoznávající ta samá vazebná místa jako HNF-1 $\alpha$ . HNF-1 $\alpha$  funguje jako pozitivní transkripční regulátor.

HNF-1 $\alpha$  má unikátní strukturu skládající se ze tří funkčních domén – dimerizační, transaktivační a DNA-vazebné (Ryffel G. U., 2001). Amino(N)-terminální *dimerizační* doména, umožňuje homo- i hetero-dimerizaci tohoto faktoru (tzn. spojení dvou monomerních molekul, např. s dalším HNF-1 $\alpha$  nebo jiným faktorem, např. HNF-1 $\beta$ ). Dimerizace je podmínkou interakce faktoru s DNA. Karboxy(C)-terminální *transaktivační* doména je nezbytná pro transaktivaci promotorů cílových genů. Vazbou dimerizačního kofaktoru na N-terminální doménu dochází ke stabilizaci homo- či hetero-dimeru a zvýšení jeho transaktivačního potenciálu. *DNA-vazebná*, a navíc též *POU A* doména, slouží k vazbě na DNA.

HNF-1 $\alpha$  působí vždy jako dimer (Yamagata K. et al., 1998). Jako homodimer se na DNA váže přes atypický helix-turn-helix motiv (vazebnou doménu) a dimerizuje přes krátký alfa-helikální N-terminální segment (dimerizační doménu), čímž transaktivuje přepis cílových genů nesoucí ve svých promotorech příslušné rozpoznávací sekvence. Jelikož se HNF-1 $\alpha$  a HNF-1 $\beta$  vyznačují značnou homologií především dimerizační a DNA-vazebné domény, je jim umožněno (přes dimerizační doménu) nejen tvořit heterodimery, ale také vázat se na identické DNA sekvence. Z tohoto důvodu mohou tyto transkripční faktory hrát komplementární role (D'Angelo A. et al., 2010). HNF-1 $\alpha$  se však zdá být potentnějším transaktivátorem než HNF-1 $\beta$  (Pontoglio M. et al., 1996).

Gen pro HNF-1 $\alpha$  (*HNF1A*) je lokalizovaný na dlouhém (q) raménku 12. chromosomu a skládá se z 10 exonů (Černá M. et al., 2013). Místem jeho dominantní exprese jsou játra [hepatocyty], dále pak ledviny [proximální renální tubuly ledvinného parenchymu], pankreas [endokrinní a exokrinní buňky] a zažívací trakt [střevo a žaludek] (Boj S. F. et al., 2001; Pontoglio M. et al., 1996; Yamagata K., 2003).

Vlastní syntéza HNF-1 $\alpha$  není řízena jako u jiných transkripčních faktorů autoregulačním okruhem (tzn., že příslušný faktor řídí svou vlastní transkripci vazbou na promotor vlastního genu), ale je regulována jinými transkripčními faktory (transkripční regulační sítě) a je tkáňově specifická. Hlavním regulátorem je podobný hepatální nukleární faktor – HNF-4 $\alpha$  (Gagnoli C. et al. 1997; Hansen S. K. et al., 2002). V experimentálních studiích na myších modelech a později také u lidských pacientů s MODY bylo prokázáno, že regulace mezi HNF-1 $\alpha$  a HNF-4 $\alpha$  je obousměrná. Analýzami *in vivo* a *in vitro*, které identifikovaly vysoce specifické vazebné místo nad TATA boxem *HNF1A* promotoru pro HNF-4 $\alpha$  (Gagnoli C. et al. 1997), byla nejprve prokázána závislost exprese *HNF1A* na transkripčním faktoru HNF-4 $\alpha$  (Duncan S. A. et al., 1998). Následně analýzy myších modelů s knockoutovaným *hnf1a* prokázaly v pankreatických ostrůvcích a exokrinních buňkách i opačnou vazbu – dependenci exprese *HNF4A* na HNF-1 $\alpha$  (Boj S. F. et al., 2001). Tento efekt je zprostředkovaný vazbou HNF-1 $\alpha$  na tkáňově specifický promotor (P2) lokalizovaný před *HNF4A* promotorem P1 (Boj S. F. et al., 2001; Thomas, H. et al., 2001). Navíc bylo prokázáno, že expresi *HNF1A* přímo reguluje též inzulin (Duncan S.A., 1998).

HNF-1 $\alpha$  je exprimován v embryonálním období i postnatálně. Během prenatalního vývoje ji předchází aktivace HNF-1 $\beta$  (Coffinier C. et al., 1999). Studie na myších modelech odhalily, že zásadní regulátor transkripční sítě embryonálního pankreatu, který řídí organogenezi, růst a diferenciaci je právě HNF-1 $\beta$ . Exprese HNF-1 $\alpha$  je aktivována až v době hepatální, pankreatické, renální a intestinální organogeneze a pokročilejšího stupně diferenciaci (Cereghini S., 1996). Počátek exprese HNF-1 $\alpha$  je pozdější i v porovnání s HNF-4 $\alpha$ . Neovlivňuje stěžejní struktury jako je primitivní pruh, Hensenův uzel, notochord nebo viscerální endoderm, kde je aktivní právě HNF-4 $\alpha$ , ale je specificky omezen na již vyvíjející se orgány (Pontoglio M. et al., 1996).

Odlíšné časování exprese během vývoje také odráží výsledky experimentálního knockoutu *HNF* genů na myších modelech (Coffinier C. et al., 1999). *Hnf1b*<sup>-/-</sup> myší embrya umírají 6,5-7. den koncepce a k časnému úmrtí dochází také v případě knockoutu *Hnf4a*. *Hnf1a*<sup>-/-</sup> myši naopak přežívají a rodí se s normální frekvencí. Porucha HNF-1 $\alpha$  nevede na rozdíl od výše zmíněných faktorů k předčasné intrauterinní letalitě a hlouběji nenarušuje embryonální vývoj. HNF-1 $\alpha$  deficientní

myši navíc v době narození nemají žádné hrubší strukturální defekty. Relativně brzy (cca po týdnu) však u nich dochází k rozvoji hepatální, pankreatické a renální dysfunkce, ovlivňující jejich růst a délku života (Pontoglio M. et al., 1996).

HNF-1 $\alpha$  je důležitý především pro správné fungování pankreatu, jater a ledvin v *postnatálním období*, ale podílí se též na jejich vývoji v době *organogeneze*. Transkripce řízená prostřednictvím HNF-1 $\alpha$  je tkáňově specifická, tzn., že jeho funkce a význam jsou v jednotlivých tkáních rozdílné. Celogenomové studie prokázaly, že se genová exprese pod taktovkou HNF-1 $\alpha$  zásadně liší především v játrech a pankreatických ostrůvcích. Záleží na přítomnosti ostatních transkripčních faktorů a jejich vzájemném uspořádání v transkripční regulační síti (Ryffel G. U., 2001).

**V játrech** se vazebná místa pro HNF-1 $\alpha$  nachází v promotorech mnoha jaterních genů kódující takové klíčové jaterní proteiny, jakými jsou např. albumin,  $\alpha$ - a  $\beta$ -fibrinogen, transthyretin,  $\alpha$ 1-antitrypsin, pyruvát-kináza, fenylalanin-hydroxyláza nebo  $\alpha$ -fetoprotein (Pontoglio M. et al., 1996; Pontoglio M. et al., 2000). Jejich prostřednictvím se v játrech podílí na řízení zásadních metabolických pochodů jako je glukoneogeneze, syntéza cholesterolu a apolipoproteinů; syntézou monoxygenáz cytochromového systému P450 na detoxikaci organismu; ale i dalších tělesných pochodů – např. ovlivněním syntézy koagulačních faktorů na srážení krve (Odom D. T. et al., 2004). Na expresi těchto genů participuje v hepatocytech několik specifických jaterních i obecných transkripčních faktorů, mezi nimi i HNF-1 $\beta$  a HNF-4 $\alpha$ .

**V pankreatických  $\beta$ -buňkách** hraje HNF-1 $\alpha$  centrální roli v transportu glukózy do buňky a jejím intracelulárním metabolismu (glykolýze a mitochondriální oxidaci), nebo též buněčném cyklu (buněčné proliferace a apoptózy) či  $\beta$ -celulární komunikaci (Fajans S. S. et al., 2001; Wang L. et al., 2000; Wobser H. et al., 2002). Uplatňuje se jako důležitý regulátor inzulínové sekrece, řídící expresi významných genů kódujících inzulín, glukózový transportér 2 (GLUT2), pyruvát kinázu, aldolázu B, 3-OH-3-methylglutaryl koenzym-A reduktázu a mitochondriální 2-oxoglutarát dehydrogenázu a další.

**V ledvinách**, konkrétně v proximálním renálním tubulu, zajišťuje expresi řady transportních bílkovin, zejména SGLT2, podílející se na reabsorpci glukózy a dalších metabolitů z ledvin (Pontoglio M. et al., 2000).

HNF-1 $\alpha$  se také uplatňuje v diferenciaci a fungování **intestinálního** epitelu. V několika *in vivo* studiích bylo prokázáno, že v diferencovaných enterocytech aktivuje expresi řady intestinálních genů, např. *Fabp1*, *LPH*, *Cftr* a *Glc-6-Pase* (Mouchel N. et al., 2004; Gautier-Stein A. et al., 2006; Bosse T. et al., 2007), v *in vitro* studiích pak např. *Dpp4* (Erickson R. H. et al., 2000). Regulací exprese *Jag1*, *Atoh1* a *Cdx2* se ve střevním epitelu spolu s HNF-1 $\beta$  podílí na rozhodování o buněčném osudu a terminální diferenciaci enterocytů, včetně intestinálních sekrečních buněk (D'Angelo A. et al., 2010).

Poznatky o významu a funkci HNF-1 jsou získávány zejména ze zvířecích modelů s homozygotní *hnf1a* mutací (*hnf1*<sup>-/-</sup> myši). Nelze je ovšem zcela analogicky aplikovat na lidské pacienty s heterozygotní *HNF1A* mutací, jelikož se HNF-1 $\alpha$  (a podobně také HNF-4 $\alpha$ ) váže na jiné geny u lidí a jiné u myši. Tkáňově specifická regulace transkripce se tudíž mezi těmito dvěma živočišnými druhy významně odlišuje (Odom D. T. et al., 2007). Analýzy hovoří o třetinové či 20% vazbové shodě



mezi myším a lidským genomem (Odom D. T. et al., 2007; Boj S. F. et al., 2009). Na druhou stranu vazba HNF-1 $\alpha$  (i HNF-4 $\alpha$ ) k některým cílovým genům s esenciální funkcí je mezi myšmi a lidmi značně konzervovaná (Boj S. F. et al., 2009). Heterozygotní zvířata (*hnf1*<sup>+/-</sup> myši) sice zrcadlí podobnou genetickou situaci, jaká se vyskytuje u lidských jedinců s heterozygotní *HNF1A* mutací, ale orgánová poškození a z nich plynoucí klinické odchylky (včetně diabetu) u nich nevznikají (Dukes I. D. et al., 1998; Pontoglio M. et al., 1998). Na druhou stranu lze namítnout, že většina studií používala relativně mladé heterozygotní myši, přičemž diabetes a další klinické symptomy MODY se mohly manifestovat až v pokročilejším věku (Johnson J. D., 2007).

#### *Porucha funkce HNF-1 $\alpha$*

Deficit HNF-1 $\alpha$  vede k progresivní metabolické dysregulaci. Na experimentálních modelech a u lidských jedinců se však projevuje odlišně. Na myších modelech s úplnou absencí HNF-1 $\alpha$  lze pozorovat časně po narození rozvoj hepatomegalie (dosahující na začátku druhého týdne života dvojnásobku normální velikosti jater) a jaterního selhání s metabolickým rozvratem, poruchu inzulinové sekrece (manifestující se inzulin-independentním diabetem) a Fanconioho syndrom s poruchou proximální tubulární reabsorpce (projevující se závažnou glykosurií, polyurií) a progresivní wasting syndrom (se ztrátou fosfátů a aminokyselin), který je dále provázen kachexií (svalovou atrofií a ztrátou podkožního tuku) a masivní demineralizací kostí; u některých myších modelů pozorujeme také dwarfismus (Pontoglio M. et al., 1996; Pontoglio M. et al., 1998; Pontoglio M. et al., 2000; Lee Y. H. et al., 1998).

Úplné chybění HNF-1 $\alpha$  není v lidské populaci popsáno, resp. není s životem slučitelné (Černá M. et al., 2013). Parciální defekt HNF-1 $\alpha$  se u člověka projevuje zejména rozvojem glukoregulační poruchy a diabetes mellitus (*HNF1A*-MODY), provázené glykosurií (snížením renálního prahu pro glukózu) a selektivní aminoacidurií. Porucha jaterních funkcí jednoznačně prokázána nebyla. Je možné, že u lidských jedinců ve většině buněk stačí k plnému zajištění funkce tohoto transkripčního faktoru přítomnost jen jedné wild-type alely (Riffel G. U. et al., 2001) nebo jsou jeho funkci schopny nahradit jiné transkripční faktory, např. v játrech HNF-1 $\beta$ . To však zcela zřejmě neplatí v jiných tkáních, např. v pankreatu nebo v ledvinách (v případě exprese *Sglt2*). Především neschopnost nemutované alely nebo jiných genů kompenzovat HNF-1 $\alpha$  dysfunkci v pankreatu, svědčí o zásadní úloze HNF-1 $\alpha$  právě v  $\beta$ -buňce.

- *Porucha funkce HNF-1 $\alpha$  v játrech*

Pomocí homologní inaktivace *HNF1A* genu u myši byla prokázána úplná inaktivace poměrně malého subsetu cílových jaterních genů (např. *PAH* genu, kódující fenylalanin hydroxylázu), zatímco transkripce většiny ostatních genů, které byly považovány striktně pod kontrolou HNF-1 $\alpha$  (např. genu pro albumin a  $\alpha$ 1-antitrypsin), byla ve skutečnosti ovlivněna jen málo (Pontoglio M. et al., 1996). Ztrátu funkce HNF-1 $\alpha$  zde mohou částečně kompenzovat jiné transkripční faktory interagující s regulačními elementy HNF-1 $\alpha$  cílových genů (Pontoglio M. et al., 1996), například up-regulací HNF-1 $\beta$ , který je schopen do určité míry převzít úlohu  $\alpha$ -proteinu na mnoha HNF1 cílových genech.

Nápadným rysem *hnf1* deficientních myší je hepatomegalie a hyperfenylalaninémie. Absence fenylalanin hydroxylázy, způsobená prakticky nulovou expresí *PAH* genu, vede k poruše plazmatické clearance fenylalaninu a jeho kumulaci – hyperfenylalaninémii. Klinickým důsledkem hyperfenylalaninémie je rozvoj fenylketonurie. Defektní genovou transkripcí dochází také k poruše transportu a syntézy žlučových kyselin. Snížená exprese transportérů žlučových kyselin (*Slc10a1*, *21a3* a *21a5*) na bazolaterální membráně hepatocytů vede k poruše vychytávání žlučových kyselin z portální krve a tím ke zvýšení jejich plazmatické koncentrace (Shih D. Q. et al., 2001). Pravděpodobně vlivem snížené aktivity HDL-katabolického enzymu – jaterní lipázy a zvýšené exprese HDL-esterifikujícího enzymu lecitin-cholesterol-acyl-transferázy, se v přítomnosti velkých HDL partikulí zvyšuje plazmatická hladina cholesterolu (Shih D. Q. et al., 2001). Spolu s poruchou HDL metabolismu se také zvyšuje syntéza jaterního cholesterolu.

Hepatomegalie se rozvíjí záhy po narození a je způsobená jednak akumulací tuku při poruše metabolismu mastných kyselin (Akiyama T. E. et al., 2000) a podle některých studií také zvýšenou proliferací hepatocytů, kterou autoři vysvětlují jako snahu kompenzovat poškozené jaterní funkce (Pontoglio M. et al., 1996). Na druhou stranu, prokázané zvýšení transamináz, cholesterolu a bilirubinu spolu s hyperamonémií (Pontoglio M. et al., 1996; Shih D. Q. et al., 2001) může u homozygotních zvířat svědčit spíše o hepatocelulárním poškození, resp. destrukci.

V jiných myších liniích se homozygotní inaktivace HNF-1 $\alpha$  pojila s dwarfismem (formou trpaslictví) rezultující z poruchy glukóza-6-fosfátového systému, vzniklé vinou snížené exprese jaterního G6P-transportéru (Hiraiwa H. et al., 2001). Ta je asociována nejen s růstovou retardací, ale podílí se také na vzniku hepatomegalie, hyperlipidémie a renální dysfunkce u těchto zvířat (Hiraiwa H. et al., 2001).

Význam HNF-1 $\alpha$  pro fungování jater není u člověka zatím plně objasněn. Porucha jaterních funkcí asociovaná s *HNF1A* mutací nebyla u lidských jedinců jednoznačně prokázána. Důvodem může být přítomnost transkripční regulační sítě, ve které funkci HNF-1 $\alpha$  může nahradit jiný transkripční faktor (např. HNF-4 $\alpha$  nebo HNF-1 $\beta$ ). Nicméně u několika nespřízněných HNF1A-MODY rodin se zárodečnou heterozygotní *HNF1A* mutací byl popsán výskyt jaterní adenomatózy, charakterizované jako přítomnost četných adenomů v normálním jaterním parenchymu. Výskyt adenomatózy, byl v těchto rodinách široce variabilní, byl diagnostikován v různém věku a klinicky se manifestoval také odlišně – jednotlivé kazuistiky popisují asymptomatický průběh až po fatální krvácení (Reznik Y. et al., 2004). V těchto případech se jednalo o kosegregaci jaterní adenomatózy s bíaleickou inaktivací *HNF1A* [skládající se buď ze dvou odlišných mutací v genu pro HNF-1 $\alpha$  nebo *HNF1A* delecí (Reznik Y. et al., 2004; Bluteau O. et al., 2002)]. *HNF1A* tak vlastně splnil genetická kritéria klasického tumor supresorového genu (Bluteau O. et al., 2002).

- *Porucha funkce HNF-1 $\alpha$  v pankreatu*

HNF-1 $\alpha$  řídí v pankreatu, podobně jako v játrech, expresi velkého množství genů zajišťující široké spektrum funkcí (pleiotropní účinek HNF-1 $\alpha$ ). Genová exprese řízená HNF-1 $\alpha$  je v pankreatu iniciována brzy po vzniku diferencovaných  $\beta$ -buněk (Hansen S. K. et al., 2002). Po celý jejich život pak HNF-1 $\alpha$  hraje centrální úlohu v regulaci jejich růstu a funkce.

HNF-1 $\alpha$  se v  $\beta$ -buňce spolu s ostatními transkripčními faktory transkripční regulační sítě podílí zejména na řízení transportu a intracelulárním metabolismu glukózy (Stoffel M. & Duncan S. A., 1997), jež jsou nutnou podmínkou ke spuštění sekrece inzulínu po glukózovém stimulu. Porucha funkce HNF-1 $\alpha$  v pankreatických  $\beta$ -buňkách a s ní spojená abnormální genová regulace vede ke komplexní poruše metabolické signalizace inzulínové sekrece a také růstu  $\beta$ -buněčné hmoty. Intracelulární děje v  $\beta$ -buňce jsou narušeny hned na několika úrovních: *a*) je snížen přívod glukózy do  $\beta$ -buňky, čímž klesá úroveň glykolýzy; *b*) přímým účinkem na enzymatickou glykolytickou a oxidační (mitochondriální) kaskádu dochází k poruše intracelulárních metabolických pochodů glukózy resultující v pokles tvorby ATP, tj. v neschopnost navýšit tvorbu ATP po expozici glukózou; *c*) snižuje se schopnost adaptivní reakce na hyperglykémii (tj. možnost reagovat hyperplázií a hypertrofií); *d*) snižuje se exprese dalších tkáňových faktorů regulačního transkripčního okruhu (HNF-4 $\alpha$ , IPF-1/PDX-1 a NeuroD1), čímž se rozruší celá transkripční  $\beta$ -celulární síť; *e*) snižuje se syntéza inzulínu; *f*) klesá obsah intracelulárního kalcia a úroveň degranulace inzulínových zásobních granulí; *g*) pravděpodobně vede k indukci apoptózy  $\beta$ -buněk a redukci celkové hmoty  $\beta$ -buněk (Wang H. et al., 2000; Shih D. et al., 2001; Pelikánová T. a kolektiv, 2007).

Za popsanou dysregulaci inzulínové sekrece stojí porucha exprese více než 20 genů zapojených do glykolýzy, oxidativní fosforylace a mitochondriálního metabolismu, konkrétně nedostatečná exprese genů kódující glukózový transportér GLUT-2 (umožňující vstup glukózy z krve do  $\beta$ -buněk), enzymy glykolytické kaskády (glukokinázy, pyruvát kinázy atd.) a enzymy mitochondriální (2-oxoglutarát dehydrogenáza aj.). Podstatné množství takových genů je přímými cíli HNF-1 $\alpha$ , některé mohou být pravděpodobně down-regulovány v důsledku nepřímých účinků (Servitja J. M. et al., 2009).

U myši s knockoutovaným *hnf1a* (*hnf-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>*) dochází již pár dní po narození k rozvoji závažné hyperglykémie, resp. k diabetes mellitus, nezávislého na podávání exogenního inzulínu (Lee Y. H. et al., 1998). Podkladem vzniku cukrovky je výše popsaná porucha  $\beta$ -celulární glykolytické signalizace a defektní glukózou-indukované inzulínové sekrece (Dukes I. D. et al., 1998; Lee Y. H. et al., 1998; Pontoglio M. et al., 1998).  $\beta$ -buňky *hnf-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>* myši mají také nižší obsah inzulínu, jež lze částečně vysvětlit poruchou transkripce genu pro inzulín. Přepis inzulínového genu však není zcela suprimován, jelikož se na něm podílí také jiné transkripční faktory (Lee Y. H. et al., 1998; Pontoglio M. et al., 1998).

Heterozygotní mutace *hnf-1a* u myši (simulující situaci u lidských jedinců) ke vzniku diabetu nevede. *Hnf-1 $\alpha$ <sup>+/-</sup>* myši mají glykémii naprosto normální (Dukes I. D. et al., 1998; Pontoglio M. et al., 1998). Jako vhodnější model k porozumění molekulárních mechanismů, jakými mutace v *HNF1A* u lidských pacientů podmiňují vznik diabetu, se jeví buď INS-1 buňky nebo transgenní myši over-exprimující přirozeně se vyskytující dominantně-negativní HNF-1 $\alpha$  mutaci P291fsinsC, tzv. P291fsinsC-HNF-1 $\alpha$  transgenní myši (Yamagata K. et al., 2002). U nich se tak jako u pacientů s *HNF1A*-MODY postupně rozvíjí porucha glukózou stimulované inzulínové sekrece (Yang Q. et al., 2002). Diabetes je u těchto zvířat sice závažnější, než u myši s knockoutovaným *hnf1a*, ale nevzniká u nich žádná porucha jaterních a renálních funkcí, tak jako u *hnf1a<sup>-/-</sup>* myši (Pontoglio M. et al., 1996).

U lidských jedinců je homozygotní mutace s životem neslučitelná a nebyla u lidí popsána (Černá M. et al., 2013). Heterozygotní mutace naopak vede k postupné deterioraci  $\beta$ -buněčné funkce (Pearson E. R. et al. 2001), rezultující v diabetes mellitus (*HNF1A-MODY*) v období adolescence nebo časně dospělosti (Fajans S. S. et al., 2001).

Heterozygotní mutace v *HNF1A* vedou ke vzniku diabetu jednak v důsledku *haploinsuficience*, kdy exprese jediné alely v  $\beta$ -buňce nestačí zajistit plnou funkci proteinu a jednak *dominantně-negativním účinkem*, kdy mutovaná alela poškodí i alelu druhou [tvorbou nefunkčního dimeru s wild-type HNF-1 $\alpha$ ] (Ellard S. & Colclough K., 2006). Následkem je porucha metabolické signální dráhy glukózy v  $\beta$ -buňce (Pontoglio M. et al., 1998) vedoucí k poruše inzulínové sekrece na glukózový stimulus.

Kromě poruchy funkce  $\beta$ -buněk byla u pacientů s *HNF1A-MODY* zjištěna také porucha glukagonové sekrece svědčící o dysfunkci  $\alpha$ -buněk (Yoshiuchi I. et al., 1999) a sekrece pankreatického polypeptidu (Fajans S. S. et al., 2001).

- *Porucha funkce HNF-1 $\alpha$  a buněčný cyklus – neblahý osud  $\beta$ -buňky*

Regulací buněčného cyklu ovlivňuje HNF-1 $\alpha$  také růst buněk. V Langerhansových ostrůvcích a játrech je ovšem výsledný efekt protichůdný (Servitja J. M. et al., 2009). V  $\beta$ -buňkách, kde je vliv na buněčný cyklus nejlépe dokumentovaný, se prakticky většina, ne-li všechny *MODY* geny uplatňují jako důležité anti-apoptotické faktory (Johnson J. D., 2007). HNF-1 $\alpha$  se konkrétně podílí jak na regulaci apoptózy, tak na regulaci proliferace  $\beta$ -buněk. Studie provedené na zvířecích modelech *HNF1A-MODY* doložila, že knockout *HNF1A* nebo exprese dominantně negativní mutace *HNF1A* (DN-*HNF1A*) jednak snižuje rychlost  $\beta$ -buněčné proliferace a jednak činí tyto buňky citlivější k apoptóze, čímž redukuje celkovou  $\beta$ -buněčnou masu (Pontoglio M. et al., 1998; Hagenfeldt-Johansson K. A. et al., 2001; Yamagata K. et al., 2002; Wobser H. et al., 2002; Wobser H. et al., 2006; Bonner C. et al., 2010).

Zcela opačný účinek má HNF-1 $\alpha$  v játrech (Servitja J. M. et al., 2009). Deficience *HNF1A* v hepatocytech, na rozdíl od  $\beta$ -buněk, způsobuje nárůst exprese regulačních genů proliferace (mitózy) a buněčného cyklu (např. genů kódující cykliny).

Myši s knockoutovaným *hnf1a* (*hnf1a*<sup>-/-</sup>) mají malé pankreatické ostrůvky, snížený poměr  $\beta$ - a non $\beta$ - ( $\alpha$ ) buněk (Pontoglio M. et al., 1998; Lee Y. H. et al., 1998; Wobser H. et al., 2002) a vzhledem ke stupni hyperglykémie neadekvátní množství  $\beta$ -buněčné masy (Pontoglio M. et al., 1998). Takové množství  $\beta$ -buněk ovšem může korelovat s výrazně sníženým množstvím svalové hmoty a velikostí takových myší (Pontoglio M. et al., 1998). Po adjustaci na tělesnou hmotnost nemusí být  $\beta$ -buněčná masa výrazně změněna (Yamagata K. et al., 2002), ale spíše může reflektovat nedostatečnou schopnost akcelarovat rychlost proliferace při hyperglykémii (Pontoglio M. et al., 1998).

Transgenní myši over-exprimující v  $\beta$ -buňkách dominantně negativní HNF-1 $\alpha$  mutantu mají ve skutečnosti významně redukovanou  $\beta$ -celulární masu i sníženou rychlost proliferace  $\beta$ -buněk (Yamagata K. et al., 2002; Hagenfeldt-Johansson K. A. et al., 2001; Yang Q. et al., 2002). V případě P291fsinC-HNF-1 $\alpha$ -transgenních myší [modelů exprimující přirozeně se vyskytující dominantně-

negativní formu lidského HNF-1 $\alpha$  (P291fsinsC) v pankreatických  $\beta$ -buňkách], které nejsou výrazně růstově retardované, jsou rozdíly v  $\beta$ -buněčné masě signifikantní i po adjustaci na tělesnou hmotnost (Yamagata K. et al., 2002). Pokles proliferace (dosahující 15%) se snížením počtu  $\beta$ -buněk (až o 50%) progreduje se stářím transgenních myší (Yamagata K. et al., 2002).

Příčiny těchto změn jsou pravděpodobně komplexní. Při deficitu HNF-1 $\alpha$  zřejmě dochází k ovlivnění exprese řady regulačních proteinů buněčného cyklu, včetně receptorů pro růstové faktory, ligandy, transdukční regulátory a regulační proteázy, z nichž některé jsou přímými cíli HNF-1 $\alpha$  (Servitja J. M., 2009). Analýzou růstu inzulin secernujících buněk (INS-1) over-exprimujících dominantně negativní mutaci P291fsinsC bylo zjištěno, že dochází k zastavení buněčného cyklu v přechodu z G1 do S-fáze vlivem snížení exprese cyklinu E (regulační podjednotky cyklin-dependentních kináz, zodpovídajících za přechod z G1 do S-fáze) a zvýšením exprese inhibitoru buněčného cyklu p27 (Yang Q. et al., 2002). Tato studie navíc ukázala, že HNF-1 $\alpha$  rozhoduje o řízení růstu pankreatických  $\beta$ -buněk prostřednictvím regulace transkripce *IGF-1* genu (kódující IGF-1 – hlavní růstový faktor  $\beta$ -buněk, jehož exprese je v pankreatických ostrůvcích down-regulována).

V experimentu na INS-1 buňkách bylo také prokázáno, že se HNF-1 $\alpha$  účastní řízení exprese genů zapojených do regulace apoptózy (Wobser H. et al., 2002). Inhibice exprese HNF-1 $\alpha$  cílových genů (dominantně negativní supresí HNF-1 $\alpha$ ) vede k *aktivaci evolučně konzervované cesty apoptotické buněčné smrti* prostřednictvím změn genové exprese a mitochondriální funkce (Wobser H. et al., 2002). Během 48 hodin po supresi funkce HNF-1 $\alpha$  dochází k uvolnění cytochromu C z mitochondrií, aktivaci iniciační kaspázy-9 a exekutorové kaspázy-3, odsuzující buňky k apoptotické buněčné smrti. Aktivaci kaspáz předchází hyperpolarizace mitochondrií a pokles exprese anti-apoptotického proteinu Bcl-xL – proteinu lokalizovaného v mitochondriální membráně, kde primárně inhibuje uvolnění faktorů aktivujících proapoptotické kaspázy (např. cytochromu C) z mitochondriálního mezimembránového prostoru do cytosolu, jenž spouští a akcelerují tvorbu apoptosomu a aktivaci kaspáz (Wobser H. et al., 2006). Zajímavé je, že jak u wild-type-HNF-1 $\alpha$ -exprimujících tak u dominantně-negativní-HNF-1 $\alpha$ -exprimujících buněk vedla kultivace v 25 milimolárním roztoku glukózy k podobnému nárůstu apoptózy. U buněk s dominantně-negativní supresí HNF-1 $\alpha$  však navíc došlo k vysoké senzitivizaci k ceramidové toxicitě (ceramid je klíčový mediátor apoptózy indukované volnými mastnými kyselinami). Navíc i kultivace těchto buněk v roztoku glukózy o nízké koncentraci vedlo k up-regulaci inhibitoru buněčného cyklu p27<sup>KIP1</sup>.

Navzdory prokazatelnému úbytku funkční  $\beta$ -buněčné masy, ke kterému široce přispívá nárůst apoptózy (Pontoglio M. et al., 1998; Hagenfeldt-Johansson K. A. et al., 2001; Bonner C. et al., 2010), však zřejmě dochází souběžně ke vzniku nových  $\beta$ -buněk.  $\beta$ -buněčná masa je totiž ve skutečnosti výsledkem homeostatické rovnováhy mezi vznikem nových  $\beta$ -buněk a jejich apoptózou. Bonnerová et al. zjistili, že negativně-dominantní suprese *HNF1A* vede spolu s apoptózou INS-1 buněk k indukci exprese regenerativního *PSP/reg* genu (Bonner C. et al., 2010). *PSP/reg* je protein, jenž stimuluje proliferaci  $\beta$ -buněk a navyšuje jejich celkovou masu. Je fyziologicky sekretován v pankreatických acinárních buňkách, ale také je exprimován v pankreatických ostrůvcích při jejich poškození a regeneračních procesech. Apoptóze podléhající  $\beta$ -buňky mohou sekretovat tento faktor, jenž následně stimuluje expresi regenerativních genů a buněčnou proliferaci v sousedních buňkách a s určitou pravděpodobností usnadňovat obnovu  $\beta$ -buněčné masy. Jelikož se však *HNF1A*-*MODY* vyvíjí

v průběhu několika let nebo dekád, míra destrukce nebo apoptózy  $\beta$ -buněk pravděpodobně nakonec převýší rychlost vzniku nových buněk.

Zda je pokles proliferace a nárůst apoptózy  $\beta$ -buněk s redukcí  $\beta$ -buněčné hmoty přítomen také v případě konkrétních pacientů s *HNF1A*-MODY, není v současné době přímo prokázáno. Nicméně z typické klinické manifestace progresivní  $\beta$ -buněčné dysfunkce na ni lze nepřímo usuzovat. U pacientů s *HNF1A*-MODY dochází ke zhoršení glukózové tolerance po uplynutí první dekády života a dále progreduje do diabetu obvykle až v pozdním dětství, adolescenci či časně dospělosti (Hattersley A. T., 1998; Pearson E. R. et al., 2001; Ryffel, G. U., 2001). Při takto progresivním průběhu onemocnění se s největší pravděpodobností v patogenezi MODY neuplatňuje jen samotný defekt inzulinové sekrece, ale pravděpodobně také postupný zánik  $\beta$ -buněk (Frayling T. M. et al., 2001).

- *Porucha funkce HNF-1 $\alpha$  v ledvinách*

Deficit *HNF-1 $\alpha$*  v ledvinách způsobuje u myši drastické snížení reabsorpce některých metabolitů v proximálních tubulech (Pontoglio M. et al., 1996). Glomeruly přefiltrovaná glukóza, fosfát a některé specifické aminokyseliny (např. glukoplastická aminokyselina arginin) jsou nenávratně ztraceny močí. Glykosurie je klasicky provázena osmotickou diurézou se všemi jejími důsledky.

Porucha zpětné reabsorpce uvedených metabolitů je podmíněna selháním sekundárně aktivního transportu přes sodíko-glukózový ko-transportér *SGLT2* (sodium glucose transporter 2). *SGLT2* se nachází v iniciální části proximálního tubulu, kde je koncentrace glukózy ještě relativně vysoká a zodpovídá zde za vysokokapacitní nízkoafinitní transport glukózy. Gen pro *SGLT2* je cílovým genem *HNF-1 $\alpha$*  (Pontoglio M. et al., 2000) a jeho inaktivace u *hnf1*-deficitních myši významnou měrou snižuje kapacitu pro reabsorpci glukózy, fosfátů a argininu. *SGLT1* kódující stejnojmenný transportér je naopak u *HNF-1 $\alpha$*  deficientních myši exprimován normálně. Nadměrné ztráty glukózy do moči (dosahující až 1 g) lze u *hnf1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>* myši detekovat 2. až 5. den po narození, a to i při normoglykémii (Pontoglio M. et al., 1996).

Klinickým důsledkem masivních ztrát uvedených metabolitů je wasting syndrom (Pontoglio M. et al., 1996). Pokles energetické bilance, deplece vody a minerálů se projeví neprospíváním a poruchami růstu. Vlivem fosfaturie dochází k demineralizaci kostí. Deplece argininu se (zejména u hlodavců) projeví mírnou hyperamonémií (u savců se arginin uplatňuje v ureázovém cyklu méně).

Významným rysem *HNF-1 $\alpha$*  deficitu v ledvinách je také zřetelná redukce glomerulární filtrace (Pontoglio M. et al., 1996). Vzhledem k značné redukci svalové hmoty a také faktu, že prekurzorem kreatininu je arginin, nedochází současně k elevaci plasmatické koncentrace kreatininu.

Také u *HNF1A*-MODY pacientů je popsána snížená exprese *SGLT2* v proximálním tubulu (Pontoglio M. et al., 2000). Snížený renální práh pro glukózu se klinicky projeví glykosurií při relativně mírné hyperglykémii a selektivní aminoacidurií (Menzel R. et al., 1998). Tyto nálezy jsou pomocným diagnostickým a screeningovým kritériem *HNF1A*-MODY (Ellard S. et al., 2008).

- *Porucha funkce HNF-1α v gastrointestinálním traktu*

I když HNF-1α v diferencovaných enterocytech aktivuje expresi řady genů, o jeho funkci v intestinálním epitelu není mnoho známo. V experimentu na *hnf1<sup>-/-</sup>* myších modelech nevede samotná ztráta HNF-1α funkce na úrovni intestinálního traktu k žádné závažnější poruše (D'Angelo A. et al., 2010). Prokázána byla například jen porucha exprese biliárního transportéru (Slc10a2) v ileu, jenž vedla ke zvýšené fekální exkreci žlučových kyselin (Shih D. Q. et al., 2001).

Na druhou stranu současná inaktivace spolu s *hnf-1β* vede ke smrti během několika dnů z důvodů těžké dehydratace (D'Angelo A. et al., 2010). Příčinou je porucha exprese *Slc26a3*, kódující stejnojmenný aniontový výměník, jenž zajišťuje absorpci vody ve střevě. Mutace přímo tohoto genu je mimochodem zodpovědná za život ohrožující kongenitální formu chloridových průjmů u lidí (D'Angelo A. et al., 2010).

U pacientů s *HNF1A-MODY* není známá žádná související střevní patologie.

#### 1.2.4 Transkripční faktor HNF-4α

HNF-4α je člen rodiny nukleárních receptorů (NR)2A1, na ligandu-závislých transkripčních faktorů, jenž byl identifikován na základě své schopnosti vázat se na promotory specifických jaterních genů [pro transtyrelin u myši a lidský apolipoprotein CIII] (Sladek F. M. et al., 1990). HNF-4α je v mnoha ohledech v rodině nukleárních receptorů unikátní. Představuje jeden z nejvíce konzervovaných nukleárních receptorů, jenž lze nalézt prakticky v každém organismu (Sladek F. M. et al., 1990).

HNF-4α disponuje hned několika doménami. Jsou jimi dvě *transaktivační* domény s vazebnými místy [AF-1 (A/B doména) na N-konci a AF-2 na C-konci aminokyselinového řetězce]; *DNA-vazebná* doména (doména C), kterou tvoří dva zinkové prsty; dále *ligandová* doména (E), která vytváří hydrofobní kapsu; a dlouhá F doména na samotném C-konci aminokyselinového řetězce, obsahující krátkou represorovou oblast. Na C-konci se také nachází oblast nezbytná pro homodimerizaci (Bogan A. A. et al., 2000; Ryffel G. U., 2001; Wisely G. B. et al., 2002). S ligandovou doménou je asociovaná endogenní mastná kyselina, která je vsazena do vazebné kapsy po translaci, během skládání (foldingu) proteinu (Gonzales F. J., 2008). Tato vazba je reverzibilní, ovšem nebylo jednoznačně prokázáno, že by ovlivňovala transaktivační funkci proteinu (Bolotin E. et al., 2010).

Na promotory cílových genů se HNF-4α váže přes DNA-vazebnou doménu pouze jako homodimer, a to jen na kontrolní (response) elementy skládající se z přímých repetit [direct repeat-1 (DR-1)] (sladeklab.ucr.edu).

Gen pro HNF-4α (*HNF4A*) je lokalizován na dlouhém (q) raménku 20. chromosomu, zahrnuje 13 exonů a má dva promotory – P1 a P2 (Sujitjoo J. et al., 2008). Tyto promotory jsou během vývoje aktivovány v odlišných tkáních v různou dobu (Bolotin E. et al., 2010). Podle toho existuje devět známých splicingových variant (izoforem) tohoto genu s různým funkčním významem (Bogan A. A. et

al., 2000), jenž se liší transaktivační aktivitou (A/B domény), místem a časem své exprese (Bolotin E. et al., 2010).

HNF-4 $\alpha$  je exprimován již ve fetálním období ve viscerálním endodermu, postnatálně pak zejména v játrech (hepatocytech), a v menší míře také v pankreatu ( $\beta$ -buňkách a jiných částech ostrůvků), v ledvinách (proximálním tubulu) a v gastrointestinálním traktu [tenkém a tlustém střevě, žaludku] (Gonzalez F. J., 2008; Bolotin E. et al., 2010). V játrech se nachází transkripty HNF-4 $\alpha$  odvozené převážně z P1 (jaterně specifického) promotoru (Hansen S. K. et al., 2002), popřípadě z obou – P1 i P2 (Odom D. T. et al., 2004; Thomas H. et al., 2001). V pankreatu se naopak nachází transkripty odvozené výlučně z P2 (pankreatického specifického) promotoru (Odom D. T. et al., 2004; Thomas H. et al., 2001; Hansen S. K. et al., 2002). V hepatocytech jsou proto aktivní izofomy HNF4A1-6, v  $\beta$ -buňkách jsou exprimovány izofomy HNF4A7-9 (Černá M. et al., 2013). Postnatálně převažuje v játrech (a podobně v ledvinách) izoforma HNF4A2, v  $\beta$ -buňkách pankreatu jsou to izofomy HNF4A7/8. V tenkém střevě a tračníku jsou exprimovány izofomy HNF4A7/8 spolu s HNF4A1/2.

Expres *HNF4A*, resp. funkce HNF-4 $\alpha$ , může být regulována interakcí s řadou různých modifikačních enzymů a transkripčních faktorů, formováním komplexů s různými kofaktory nebo interakcí s jinými nukleárními receptory. I když informace o těchto regulačních mechanismech byly získány od různých živočišných druhů, je možné se vzhledem k vysoce konzervované struktuře a funkci HNF-4 $\alpha$  domnívat, že většina, ne-li všechny budou platné i u lidského HNF-4 $\alpha$  (Wisely G. B. et al., 2002; Gonzales F. J., 2008; Bolotin E. et al., 2010). HNF-4 $\alpha$  tak může být za určitých okolností regulován posttranslačními modifikacemi, např. fosforylací, acetylací či metylací, které mají na funkci HNF-4 $\alpha$  různý efekt.

Mezi transkripční faktory, které regulují expresi *HNF4A* patří HNF-1 $\alpha$  (Hansen S. K. et al., 2002) a IPF-1 [neboli PDX-1] (Thomas, H. et al., 2001). HNF-4 $\alpha$  funguje s HNF-1 $\alpha$  a IPF-1/PDX-1 ve vzájemně se ovlivňujícím regulačním okruhu (Hansen S. K. et al., 2002). Transkripci HNF-4 $\alpha$  v pankreatu aktivuje HNF-1 $\alpha$  přes P2 promotor *HNF4A*, HNF-4 $\alpha$  pak aktivuje *HNF1A* transkripci (Pearson E. R. et al., 2005). Na promotoru P2 *HNF4A* existuje regulační vazebné místo také pro IPF-1/PDX-1 a naopak (Hansen S. K. et al., 2002). Předpokládá se, že prostřednictvím těchto přímých zkřížených regulačních interakcí mezi sebou HNF-1 $\alpha$  a HNF-4 $\alpha$  vytvářejí v  $\beta$ -buňkách regulační (vzájemně závislostní) smyčku, se zpětnou (pozitivní) kontrolou, zodpovídající za konečný fenotyp pankreatických  $\beta$ -buněk (Ferrer J., 2002; Odom D. T. et al., 2004). Haploinsuficience jednoho z těchto centrálních transkripčních faktorů pak vede k rozpadu této regulační smyčky a konečně ke vzniku diabetes mellitus (Ferrer J., 2002). To vysvětluje velmi podobnou klinickou prezentaci *HNF1A*-MODY a *HNF4A*-MODY.

V játrech je transkripce řízena především přes P1 promotor *HNF4A* (Hansen S. K. et al., 2002), který neobsahuje vazebné místo pro HNF-1 $\alpha$ . Zmíněná regulační smyčka v játrech zřejmě hraje méně významnou roli než v případě pankreatu, což by zase mohlo vysvětlovat odlišný „jaterní“ fenotyp (např. lipidový metabolismus), patrný mezi pacienty s *HNF1A*-MODY a *HNF4A*-MODY (Pearson E. R. et al., 2005).



Provázanost obou těchto transkripčních faktorů se však liší nejen v jednotlivých tkáních, ale též v různých vývojových obdobích (Servitja J. M. & Ferrer J., 2004), i mezi živočišnými druhy. HNF-4 $\alpha$  je jednoznačně potřebný pro expresi *HNF1A* ve fetálních játrech a viscerálním endodermu (Stoffel M. & Duncan S. A., 1997; Li J. et al., 2000; Hayhurst G. P. et al., 2001), ne však v adultních játrech [exprese *Hnf1a* v adultních *HNF4A*-null hepatocytech není narušena (Gonzalez F. J., 2008)] ani v adultních  $\beta$ -buňkách [pro expresi *HNF1A* v adultních  $\beta$ -buňkách není HNF-4 $\alpha$  vůbec potřebný (Gupta R. K. et al., 2005)].

HNF-4 $\alpha$  nemá ligand, který by jej způsobem typickým pro nukleární receptory, aktivoval změnou jeho konformace (např. uvolněním ko-represorů a vazbou ko-aktivátorů). Na rozdíl od mnoha jiných nukleárních receptorů, neexistuje v případě HNF-4 $\alpha$  přesvědčivý důkaz o jeho aktivaci exogenním ligandem (Gonzales F. J., 2008). Pro HNF-4 $\alpha$ , lokalizovaného pouze v buněčném jádře, je naopak příznačné, že může aktivovat genovou transkripci a vázat hned několik různých ko-aktivátorů bez přítomnosti exogenního ligandu. HNF-4 $\alpha$  je však aktivován endogenním ligandem (Wisely G. B. et al., 2002). Trvalo více než 20 let, než byl tento endogenní ligand identifikován. Nyní víme, že fyziologicky exprimovaný HNF-4 $\alpha$  váže jednu endogenní esenciální mastnou kyselinu – kyselinu linolovou, která je pevně navázána na ligandovou doménu a pravděpodobně sama postačuje k iniciaci interakce tohoto nukleárního receptoru s ko-aktivátory a spuštění transkripce (Yuan X. et al., 2009; Bolotin E. et al., 2010). Jakmile se translatovaný HNF-4 $\alpha$  pevně naváže na endogenní mastnou kyselinu v buňce, získává spontánně transkripčně aktivní konformaci. Po té funguje jako konstitutivně aktivní transkripční faktor (Wisely G. B. et al., 2002). Ihned po vazbě na DNA nabírá ko-aktivátory [CREP (CBP), SRC-1 a GRIP1] a spolu s dalšími proteiny pozitivně reguluje expresi cílových genů (Gonzales F. J., 2008). Na mnoho vazebných míst pro HNF-4 $\alpha$  se mimochodem váží také jiné nukleární receptory (např. PPAR), pro něž je tak mnoho genů společných (Bolotin E. et al., 2010).

Mutací změněný protein HNF-4 $\alpha$  ztrácí schopnost vázat se k DNA a zpustit transkripci (Černá M. et al., 2013). Dysfunkční protein je rychle exportován do cytoplazmy a degradován.

HNF-4 $\alpha$  hraje důležitou roli v časném embryonálním vývoji a v organogenezi, postnatálně se podílí na udržení metabolické homeostázy (Hayhurst G. P. et al., 2001; Yuan X. et al., 2009). Během intrauterinního období zodpovídá za normální funkci viscerálního endodermu a následně za strukturální a funkční diferenciaci hepatocytů (Chen W. S. et al., 1994; Li J. et al., 2000) a střevních buněk (Boyd M. et al., 2009). Knockout *HNF4A* u myši vede vlivem dysfunkce viscerálního endodermu k selhání gastrulace a předčasné smrti embrya (Chen W. S. et al., 1994; Duncan S. A. et al., 1997). Analyzovat význam HNF-4 $\alpha$  *in vivo* v dalším vývojovém období umožňují pokusy s tkáňově-specifickým knockoutem *HNF4A* v játrech, pankreatických  $\beta$ -buňkách a tračníku. Ve fetálních játrech je HNF-4 $\alpha$  dominantním regulátorem počáteční epiteliální transformace hepatocytů, tedy normální jaterní architektiky, a terminální diferenciaci hepatocytů (Bolotin E. et al., 2010; Li J. et al., 2000; Parviz F. et al., 2003). V hierarchii komplexní transkripční sítě (zahrnující další HNF a nukleární receptory) stojí v tomto období v jejím centru (Yuan X. et al., 2009; Bolotin E. et al., 2010) a jeho exprese předčívá expresi jak HNF-1 $\beta$ , tak HNF-1 $\alpha$  (Ryffel G. U., 2001).

V utvořených tkáních se významně uplatňuje v řízení buněčného metabolismu, aktivuje expresi stovek genů, kódujících zejména metabolické enzymy. Svou roli plní také v lékovém

metabolismu, hemokoagulaci či inzulínové sekreci (Bogan A. A. et al., 2000; Odom D. T. et al., 2004; Stoffel M. & Duncan S. A., 1997). Se zavedením celogenomových technik bylo nalezeno přes tisíc další potencionálních cílů tohoto transkripčního faktoru. Využití integrovaného přístupu a protein binding microarrays (PBM) umožnilo identifikovat na 240 nových přímých lidských cílových genů HNF-4 $\alpha$  v mnoha dalších funkčních oblastech, a to i těch, které doposud nebyly s HNF-4 $\alpha$  typicky spojovány [např. buněčný cyklus a apoptóza, imunitní funkce atd.] (Bolotin E. et al., 2010).

V **játrech** HNF-4 $\alpha$  zajišťuje především expresi klíčových genů energetického metabolismu sacharidů, tuků a bílkovin. Mezi produkty těchto genů patří glukózové transportéry (GLUT2), enzymy glykolýzy (jaterní pyruvát kináza, aldoláza B) a jaterní glukoneogeneze (fosfoenolpyruvát karboxykináza), lipidového metabolismu, apolipoproteiny (ApoAII a ApoCIII) nebo sérové proteiny [ $\alpha$ -fetoprotein, transtyrelin, transferin] (Cardot P. et al., 1991; Miquerol L. et al., 1994; Stoffel M. & Duncan S. A., 1997; Yoon J. C. et al., 2001; Watt A. J. et al., 2003).

Zajímavá je role HNF-4 $\alpha$  v lékovém metabolismu (Kamiyama Y. et al., 2007). Pomocí vektorového adenovirového systému suprimující *HNF4A* expresi v lidských hepatocytech, byl zjištěn signifikantní pokles exprese mnoha enzymů a transportérů nezbytných pro metabolismus řady exogenních a endogenních látek. Patří mezi ně cytochromový P450 (CYP) systém, UDP-glukuronosyltransferáza (UGT1A1), sulfotransferáza (SULT2A1), ATP-binding cassette transportér (ABCB11 a ABCC2), organic anion transporting polypeptide (OATP1B1) a ornitin-transkarbamyláza (OCT1). Jako přímý transaktivátor genů cytochromového systému P450 může HNF-4 $\alpha$  jejich prostřednictvím snadno ovlivňovat lékovou aktivitu (Gonzalez F. J., 2008). Pro lékový metabolismus má zásadní význam regulace exprese CYP2A6 a CYP3A4, jenž zpracovávají až polovinu předepisovaných léčiv (Watt A. J. et al., 2003)]. Variabilní exprese HNF-4 $\alpha$  v játrech může u lidských jedinců přispívat k interindividuální variabilitě transkripce metabolizujících genů a clearens širokého spektra běžně předepisovaných a dostupných léčiv (Kamiyama Y. et al., 2007).

HNF-4 $\alpha$  se také podílí na homeostáze hemokoagulačního systému, a to zajištěním konstitutivní exprese genů kódujících koagulační faktory (Inoue Y. et al., 2006). Analýzou promotorů myších *FXII* a *FXIIB* genů bylo prokázáno, že HNF-4 $\alpha$  přímo reguluje transkripci stejnojmenných koagulačních faktorů. Jaterně-specifické *HNF4A*-null myši mají sníženou expresi jaterních koagulačních faktorů V, IX, XI, XII a XIII B a prodloužený aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT).

V **pankreatu** řídí HNF-4 $\alpha$  genovou expresi především v  $\beta$ -buňkách, v menší míře pak také v  $\alpha$ -buňkách pankreatu, kde zodpovídá za glukózovou homeostázu v organismu. V  $\beta$ -buňkách je důležitý pro transport a intracelulární metabolismus glukózy a následnou sekreci inzulínu (Stoffel M. & Duncan S. A., 1997), v  $\alpha$ -buňkách zřejmě pro sekreci glukagonu.  $\beta$ -celulární-specifický knockout HNF-4 $\alpha$  vede k selhání inzulínové sekrece a vzniku diabetu (Bolotin E. et al., 2010).

Spektrum konkrétních cílových genů a jim odpovídajících bílkovinných produktů je v pankreatu podobný jako u HNF-1 $\alpha$  (Stoffel M. & Duncan S. A., 1997; Wang H. et al., 2000). Tento fakt reflektuje přítomnost  $\beta$ -buněčné transkripční sítě s reciproční regulací HNF-1 $\alpha$  a HNF-4 $\alpha$  (Pearson E. R. et al., 2005). HNF-1 $\alpha$  a HNF-4 $\alpha$  mohou přímo obsazovat promotory cílových genů jeden druhého [a

to nejen v pankreatických ostrůvcích, ale i v hepatocytech] (Odom D. T. et al., 2004; Boj S. F. et al., 2001). HNF-4 $\alpha$  tedy může v  $\beta$ -buňkách řídit genovou expresi i nepřímo, skrze regulaci exprese HNF-1 $\alpha$  (Ferrer J., 2002; Wang H. et al., 2000) a naopak. K takovým cílovým genům patří např. gen pro inzulin, jehož transkripci řídí HNF-4 $\alpha$  přímo i nepřímo [přes HNF-1 $\alpha$ ] (Bartoov-Stifman R. et al., 2002).

V **ledvinách** HNF-4 $\alpha$  zajišťuje expresi *TRPC1* genu (transient receptor potential cation channel C1), kódujícího neselektivní kationtový kanál propustný pro kalcium *TRPC1* a *PLCB1* genu (phospholipase C beta 1), jenž kóduje  $\beta$ 1 izoformu fosfoinozitol-specifické fosfolipázy C *PLCB1* (Niehof M. & Borlak J., 2008). *TRPC1* se nachází v glomerulárních mesangiálních buňkách, kde se podílí na zajištění jejich kontraktálních schopností, a tedy fyziologické regulaci glomerulární hemodynamiky a filtrace. *PLCB1* se podílí na buněčné komunikaci a signální transdukcii a je důležitý pro buněčnou proliferaci a diferenciaci (Niehof M. & Borlak J., 2008).

K dalším cílovým genům HNF-4 $\alpha$  v ledvinách patří také *RSK4* (ribosomální S6 kináza 4) a *PAK5* (p-21 aktivovaná kináza 5) kódující stejnojmenné kinázy, jež participují v regulaci buněčného cyklu (nepřímo potlačují jeho progresi). HNF-4 $\alpha$  se zřejmě uplatňuje při kontrole buněčné proliferace jako represor buněčného cyklu, jenž umožňuje buněčnou diferenciaci (Niehof M. & Borlak J., 2005). V tkáních mozku a ledvin STZ-diabetických krys (STZ – streptozocinem indukovaný diabetes) byla mimochodem zjištěna signifikantní represe HNF-4 $\alpha$  spolu s *RSK4* a *PAK5* kinázami, což může být logickým molekulárním odůvodněním pozdních diabetických komplikací (neuropatie a nefropatie) často přítomných u pacientů s HNF-4 $\alpha$  dysfunkcí (Niehof M. & Borlak J., 2005).

HNF-4 $\alpha$  také zastává důležitou úlohu ve vývoji a terminální diferenciaci epiteliálních buněk **tlustého a tenkého střeva**, a podílí se mimo jiné na zajištění jejich unikátních transportních a metabolických funkcí (Boyd M. et al., 2009). HNF-4 $\alpha$ -stimulovaná diferenciacie epiteliálních střevních buněk vede k tvorbě těsných epiteliálních bariér, tj. de novo formaci buněčných spojů typu tight junctions, přispívající k buněčné epiteliální polaritě (Chiba et al., 2003; Darsigny M. et al., 2009). Tímto je v diferencovaném epitelu umožněn metabolismus živin, iontová selektivita a vytvořena ochranná bariéra proti nejružnějším patogenům (Darsigny M. et al., 2009)].

Podobně jako v případě HNF-1 $\alpha$ , je aplikace poznatků z experimentálních modelů na lidské pacienty obtížná. Nálezy mezi jednotlivými experimentálními modely se někdy v mnoha zásadních aspektech (jako je profil cílových genů a s nimi souvisejících patologických odchylek, např. vznik diabetu) odlišují.

#### *Porucha funkce HNF-4 $\alpha$*

Dysfunkce HNF-4 $\alpha$  je přímo spojena s několika lidskými chorobami. Heterozygotní mutace v kódující oblasti a promotoru *HNF4A* vede ke vzniku MODY diabetu (Yamagata K. et al., 1996). *HNF4A-MODY* je charakterizovatelný poruchou glukózou-stimulované sekrece inzulinu a navíc sníženou triglyceridemií (Shih D. Q. et al., 2000). Naopak mutace ve vazebných místech pro HNF-4 $\alpha$  v promotorových oblastech koagulačních faktorů podmiňuje určité typy hemofilie (chorob se zvýšenou krvácivostí) – *hemofilie B* (Reijnen M. J. et al., 1992). Pojí se také s *virovou infekcí hepatitidy B*, jelikož HNF-4 $\alpha$  je potřebný pro virovou replikaci v hepatocytech (Quasdorff M. et al., 2008).

Vzhledem k tomu, že v játrech také reguluje expresi většiny, ne-li všech genů pro apolipoproteiny, jsou běžné varianty v *HNF4A* asociovány s *metabolickým syndromem* (Weissglas-Volkov D. et al., 2006). Polymorfismy v *HNF4A* genu a také snížená hladina mRNA a proteinu HNF-4 $\alpha$  v tračníku, byla též asociována s *IBD* (Inflammatory Bowel Disease) a *Crohnovou chorobou* (Marcil V. et al., 2012). Prostřednictvím dalších cílových genů je HNF-4 $\alpha$  také potencionálně spjat s *aterosklerózou* a *nádorovým bujením* (Bolotin E. et al., 2010; Tanaka T. et al., 2006).

- *Porucha funkce HNF-4 $\alpha$  v játrech*

Porucha funkce HNF-4 $\alpha$  v játrech je spjata zejména s poruchou lipidového metabolismu. Absence HNF-4 $\alpha$  v játrech vede k značné metabolické dysregulaci, spojené se zvýšenou mortalitou (Hayhurst G. P. et al., 2001). Analýzou dospělých myších s jaterně-specifickým knockoutem *HNF4A*, bylo zjištěno, že je HNF-4 $\alpha$  nenahraditelný především v konstitutivní expresi několika zásadních jaterních genů lipidového transportu a metabolismu (Hayhurst G. P. et al., 2001). Deficit HNF-4 $\alpha$  v játrech vede k nedostatečné expresi genů potřebných pro VLDL sekreci z jater [*ApoB* (apolipoprotein B) a *Mttp* (microsomal triglycerid transfer protein)] a naopak zvýšené expresi genů zajišťující uptake esterů cholesterolu z HDL do jater [*Scarb1* (SR-BI – scavenger receptor třídy B typ I)]. U takto postižených dospělých myší typicky dochází ke snížení sérové hladiny celkového cholesterolu, HDL a triglyceridů, postupné intrahepatální akumulaci lipidů (jaterní steatóze) a abnormálnímu ukládání glykogenových deposit, provázenou jaterní hypertrofií. Plasmatický lipidový profil *HNF4A*-null myší je také charakterizovatelný sníženou hladinou apolipoproteinů téměř všech tříd (ApoA-II, ApoA-IV, Apo-B, ApoC-II, ApoC-III).

Kromě vlivu na lipidový metabolismus se jaterně-specifický knockout *HNF4A* projeví také vzestupem sérové hladiny žlučových kyselin a amoniaku. K poruše homeostázi žlučových kyselin dochází jednak vlivem nízké exprese enzymů metabolizujících žlučové kyseliny [konjugačních enzymů BAT (bile acid-CoA:amino acid *N*-acyltransferase) a VLACS (very long chain acyl-CoA synthase), enzymů uplatňujících se v hydroxylaci a  $\beta$ -oxidaci CYP7A1 nebo CYP8B1], a jednak neschopností efektivně vychytávat žlučové kyseliny z krve [poruchou exprese transportérů žlučových kyselin – NTCP (sodium taurocholate cotransporter polypeptide) a OATP1 (organic anion transporter polypeptide 1)] (Inoue Y. et al., 2004; Inoue Y. et al., 2006; Hayhurst G. P. et al., 2001). Hyperamonémie je podmíněná sníženou expresí *OTC* [genu pro jaterní ornitin transkarbamylázu] (Inoue Y. et al., 2002).

Haploinsuficience HNF-4 $\alpha$  u pacientů s heterozygotní mutací v *HNF4A* (*HNF4A-MODY*) je jednoznačně asociována s abnormalitami lipidového metabolismu. Konkrétní nálezy z lidských studií týkající se účinku ztráty funkce HNF-4 $\alpha$  na jaterní metabolismus lipidů jsou leckdy protichůdné, nicméně konzistentním nálezem z myších, buněčných i lidských studií je snížená sérová koncentrace apolipoproteinů ApoAII, ApoCIII, triglyceridů, ev. lipoproteinů a (Pearson E. R. et al., 2005; Shih D. Q. et al., 2000). Snížená exprese apolipoproteinů vede ke snížení aktivity lipoproteinové lipázy a tím ke snížení plasmatické koncentrace triglyceridů. Vlivem snížené hladiny triglyceridů a lipoproteinů a, mohou mít nositelé *HNF4A* mutace mírně nižší riziko kardiovaskulárních chorob (Shih D. Q. et al., 2000). Sekundárně vlivem nízké hladiny apolipoproteinů ApoAII zřejmě dochází také k poklesu HDL, jenž lze pozorovat u některých nositelů *HNF4A* mutace (Pearson E. R. et al., 2005). Uvedené poruchy

v lipidovém metabolismu nejsou závislé na porušené glukózové homeostázi, objevují se totiž u HNF4A-MODY pacientů ještě před rozvojem hyperglykémie (Shih D. Q. et al., 2000). Snížené hladiny apolipoproteinů ApoAII, ApoCIII a zejména triglyceridů je využíváno v diferenciální diagnostice MODY a diabetes mellitus 2. typu, i k odlišení (jinak fenotypicky blízkého) HNF1A-MODY.

Sérová hladina některých dalších lipidů a plasmatických bílkovin, jejichž kódující geny jsou (na základě poznatků z experimentálních studií) pod kontrolou HNF-4 $\alpha$  (např. apolipoprotein AI, apolipoprotein B,  $\alpha$ 1-antitrypsin, transferin, IGFBP-1 a dalších) u těchto pacientů sníženy nejsou.

V lidských hepatocytech byla také prokázána dominantní role HNF-4 $\alpha$  v expresi transportérů a enzymů metabolizujících léčiva (Kamyama Y. et al., 2007). S alterací transkripční aktivity HNF-4 $\alpha$  a následné deficeince jaterního cytochromu P450 může být asociovaná narušená léková clearance. V naší další studii se zabýváme otázkou, zda HNF1A/HNF4A mutace asociovaná s MODY vyvolává snížení clearance derivátů sulfonylurey (vlivem down-regulace CYP2C9), čímž prodlužuje jejich působení a zřejmě podněcuje hypersenzitivitu MODY pacientů k derivátům sulfonylurey (Urbanová J. et al., 2015).

- *Porucha funkce HNF-4 $\alpha$  v pankreatu*

Mutace v HNF4A jsou asociovány s abnormální sekrecí inzulínu i glukagonu (Herman W. H. et al., 1997). Komplexní porucha inzulínové sekrece se klinicky projevuje poruchou glukózové homeostázi, gradující postupně až v diabetes mellitus (HNF4A-MODY).

Funkční analýza jedné ze známých HNF4A mutací (Q268X) prokázala, že vznik zkráceného HNF-4 $\alpha$  proteinu vedoucí ke kompletní ztrátě jeho funkce, je spojen s poruchou exprese genů glukózového transportu a glykolýzy, které jsou zodpovědné jednak za vychytávání glukózy z enterohepatální cirkulace a jednak za spuštění inzulínové sekrece v  $\beta$ -buňkách pankreatu (Stoffel M. & Duncan S. A., 1997).

K selhání sekrece inzulínu zřejmě přispívá také dysfunkce mitochondrií. U INS-1 buněk exprimujících dominantně-negativní Hnf-4 $\alpha$  mutantu bylo prokázáno snížení oxidace pyruvátu a porucha hyperpolarizace mitochondriální membrány evokované substrátem, jenž oslabuje buněčnou produkci ATP a tudíž i sekreci inzulínu indukované glukózou (Wang H. et al., 2000).

U myší se specifickým  $\beta$ -celulárním knockoutem Hnf4 $\alpha$  byla překvapivě prokázána také hyperinzulinémie nalačno a postprandiálně, kterou lze částečně vysvětlit snížením transkripce genu pro Kir6.2 podjednotku K<sub>ATP</sub>-kanálu (Gupta R. K. et al., 2005). Nálezy se nicméně markantně liší mezi použitými zvířecími modely s Hnf-4 $\alpha$  knockoutem.

Homozygotní mutace HNF4A není u lidí slučitelná se životem. Heterozygotní mutace HNF4A se na úrovni pankreatu vlivem poruchy inzulínové sekrece projeví postupnou poruchou glukózové homeostázi, rezultující v diabetes mellitus obvykle mezi 20. - 40. rokem života (Yamagata K. et al., 1996).

U některých kojenců nesoucích heterozygotní *HNF4A* mutaci se ovšem po narození paradoxně rozvíjí tranzientní (hyperinzulinemická) hypoglykémie, provázená makrosomií [vyšší porodní hmotností] (Pearson E. R. et al., 2007). Na základě analogických nálezů hyperinzulinémie z experimentálních studií se předpokládalo, že mutace v lidském *HNF4A* genu může ve fetálních  $\beta$ -buňkách (dosud nejasným mechanismem) zvyšovat inzulinovou sekreci a tak potencovat růst tělesné hmotnosti a konečně po narození způsobovat hypoglykémii. Výzkumem zárodků transgenních myší nesoucí pankreas-specifickou *hnf4a* delecí [ $\beta$ -*hnf4a-KO*] (Pearson E. R. et al., 2007) bylo skutečně potvrzeno, že *hnf4a* deficiencie způsobuje hypersekreci inzulinu během fetálního období in utero a v novorozeneckém období, čímž vysvětluje jak vyšší tělesnou hmotnost, tak hypoglykémii pozorovanou u postižených novorozenců. Tyto symptomy chybí u nositelů *HNF1A* mutace.

Jaký konkrétní mechanismus stojí za těmito zcela odlišnými symptomy (fenotypy) – hyperinzulinemická hypoglykémie v novorozeneckém období vs. hypoinzulinemická hyperglykémie v dospělosti – není známo. Jednou z lákavých hypotéz je, že iniciální defekt podmiňující hypersekreci  $\beta$ -buněk může nakonec vést k jejich vyčerpání a v pozdějším období k diabetu. Je však stejně tak možné, že zatímco jeden defekt v HNF-4 $\alpha$ -dependentní genové expresi vede ve vývojovém období k inzulinové hypersekreci, v pozdějším období života jiný defekt genové transkripce podmíní těžké  $\beta$ -buněčné selhání rezultující v diabetes (Pearson E. R. et al., 2007).

U *HNF4A*-MODY pacientů je prokazatelná také porucha sekrece glukagonu z  $\alpha$ -buněk [indukovaná argininem] (Herman W. H. et al., 1997) a porucha sekrece pankreatického polypeptidu (PP) z PP buněk [indukovaná inzulinem vyvolanou hypoglykemií] (Ilag L. L. et al., 2000). Tento efekt na sekreci hormonů z Langerhansových ostrůvků zřejmě není důsledkem účinku HNF-4 $\alpha$  na vývoj a diferenciaci endokrinního pankreatu [jelikož dysfunkce HNF-4 $\alpha$  neovlivňuje expresi PDX-1 (IPF-1) či jiných transkripčních faktorů řídící vývoj pankreatu]. Spíše může být důsledkem poruch signálních drah v  $\alpha$ - a PP-buňkách. Jejich vliv na vznik diabetu není jasný.

- *Porucha funkce HNF-4 $\alpha$  a buněčný cyklus*

Porucha exprese genů zodpovědných za poruchu glukózou stimulované inzulinové sekrece u nositelů *HNF4A* mutace nevysvětluje postupný nástup a progresivní charakter diabetu. Jelikož byly v nedávné době objeveny zajímavé cílové geny HNF-4 $\alpha$  uplatňující se v apoptóze [*CIDEA* (Bolotin E. et al., 2010)], DNA reparaci [*FANCF* (Bolotin E. et al., 2010)] a proliferaci [*RSK4* a *PAK5* (Niehof M. & Borlak J., 2005)], nelze vyloučit, že se na rozvoji diabetes mellitus nepodílí také postupný úbytek  $\beta$ -buněčné masy.

- *Porucha funkce HNF-4 $\alpha$  v ledvinách*

Snížení exprese výše zmíněných *TRPC1* a *PLCB1* genů je pravděpodobně asociován s diabetickou nefropatií. Snížené množství TRPC) a PLCB1 vede k narušení intracelulární kalciové homeostázi a signalizace, která se tak může podílet na změnách glomerulární hemodynamiky při diabetické nefropatii. Snížená exprese HNF4- $\alpha$  v ledvinách provázená sníženou expresí *TRPC1* je prostřednictvím renální biopsie prokazatelná jak u pacientů s diabetickou nefropatií, tak u zvířecích diabetických

modelů [ZDF- a STZ-krys] (Niehof M. & Borlak J., 2008). Žádný defekt v renálních funkcích přímo asociovaný s HNF-4 $\alpha$  dysfunkcí však není u *HNF4A*-MODY pacientů znám.

- *Porucha funkce HNF-4 $\alpha$  v gastrointestinálním traktu*

Experimentální studie se specifickým střevním (tračnickovým) *Hnf4a* knockoutem v embryonálním a adultním období potvrdily participaci HNF-4 $\alpha$  na vývoji a správné funkci střev. U kolon-specifických-*Hnf4a*-null myši sice dochází k normálnímu časnému vývoji tračnicku, následně je ovšem narušena normální formace krypt, maturace pohárkových buněk a proliferace epitelálních buněk. U těchto myši byla zjištěna snížená exprese genů potřebných pro diferenciaci epitelálních buněk a také genů pro normální funkci tračnicku (Garrison W. D. et al., 2006). Naopak delece *Hnf4a* v tenkém střevě po embryonálním období rezultuje v méně významné vady epitelální diferenciaci (Darsigny M. et al., 2009).

Specifická delece *Hnf4a* u dospělých myších spontánně spouští v tračnicku chronickou zánětlivou odpověď, charakterizovatelnou poruchou architektiky krypt, změnami proliferace, buněčnou apoptózou, zvýšenou sekrecí zánětlivých mediátorů a zánětlivou buněčnou infiltrací. Inflamatorní odpověď je pravděpodobně iniciována ztrátou slizniční homeostázi, danou poruchou slizničního epitelálního iontového transportu, spíše než poruchou její permeability (Darsigny M. et al., 2009). V jiné studii podobně využívající dospělé (intestinální-specifické-*Hnf4a*-null) myši však zvýšená propustnost slizniční bariéry vyloučena nebyla. Naopak vlivem narušené exprese genů kódujících muciny (*Muc3*) a aquaporiny, snížené hladiny polysacharidů a kyselých mukopolysacharidů došlo ke zvýšení permeability epitelální bariéry. Důsledkem toho myši vykazovali vyšší susceptibilitu k akutní chemicky (dextranem sulfát sodným) indukované kolitidě (Ahn S. H. et al., 2008). V biotických střevních preparátech těchto myši, ale i u lidských pacientů s IBD (Inflammatory Bowel Disease – Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou) byla zjištěna nízká hladina HNF-4 $\alpha$  (Ahn S. H. et al., 2008; Bolotin E. et al., 2010). Nabízí se proto domněnka, že HNF-4 $\alpha$  bude mít v případě kolitid (jakými jsou IBD) důležitý protektivní význam. U *HNF4A*-MODY pacientů nicméně žádný gastrointestinální defekt není znám, ani není vypozorována zvýšená susceptibilita k IBD.

### 1.2.5 Patofyziologie a klinická manifestace *HNF1A*-MODY a *HNF4A*-MODY

#### *Kauzální mutace v HNF1A*

V *HNF1A* genu již bylo popsáno několik set heterozygotních mutací, které vedou ke strukturálnímu a funkčnímu postižení výsledného proteinu (Stenson P. D. et al., 2009). Patří mezi ně substituční bodové mutace *měnící smysl (missense)* [podmiňující záměnu nukleotidu a tudíž jedné aminokyseliny v řetězci vznikajícího proteinu, což může narušit funkci výsledného proteinu], substituční bodové mutace *nesmyslné (nonsense)* [vedoucí k záměně nukleotidu, jenž způsobuje vznik předčasného terminačního kodonu a tím tvorbu zkráceného zcela nefunkčního proteinu] či *střihové (splice site)* mutace [vedoucí k aberantnímu sestřihu hnRNA, jenž narušuje tvorbu proteinového produktu] (Glucksmann M. A. et al., 1997; Kaisaki et al., 1997) anebo *posunové (frameshift)* [vedoucí k posunu čtecího rámce, vzniku předčasného terminačního kodonu a tím k tvorbě zkráceného nefunkčního proteinu]. Také byly dokumentovány *in-frame delece* [mutace vedoucí k vynechání nukleotidů

v násobku tří s následným chyběním jedné či několika aminokyselin v polypeptidovém řetězci], *inzerce* [sposobující ve vložení jednoho nebo několika nukleotidů s následným přidáním jedné nebo několika aminokyselin do polypeptidového řetězce] a *duplikace* [zdvojení jednoho nebo několika exonů daného genu] (Colclough K. et al., 2014). Uvedené mutace mohou postihnout celý gen, včetně promotorové oblasti.

Ve většině případů se jedná o missence mutace, jež se s větší pravděpodobností vyskytují v DNA-vazebné či dimerizační doméně, spíše než v doméně transaktivační (Colclough K. et al., 2014). *Transaktivační doménu* postihují častěji truncating mutace [inaktivující mutace zkracující protein narušením čtecího rámce vlivem vzniku předčasného stop kodonu; např. nonsense, splicing mutace, malé inserce nebo delece] (Bellanné-Chantelot C. et al., 2008). Vůbec nejčastější mutací v *HNF1A* je frameshift mutace P291fsinsC, vedoucí k syntéze krátkého proteinu (o 315 aminokyselinách), který postrádá většinu transaktivační domény (Yamagata K. et al., 1998).

Mutace v *HNF1A* postihují funkci buněk prostřednictvím různých molekulárních mechanismů. Analýzou mutací identifikovaných u pacientů s HNF1A-MODY bylo prokázáno, že některé z nich vedou *a*) ke *ztrátě funkce (loss-of-function mutations)* [genový produkt má sníženou či nedostatečnou funkci anebo ji zcela ztratí] nebo *b*) mají *dominantně negativní efekt (dominant negative mutations)* [genový produkt působí na běžný (wild-type) protein a narušuje jeho funkci anebo ho zcela inaktivuje] (Ryffel G. U., 2001; Vaxillaire M. et al., 1999; Wang H. et al., 2000; Yamagata K. et al., 1998).

Ke ztrátě funkce proteinu vedou mutace v jakékoliv části genu – v oblasti kódující dimerizační, DNA-vazebnou nebo transaktivační doménu, i v oblasti promotorové (Sujjitjoon J. et al., 2008; Yamagata et al., 1998). Loss-of-function mutace podmiňují snížení genové dávky a genového produktu (HNF-1 $\alpha$ ), který nedostačuje k výkonu specifické funkce v organismu – pak hovoříme o tzv. haploinsuficienci (ztrátě funkce jedné alely). *In vitro* funkční studie mutací v *HNF1A* (mimo jiné i *HNF4A*) odhalily, že většinou mutace způsobí poruchu právě mechanismem haploinsuficience (Sujjitjoon J. et al., 2008). Účinky loss-of-function mutací jsou proměnlivé – pohybující se na škále od absolutní aberace transaktivačního potenciálu vlivem nonsense mutací až po částečnou ztrátu transaktivačního potenciálu vlivem missense mutací. K poklesu transaktivační aktivity mutovaného proteinu může dojít hned z několika důvodů – vlivem snížení stability proteinu (nestabilní proteiny jsou rychle degradovány a proto jsou v buňce přítomny jen ve velmi malém množství) či poruchy transportu do jádra, ztrátou schopnosti vazby na DNA či koaktivátory (p300) nebo nemožností dimerizace s HNF-1 $\beta$  (Sujjitjoon J. et al., 2008; Yang Q. et al., 1999). Mutace mimo kódující oblast genu – v promotorové oblasti – mohou ovlivnit vazbu jiných transkripčních faktorů (např. HNF-4 $\alpha$ ) k *HNF1A* (Gagnoli, C. et al., 1997) a snižovat tak úroveň jeho exprese. Některé mutace v promotorové oblasti mohou také vést k nadprodukci HNF-1 $\alpha$  [gain-of-function], který paradoxně pozitivní zpětnou vazbou tlumí expresi *HNF4A* genu a následně působí poruchu exprese genů ostatních (Pelikánová T. a kolektiv, 2007).

Závažnější dopad má většina mutací lokalizovaných v DNA-vazebné nebo transaktivační doméně HNF-1 $\alpha$  s dominantně negativním efektem na wild-type protein. U těchto mutací totiž zůstává intaktní dimerizační doména, která mutovanému proteinu propůjčuje schopnost dimerizovat



s wild-type proteinem a vytvářet tak nefunkční dimery, ve kterých je navíc utlumena i aktivita wild-type proteinu [jako např. v případě P291fsinsC] (Yamagata K. et al., 1998; Sujitjoon J. et al., 2008).

Mutace v *HNF1A* mají vysokou penetraci. Klinicky se projeví do 25 let věku u 63% nositelů mutace, do 35 let u 78.6% a do 55 let u 95.5% nositelů (Frayling T. M. et al., 2001). Dobu manifestace diabetu mimo jiné ovlivňuje *typ a pozice HNF1A mutace*, a částečně tak vysvětluje klinickou variabilitu *HNF1A-MODY* fenotypu (Bellanné-Chantelot C. et al., 2008; Colclough K. et al., 2014). Podobně je tomu i v případě *HNF4A* mutací. Ve studii Bellanné-Chantelot et al. bylo prokázáno, že missense mutace jsou v porovnání s truncating mutacemi asociovány s pozdější diagnostikou diabetu (a to v průměru o čtyři roky). Markantnější rozdíl byl zaznamenán při porovnání konkrétní lokalizace těchto mutací. V transaktivační doméně byly missense mutace ve srovnání s truncating mutacemi asociovány s vyšším věkem v době diagnostiky (30 let vs. 19 let). Naopak v případě lokalizace v dimerizační nebo DNA-vazebné doméně nebyl mezi missense a truncating mutací zaznamenán žádný rozdíl (20 vs. 18 let). Missense mutace, které zasahují dimerizační nebo DNA-vazebnou doménu se však pojily s dřívější manifestací diabetu (věk v době diagnostiky 20 let) v porovnání s pozicí missense mutace v transaktivační doméně (věk v době diagnostiky 30 let). Desetiletý rozdíl v nástupu cukrovky je zřejmě podmíněn vážnějšími funkčními důsledky v případě pozice missense mutace v dimerizační nebo DNA-vazebné doméně, projevující se poruchou vazby na DNA a stability proteinu). Naproti tomu pacienti s truncating mutací v *HNF1A* byli diagnostikováni nezávisle na místě mutace (Bellanné-Chantelot C. et al., 2008). Podobné korelace byly pozorovány i v případě *HNF4A* mutací (Colclough K. et al., 2014).

#### *Kauzální mutace v HNF4A*

Rozpoznáno bylo již přes sto různých mutací v *HNF4A* (Colclough K. et al., 2014). Zahrnují podobně jako v případě genu *HNF1A* *missense, nonsense, splice site, frameshift* mutace, *insertce* nebo *delece* a *duplikace*. Mutace se mohou nacházet v *celém HNF4A* genu, jak v kódující oblasti – exonech, tak i v přilehlých intronových oblastech a v promotorové oblasti [např. P2 promotoru, jenž řídí expresi HNF-4 $\alpha$  právě v pankreatických  $\beta$ -buňkách (Bolotin E. et al., 2010)].

Funkční analýzy mutací prokázaly, že příčinou *HNF4A-MODY* je, spíše než dominantně negativní efekt (HNF-4 $\alpha$  nedisponuje schopností dimerizace s wild-type proteinem) nebo mechanismus „nárůst funkce“ (gain-of-function), *ztráta funkce* (loss-of-function) mutovaného proteinu s následným snížením množství HNF-4 $\alpha$  proteinu per se (haploinsuficience). To podmiňuje pokles exprese zásadních genů v pankreatických ostrůvcích a játrech, a tak zodpovídá za *HNF4A-MODY* fenotyp (Shih D Q. et al., 2000; Stoffel M. & Duncan S. A., 1997). Z přirozeně se vyskytujících mutací v *HNF4A* byly analyzovány např. nonsense R154X a Q268X, missense R127W, V255M a E276Q mutace, u kterých byl prokázán variabilní pokles funkce výsledného proteinu, a vyloučen dominantně negativní efekt na wild-type protein (Lausen J. et al., 2000; Stoffel M. & Duncan S. A., 1997). Nonsense mutace vedly vlivem vzniku předčasného terminačního kodonu (s předčasným ukončením translace) ke vzniku zkráceného (truncated) HNF-4 $\alpha$  proteinu, jenž ztratil transaktivační potenciál a neinterferoval s wild-type proteinem. Snížený transaktivační potenciál byl zaznamenán také v případě missense mutací.

Penetrance genové mutace je neúplná a v porovnání s *HNF1A* mutacemi je považována za slabší (Ellard S. et al., 2008). U některých jejích nositelů se proto diabetes mellitus objeví až v pozdějším věku, u 10-20% dokonce zůstává glukózová tolerance po celý život normální (Pelikánová, T. & kolektiv, 2007).

Běžné genetické varianty v regulačních oblastech *HNF4A* a *HNF1A* jsou mimochodem asociovány také s predispozicí k diabetes mellitus 2. typu. Řada studií doložila, že běžné polymorfismy v těchto genech mohou predisponovat určité populace (kavkazskou a asijskou) ke vzniku cukrovky 2. typu (Holmkvist J. et al., 2008). Dobře zdokumentované jsou např. genové varianty *HNF4A* P2 (pankreatického) promotoru ve vztahu k cukrovce 2. typu (Weedon M. N. et al., 2004; Silander K. et al., 2004; Love-Gregory L. D. et al., 2004; Pearson E. R. et al., 2005). Tyto genové varianty však zřejmě nehrají v patogenezi diabetu dominantní roli (Johnson J. D., 2007), ale spíše přispívají k polygennímu pozadí vzniku diabetes mellitus 2. typu. Uplatňovat se mohou skrze  $\beta$ -buněčnou dysfunkci, kdy jimi podmíněná porucha metabolismu glukózy v  $\beta$ -buňkách může narušovat správnou inzulinovou sekreci – tzn. schopnost navýšit inzulinovou sekreci v době zvýšených nároků při inzulinorezistenci (Fajans S. S. et al., 2001; Holmkvist J. et al., 2008).

### *Patofyziologie*

Poznatky o HNF-1 $\alpha$  a HNF-4 $\alpha$ , jež postupně přinesla řada experimentálních studií, také vnesly do problematiky monogenního diabetu mnoho otázek (např.: Jaké jsou skutečné cílové geny a biologické procesy *in vivo*, které kontrolují tyto transkripční faktory v  $\beta$ -buňkách? Jak je možné, že mutace v jejich genech vedou ke klinické manifestaci omezenou zejména na pankreas? Proč jsou heterozygotní mutace schopny způsobit MODY a proč je tento genetický defekt ve své klinické manifestaci veskrze opožděn až do období druhé nebo čtvrté životní dekády?). Na některé se již podařilo zcela nebo alespoň částečně odpovědět, na některé otázky se odpovědi stále hledají.

V případě heterozygotní mutace v *HNF1A* či *HNF4A* jsou  $\beta$ -buňky ke snížení genové dávky velmi citlivé, proto snížení HNF-1 $\alpha$ /HNF-4 $\alpha$  transkripční aktivity podmiňuje závažnou  $\beta$ -buněčnou dysfunkci. V pankreatu oba transkripční faktory pracují v podobě pozitivní zkřížené regulační smyčky (systémem zpětných vazeb), která je v komplexní síti několika transkripčních faktorů pro zachování klíčových  $\beta$ -buněčných funkcí ústřední a nenahraditelná. Ztráta funkce jedné alely HNF-1 $\alpha$  nebo HNF-4 $\alpha$  zřejmě vede selektivně v  $\beta$ -buňkách k narušení, resp. k vypnutí transkripční aktivity všech čtyř HNF-1 $\alpha$ /HNF-4 $\alpha$  alel (Fajans S. S., et al., 2001). Tím je narušena exprese širokého spektra  $\beta$ -buněčných genů. V ostatních tkáních (např. v játrech a ledvinách), kde dochází jen k částečnému oslabení funkčního proteinu, jehož funkci zřejmě přebírají jiné transkripční faktory regulační transkripční sítě, nejsou klinické důsledky zdaleka tak závažné (Fajans S. S., et al., 2001).

Z patofyziologického hlediska vedou heterozygotní *HNF1A*/*HNF4A* mutace ke komplexní poruše sekrece inzulinu z  $\beta$ -buněk, jež se klinicky projeví progresivní poruchou glukózové homeostázy. Abnormální inzulinová sekrece je de facto důsledkem jak *kvalitativního*, tak *kvantitativního* defektu v sekreční funkci  $\beta$ -buněk – poruchy spuštění inzulinové sekrece po glukózové výzvě a redukce vlastní inzulinové syntézy. Konkrétními mechanismy stojícími za nedostatečnou sekrecí inzulinu jsou: *a)* narušení vstupu glukózy do  $\beta$ -buňky; *b)* porucha

intracelulárního metabolismu glukózy (glykolýzy a oxidativní fosforylace) rezultující v nedostatečnou produkci ATP (nutnou pro otevření  $K_{ATP}$ -dependentních kanálů a depolarizaci membrány), která se v konečném důsledku projeví omezeným uvolněním sekrečních inzulinových granulí z  $\beta$ -buněk; c) pokles obsahu intracelulárního kalcia a potažmo úrovně degranulace inzulinových zásobních granulí; d) snížená syntéza inzulinu podmíněná nedostatečnou expresí inzulinového genu; e) abnormální buněčný obrat (zřejmě s převahou apoptózy  $\beta$ -buněk nad proliferací) s postupným úbytkem funkční  $\beta$ -buněčné masy, jakož i snížená schopnost adaptivní reakce na hyperglykémii [tj. možnost reagovat hyperplázií a hypertrofií] (Wang H. et al., 2000; Shih D. et al., 2001; Pelikánová T. a kolektiv, 2007). V současnosti ovšem nejsou všechny mechanismy  $\beta$ -buněčné dysfunkce u MODY přesně definované.

### *Klinická manifestace*

Pro pacienty s *HNF1A*-MODY a *HNF4A*-MODY je příznačné postupné zhoršování glukózové homeostázy v čase. V případě *HNF1A*-MODY mají novorozenci a malé děti glykémii normální. Narodí se se zcela normálními fyziologickými a biochemickými funkcemi pankreatických  $\beta$ -buněk. Také v prvních deseti letech má většina pacientů nesoucí *HNF1A* mutaci lačnou glykémii a glukózovou toleranci stále ještě normální (Hattersley A. T., 1998). Naopak u přibližně 15% novorozenců nesoucích *HNF4A* mutaci je typická transientní (hyperinzulinemická) hypoglykémie (Pearson E. R. et al., 2007). Vlivem hyperinzulinémie se u těchto novorozenců zvyšuje porodní hmotnost, v porovnání se zdravými rodinnými příslušníky v průměru o 790 g (Pearson E. R. et al., 2007), tj. na více než 4,4 kg (Ellard S. et al., 2008). Makrosomii lze pozorovat u 56% případů *HNF4A*-MODY (Pearson E. R. et al., 2007). K postupnému zvyšování glykémie a konečně i k manifestaci diabetu dochází jak v případě *HNF1A*-MODY, tak i v případě *HNF4A*-MODY teprve v průběhu pozdního dětství, dospívání nebo časně dospělosti. Souhrn klinických charakteristik *HNF1A*-MODY a *HNF4A*-MODY shrnuje tabulka 1.

**Tab. 1. Klinické a laboratorní charakteristiky HNF1A-MODY a HNF4A-MODY**

|                             | <b>HNF1A-MODY</b>  | <b>HNF4A-MODY</b>  |
|-----------------------------|--|--|
| <b>Klinická kritéria</b>    | Normální glykémie při narození a v časném dětství.   | Novorozenecká hypoglykémie (hyperinzulinemická)<br>Makrosomie (vyšší porodní hmotnost)     |
|                             | Časná manifestace diabetu (2. – 4. dekáda, nejčastěji okolo 25. roku života)   |  |
|                             | Pozitivní rodinná anamnéza diabetu (výskyt poruchy glukózové homeostázy alespoň ve dvou generacích; nejméně jeden člen rodiny, u kterého se diabetes manifestoval časně, tj. do 25. roku života) |  |
|                             | Absence obezity (normální BMI) a známek inzulínové rezistence  |  |
|                             | Nezávislost na inzulínu [alespoň tři roky od diagnostiky bez nutnosti léčby inzulínem, nebo postačují nápadně nízké dávky inzulínu (< 0.5 IU/kg); po jeho vysazení se nerozvíjí ketoacidóza]     |  |
|                             | Citlivost na SUR (někdy způsobující hypoglykémie)  |  |
| <b>Laboratorní kritéria</b> | Nárůst glykémie ve 120. minutě oGTT o > 4.5-5 mmol/l (glykémie nalačno může být ještě normální, ve 120. minutě však odpovídá diabetu)  |  |
|                             | Snížená stimulovaná sekrece inzulínu během ivGTT   |  |
|                             | Měřitelný C-peptid (při glykémii > 8 mmol/l) mimo honeymoon období (déle než tři roky od diagnostiky diabetu)  |  |
|                             | Absence ketoacidózy, včetně ketolátek v moči   |  |
|                             | Nepřítomnost specifických ostrůvkových autoprotilátek (GADA, IA2A, IAA)  |  |
|                             | Glykosurie při relativně nízké glykémii (< 10 mmol/l)  | Nižší hladina ApoAII, ApoCIII v séru   |
|                             | Výrazně snížená plasmatická hladina hsCRP  | Nižší HDL v séru<br>Nižší či normální hladina TAG v séru (v porovnání s diabetiky 2. typu) |

MODY – maturity onset diabetes of the young; HNF1A – hepatální nukleární faktor 1 $\alpha$ ; HNF4A – hepatální nukleární faktor 4 $\alpha$ ; BMI – body mass index; SUR – deriváty sulfonylurey; oGTT – orální glukózový toleranční test; ivGTT – intravenózní glukózový toleranční test; GADA – autoprotilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové; IA2A – autoprotilátky proti tyrozin fosfatáze; IAA – autoprotilátky proti inzulínu; hcCRP – high sensitive C reaktivní protein; Apo – apolipoproteiny; TAG - triacylglyceroly

Primárně selhává sekrece inzulínu postprandiálně, zatímco bazální tvorba inzulínu v podmínkách nalačno zůstává nějakou dobu zachovalá. Neschopnost  $\beta$ -buněk dostatečně navýšit produkci inzulínu po zátěži glukózou se projeví postprandiální hyperglykemií, zatímco dostatečná bazální sekrece umožňuje udržet normální nebo jen lehce zvýšenou glykémii nalačno. Orální glukózový toleranční test (oGTT) má v tomto časném období typickou křivku – obvykle ještě normální (ev. mírně zvýšenou) lačnou glykémii, za dvě hodiny od podání glukózy však glykémie rapidně stoupají k hodnotám v pásmu poruchy glukózové tolerance či diabetes mellitus (Sride A. et al., 2002). Teprve s postupem času a progresí  $\beta$ -buněčné dysfunkce dochází k poruše glukózové homeostázy i nalačno, jenž graduje v rozvoj klasické symptomatologie diabetes mellitus (Murphy R. et al., 2008).

Obvykle je tomu ve druhé až třetí věkové dekádě, v případě *HNF4A*-MODY tomu může být ještě později (Bellanné-Chantelot C. et al., 2008).

Období zvýšené glykémie před vlastní klinickou manifestací cukrovky může být poměrně dlouhé, proto se lze MODY často zachytit zcela náhodně na různém stupni glykemické poruchy (Lébl J. & Průhová Š., 2009). Časným klinickým symptomem v prediabetickém období je u *HNF1A*-MODY glykosurie při relativně nízké glykémii (tj. < 10 mmol/l), která může být provázená i mírnou polyurií (Murphy R. et al., 2008; Ellard S. et al., 2008). Kombinace renální glykosurie a defektní inzulínové sekrece může zpočátku ustanovovat dynamickou rovnováhu glukózové homeostázi, kdy zvýšené ztráty glukózy do moče kompenzují hyperglykémii rezultující z nedostatečné postprandiální sekrece inzulínu. V *HNF1A*-MODY rodinách se mimo jiné vyšetření glykosurie v průběhu dětství používá jako screeningová metoda k vyhledávání nositelů *HNF1A* mutace a progresu do diabetu (Ellard S. et al., 2008). Přínosným časným diagnostickým biomarkerem *HNF1A*-MODY a zároveň diferenciativně diagnostickým faktorem je také hs-CRP (high sensitive C-reactive protein). Snížená sérová hladina tohoto zánětlivého markeru odlišuje *HNF1A*-MODY od jiných forem cukrovky, jakými jsou diabetes mellitus 1. a 2. typu, ale též od *HNF4A*-MODY (McDonald T. J. et al., 2011). U *HNF4A*-MODY je časným symptomem nižší hladina některých apolipoproteinů, event. triglyceridů (Pearson E. R. et al., 2005).

MODY diabetes se tak jako u jiných typů cukrovky může manifestovat klasickými osmotickými příznaky (polyurií, polydipsií, dehydratací), které plynou z narůstající hyperglykémie, úbytkem hmotnosti či narůstající únavou. Nicméně doba manifestace cukrovky, závažnost choroby, vznikající komplikace či dokonce nároky na léčbu jsou v mnoha aspektech značně variabilní. Klinická symptomatologie se může lišit jak mezi postiženými rodinami (s různými typy mutace), tak i mezi jednotlivými členy téže rodiny navzájem [tedy se stejným typem mutace] (Timsit J. et al., 2005; Hattersley A. T. et al., 1998). Interindividuální variabilitu klinických projevů, včetně doby klinického nástupu cukrovky předurčuje konkrétní typ a pozice kauzální mutace i její penetrance (Bellanné-Chantelot C. et al., 2008). Ovšem i pacienti nesoucí identickou kauzální mutaci onemocnějí diabetem ve velmi různém věku, mohou vyvinout na rozdíl od ostatních i při relativně mírném průběhu cukrovky závažné diabetické komplikace. Za těmito rozdíly ve fenotypu nemoci zřejmě stojí další geny a environmentální faktory, které klinickou prezentaci MODY modifikují nezávisle na *HNF1A/HNF4A* mutaci (Lehto M. et al., 1997; Kim S. H. et al., 2003; Lango Allen H. et al., 2010). Žádný z těchto faktorů nicméně nemá podstatný význam pro samotný vznik MODY. Progrese MODY diabetu jako takového je nezávislá na jiných negenetických faktorech, než jen na čase (Johnson J. J., 2007). Variabilní klinická symptomatologie mimo jiné může znesnadňovat rozpoznání MODY mezi ostatními typy diabetes mellitus.

Díky technologiím umožňující analýzu celé kódující DNA nebo dokonce celého genomu bylo objeveno několik genových variant, které mohou modifikovat fenotyp řady chorob, včetně monogenního diabetu. Příkladem takových běžných polygenních variant ovlivňujících v MODY rodinách dobu manifestace diabetu a jeho závažnost jsou rizikové polygenní jedno-nukleotidových polymorfismy (single nucleotide polymorphism – SNP) predisponující k diabetes mellitus 2. typu (Tack C. J. J. et al., 2000; Lango Allen H. et al., 2010). U pacientů s *HNF1A*-MODY každý přidatný SNP predisponující k diabetes mellitus 2. typu snižuje věk v době vzniku MODY o 0,35 let (Lango Allen H. et al., 2010). Nejsilnější účinek byl pozorovaný např. u třech rizikových variant lokalizovaných

v *HNF1B*, *SLC30A8* a *CDKAL1* genu. Tak jako většina genetických variant predisponujících k diabetes mellitus 2. typu zřejmě působí prostřednictvím snížení  $\beta$ -celulární funkce, spíše než zvýšením inzulinové rezistence (Lango Allen H. et al, 2010).

Kromě vlastní genetické výbavy, může klinický obraz MODY modifikovat též intrauterinní hyperglykémie, tedy v případech kdy má matka dítěte během těhotenství špatně kompenzovanou cukrovku. Expozice plodu nesoucího identickou *HNF1A* mutaci hyperglykémii in utero je ve srovnání s jedincem, který hyperglykémii nebyl během těhotenství matky vystaven, spojena s dřívější diagnostikou diabetu. Konkrétní doba se různí. Může tomu být o 5,1 roku dříve (Lango Allen H. et al., 2010) nebo dokonce až o 12 let dříve (Stride A. et al., 2002; Klupa T. et al., 2002).

Mezi další negenetické faktory, které mohou ovlivnit nástup diabetu a zvyšovat u pacientů s MODY závažnost hyperglykémie patří faktory ovlivňující inzulinovou senzitivitu [např. infekce, puberta, těhotenství] (Fajans S. S. et al., 2001). Vliv obezity na závažnost klinické prezentace je sporná. Některé studie takovou asociaci s obezitou neprokázali (Tack C. J. J. et al., 2000; Lango Allen H. et al., 2010), jiné naopak ano (Lehto M. et al., 1997). Nicméně důslednost v prevenci rozvoje obezity je na místě u MODY pacientů s rodinným výskytem cukrovky 2. typu v anamnéze.

Klinická variabilita se dává do spojitosti také se sociálními faktory. V MODY rodinách klesá věk v době diagnostiky diabetu v mladších generacích částečně z důvodu větší informovanosti o dědičné povaze onemocnění (Stride A. et al., 2002; Klupa T. et al., 2002) a časného screeningu příbuzných nositelů mutace.

Riziko diabetických komplikací (obzvláště mikrovaskulárních) je podobně jako u diabetes mellitus 1. a 2. typu vysoké (Isomaa B. et al., 1998). Rapidně však narůstá v případě špatné glykemické kompenzace. Např. u *HNF1A*-MODY je charakteristický zejména rychlý rozvoj diabetické retinopatie a nefropatie (Brunerová L. et al., 2006). Naopak riziko makrovaskulárních komplikací nebývá dramaticky vysoké. Usuzovalo se na spíše ateroprotektivní lipidogram MODY pacientů, např. vyšší sérové hladiny HDL u *HNF1A*-MODY v porovnání s diabetiky 2. typu. Větší kardioprotektivita ale nakonec v tomto případě prokázána nebyla (Murphy R. et al., 2008; Pearson E. et al. 2003). Nediabetickou, méně obvyklou „komplikací“ některých (~ 4%) pacientů s *HNF1A*-MODY je jaterní adenomatóza (Bluteau O., et al., 2002).

### *Léčba*

Přestože  $\beta$ -buňky nejsou v případě *HNF-1 $\alpha$*  a *HNF-4 $\alpha$*  dysfunkce schopny vyplavit dostatečné množství inzulinu na popud glukózy, velmi promptně reagují na deriváty sulfonylurey (SUR) či glinidy, a přibývá též zkušeností s léčbou gliptiny (Lachance C. H., 2016). SUR jsou schopny v  $\beta$ -buňkách „obejít“ genetický defekt a (přímo aktivací  $K_{ATP}$ -dependentního kanálu) spustit inzulinovou sekreci. Masivní vyplavení inzulinu po podání i malé dávky SUR může dokonce velmi snadno způsobit hypoglykémii. Tuto extrémní citlivost k SUR si  $\beta$ -buňky uchovávají i po několika letech trvání diabetu, a to i déle než 20 let. *HNF1A*-MODY a *HNF4A*-MODY pacienty lze proto téměř vždy úspěšně léčit perorálními antidiabetiky ze skupiny SUR, a pokud nevyvolávají hypoglykémie, mohou zajistit dostatečnou léčbu po mnoho desítek let (Pearson E. R. et al., 2000) s prokazatelně větším úspěchem

než v případě inzulínoterapie (Pearson E. R. et al., 2003). V neposlední řadě nabízí nemocným vzhledem k možnosti perorálního podání také významně lepší kvalitu života, v případě gliptinů i s menším rizikem hypoglykemií (Lachance, 2016). V závažnosti diabetu však existuje značná variabilita (Hattersley A. T., 1998), a předpokládá se, že asi 30% *HNF1A*-*MODY* pacientů vyžaduje inzulínoterapii (Wobser H. et al., 2002). Tak jako tak s progresivní dysfunkcí  $\beta$ -buněk a zvyšujícími se nároky na léčbu, je po určité době stejně nutné některé pacienty léčit inzulínem.

Dříve panovaly představy, že nejlepší kompenzace a tak i oddálení rozvoje diabetických komplikací, je možné dosáhnout pouze intenzifikovaným inzulínovým režimem. Mnohé studie však potvrdily, že terapie SUR (například glibenklamidem) je u *HNF1A*-/*HNF4A*-*MODY* pacientů v dlouhodobém horizontu bezpečná a účinná (Pearson E. R. et al., 2000; Shepherd M. et al., 2003). Proto pacienty, kteří byli doposud léčeni inzulínem (například ti, jenž byli mylně považováni za diabetiky 1. typu), je vhodné kontrolovaně převést z inzulínu na perorální antidiabetika (Brunerová L. et al., 2006). Vynechání inzulínu v tomto případě nevede ke vzniku ketoacidózy (Shepherd M. et al., 2003). Nicméně nedodržování léčby (ať již perorálními antidiabetiky či inzulínem) přináší pacientům v souvislosti s dekompenzací diabetu významné riziko akcelerace zejména mikrovaskulárních komplikací (Isomaa B. et al., 1998).

### 1.3 SPECIFICKÉ OSTRŮVKOVÉ AUTOPROTILÁTKY

Ostrůvkové autoprotilátky jsou specifické imunoglobuliny, tvořené imunitním systémem proti vlastním molekulám (autoantigenům)  $\beta$ -buňky. V případě diabetes mellitus 1. typu jsou autoprotilátky projevem imunitně zprostředkované destrukce inzulín produkujících buněk (inzulitidy), iniciované doposud neznámým (auto)antigenem, přičemž sami o sobě pravděpodobně nemají patogenní roli. Předpokládá se, že vznikají v průběhu buněčné destrukce v pankreatických ostrůvcích, odkud jsou autoantigeny uvolňovány a následně vycytávány místními či cirkulujícími makrofágy anebo dendritickými buňkami, jenž migrují do lymfatických uzlin drénující pankreas, kde jsou následně prezentovány lymfocytům (Mathis D. et al., 2001).

#### 1.3.1 Přehled specifických ostrůvkových autoprotilátek

Mezi specifické ostrůvkové autoprotilátky patří *protilátky proti cytoplasmě ostrůvkových buněk* (islet cytoplasm autoantibodies – ICA), proti *dekarboxyláze kyseliny glutamové* (glutamic acid decarboxylase autoantibodies – GADA), proti *tyrozin fosfatáze* (insulinoma-associated autoantibodies – IA-2A), proti *inzulínu* (insulin autoantibodies – IAA) a proti *zinkovému transportéru 8* (zinc transporter 8 autoantibodies – ZnT8A).

- *Protilátky proti cytoplasmě ostrůvkových buněk (ICA)*

ICA představovaly vůbec první rozpoznané autoprotilátky u pacientů s diabetes mellitus 1. typu (Bottazzo G. et al., 1974), které bylo možné identifikovat pracnými nepřímými imunoflorescenčními testy. V současné době je jich stanovení plně nahrazeno měřením protilátek proti specifičtějším antigenům – zejména dekarboxyláze kyseliny glutamové a tyrozin fosfatáze nebo inzulínu, které se

stanovují radioimunoassayí (RIA). RIA v současnosti poskytuje nejvyšší senzitivitu a specifitu [větší než enzymová imunosorbentní analýza – ELISA] (Pihoker C. et al., 2005).

- *Protilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové (GADA)*

GADA (označované také jako GAD65A, tj. autoprotiátky proti 65kD izoformě glutamát dekarboxylázy) jsou v souvislosti s diabetes mellitus 1. typu nejčastěji prokazatelnými autoprotiátkami s odhadovanou prevalencí u nově diagnostikovaných diabetiků 1. typu 70-80% (Notkins A. L. & Lernmark Å., 2001). Jejich cílovým autoantigenem je dekarboxyláza kyseliny glutamové (GAD) – enzym ukotvený v membráně synaptických váčků nervových zakončení GABA-neuronů a malých synaptických mikrověsíků  $\beta$ -buněk (Sorenson R. L. et al., 1991). GAD konvertuje kyselinu glutamovou na kyselinu  $\gamma$ -aminomáslenou (GABA) – hlavní inhibiční neurotransmitter v centrálním a periferním nervovém systému. Jeho funkce mimo nervové tkáně není zcela jasná. S ohledem na přítomnost GAD a GABA v  $\beta$ -buňkách, jakož i přítomnost GABA-receptorů v jejich plasmatické membráně, má GABA zřejmě význam v parakrinní signalizaci pankreatických ostrůvků (Leslie R. D. et al., 1999), konkrétně v modulaci glukagonové sekrece z  $\alpha$ -buněk (Wendt A. et al., 2004). Nicméně v experimentu na GAD65<sup>-/-</sup> myši se na straně  $\beta$ -buněk neprokázala žádná konkrétní funkční anomálie (Kash S. F. et al., 1999).

GAD65A jsou cenným prediktorem rizika a progresu autoimunitního diabetu a nejčastěji používanou screeningovou autoprotiátkou (Townes R. & Pietropaolo M., 2011). Jejich výskyt moduluje věk a HLA genotyp. Jsou prokazatelné již v preklinickém stádiu (Brooks-Worrell B. et al., 2001) a jejich incidence roste s věkem – najdeme je častěji u dospělých pacientů (Jensen R. A. et al., 2011; Townes R. & Pietropaolo M., 2011). Ve většině případů přetrvávají ve vysokém titru i déle než 12 let od diagnostiky diabetu, bez vazby na věk či zbytkovou endogenní inzulinovou sekreci [lze je detekovat i při neměřitelně nízké hladině C-peptidu] (Borg H. et al., 2002).

Vyšší titr GADA (naměřený v době diagnostiky diabetu) je asociován se závažnějším  $\beta$ -buněčným selháním a koreluje s výskytem chronických diabetických komplikací, jakou je např. retinopatie po 15 letech trvání diabetu (Borg H. et al., 2001; Jensen R. A. et al., 2011). Nízká hladina GADA sama o sobě indikuje pomalou progresi  $\beta$ -buněčné dysfunkce během pěti let po diagnóze (Borg H. et al., 2001).

- *Protilátky proti tyrozin fosfatáze (IA-2A)*

IA-2A (označované také jako ICA 512) jsou detekovatelné u 32-75% nově diagnostikovaných diabetiků 1. typu (Notkins A. L. & Lernmark Å., 2001), v závislosti na věku v době manifestace. Cílový autoantigen IA2 je členem rodiny protein tyrozin fosfatáz, pozbývající enzymové aktivity. Je exprimován primárně v neuroendokrinních buňkách (mimo jiné i v neuroendokrinních tumorech), mnoha částech centrální nervové soustavy a v Langerhansových ostrůvcích ( $\alpha$ - i  $\beta$ -buňkách). V  $\beta$ -buňkách je lokalizován v denzích (sekrečních) granulích a jeho funkce je nejasná. Protein má dvě domény, přičemž extracelulární doména se nachází v sekrečních granulích, zatím co intracelulární doména zasahuje do cytoplasmy. Hlavní antigenní oblast, proti které je namířena protilátková odpověď tvoří intracelulární doména (Leslie R. D. et al., 1999).



Častěji jsou tyto autoprotilátky detekovatelné v mladších věkových skupinách (u dětí), s věkem jejich incidence klesá a v době pozdější manifestace diabetu nebývají vůbec prokazatelné (Williams A. J. et al., 2008; Graham J. et al., 2002). Jejich plasmatická hladina je měřitelná i 12 let po diagnostice cukrovky, ale s délkou trvání diabetu (na rozdíl od GADA) rapidně klesá (Borg H. et al., 2002).

IA-2A jsou považovány za specifitější ukazatel destrukce  $\beta$ -buněk a jejich přítomnost koreluje s rapidní progresí do diabetu (Savola K. et al., 1998). V kombinaci s GADA predikují rychlé  $\beta$ -buněčné selhání (Borg H. et al., 2002).

- *Protilátky proti inzulinu (IAA)*

IAA jsou samy o sobě považovány za vysoce specifické prediktory rizika a progresu diabetu 1. typu (Steck A. K. et al., 2011). Existují hypotézy, že právě inzulin je primárním autoantigenem, který hraje časnou úlohu v patogenezi diabetes mellitus 1. typu jako spouštěč autoimunitní inzulitidy (Eisenbarth G. S. et al., 2002).

IAA se objevují nejčastěji u malých dětí a bývají vůbec prvními detekovatelnými autoprotilátkami (Ziegler A. G. et al., 1999). Prokazatelné jsou zhruba u 90% dětí s diabetes mellitus 1. typu do pěti let věku, v 50-60% u dětí do 10 let věku, po 12. roce života se vyskytují už jen ve 40% případech a u dospělých pacientů nejsou běžné (incidence mezi pacienty do 30 let věku se odhaduje na pouhých 10%) [Graham J. et al., 2002; Feeney S. J. et al., 1997]. Longitudinálně se neobservují, jelikož rutinní analýzou je nelze odlišit od protilátek proti exogennímu inzulinu, jež se mohou objevit časně po iniciaci inzulinoterapie (Davis S. N. et al., 1992).

- *Autoprotilátky proti zinkovému transportéru 8 (ZnT8A)*

ZnT8A jsou protilátky namířené proti transmembránovému proteinu sekrečních granulí  $\beta$ -buněk, který přenáší zinkové kationty. Jsou detekovatelné u 60-80% čerstvě manifestovaných diabetiků 1. typu a 26% pacientů bez přítomnosti jiných autoprotilátek [tj. GADA, IA-2A a ICA] (Wenzelau J. M. et al., 2007).

Jsou považovány za vysoce specifické pro  $\beta$ -buňky, objevují se již v preklinickém stádiu diabetes mellitus 1. typu. Prokazatelné jsou jak v dětství (již od dvou až tří let věku), tak i v pozdní adolescenci (Lampasona V. et al., 2010; Wenzelau J. M. et al., 2007). Umožňují identifikovat pacienty s rapidnější progresí do manifestního diabetu (Lampasona V. et al., 2010). Po manifestaci cukrovky klesají velmi pozvolna, jsou tudíž užitečné u starších pacientů, u kterých s věkem jiné autoprotilátky mizí.

### **1.3.2 Význam specifických ostrůvkových autoprotilátek v klinické praxi**

Ostrůvkové autoprotilátky slouží zejména ke klasifikaci diabetes mellitus, k predikci rizika vzniku a progresu diabetes mellitus 1. typu, včetně odhadu nároků na jeho léčbu.

- *Diferenciální diagnostika diabetes mellitus*

V klinické praxi mají ostrůvkové autoprotilátky nezastupitelný význam především v diferenciální diagnostice diabetes mellitus 1. typu, včetně LADA (Latent Autoimmune Diabetes of the Adults). Jelikož se vyskytují u velké většiny pacientů v době manifestace cukrovky 1. typu (Sabbah E. et al., 1999), jsou považovány za jedno z hlavních diagnostických kritérií tohoto typu diabetu, v případě LADA jsou podmínkou pro klasifikaci (Triplitt C., et al., 2015). V současné klinické praxi se k tomuto účelu nejvíce využívají IA-2A a GADA.

- *Predikce rozvoje autoimunitního diabetu (diabetes mellitus 1. typu)*

K predikci vzniku diabetes mellitus 1. typu lze v současnosti využít všechny čtyři výše uvedené autoprotilátky. Na otázku která autoprotilátka je lepší prediktor, zda větší riziko představuje počet, určitá kombinace autoprotilátek nebo výše jejich titru, neexistuje v současné době jednoznačná odpověď a názory se různí. Podle řady studií je důležitý počet prokázaných autoprotilátek a doba jejich vzniku, jež koreluje s rizikem a progresí diabetu lépe než pořadí jejich objevení (Pihoker C. et al., 2005; Gardner S. G. Et al., 1999; Yoon J-W. & Jun H. S., 2005).

Podle americké studie Diabetes Prevention Trial (DPT-1) mají jedinci s dvěma a více autoprotilátkami 68% riziko vzniku diabetu do pěti let, jedinci se třemi autoprotilátkami téměř 100% (Verge C. F. et al., 1996). Nejsenzitivnějším markerem detekce mnohočetné protilátkové positivity je přítomnost GADA – až 91% jedinců s GADA má zároveň další autoprotilátku (Krischer J. P., et al., 2003). Nicméně u osob s jedinou autoprotilátkou (GADA) může být pro predikci diabetu důležitý samotný titer stanovené autoprotilátky (Lundgren V. M. et al., 2010).

- *Predikce klinického průběhu diabetu a terapeutické intervence*

Mnohočetná autoprotilátková pozitivita nebo přítomnost samotné GADA v době diagnostiky diabetu predikuje budoucí kompletní selhání  $\beta$ -buněk (Borg H. et al., 2002). GADA také predikují brzké selhání léčby perorálními antidiabetiky a nutnost zahájení inzulínoterapie (Littorin B. et al., 1999; Turner R. et al., 1997).

### **1.3.3 Prevalence specifických ostrůvkových autoprotilátek u jednotlivých typů diabetes mellitus**

Ostrůvkové autoprotilátky jsou prokazatelné nejčastěji u pacientů s diabetes mellitus 1. typu, včetně jeho pozdnější a méně progresivní formy – LADA. Řada studií prokázala výskyt specifických ostrůvkových autoprotilátek také u ~ 2-12% pacientů s jinými typy diabetes mellitus (např. s diabetes mellitus 2. typu), přičemž jejich exprese nebyla asociována s autoimunitní inzultidou (Towns R. & Pietropaolo M., 2011). Ojediněle se také mohou vyskytovat u různých autoimunitních chorob a v jinak zdravé (tj. nediabetické) populaci.

- *Diabetes mellitus 1. typu*

Autoprotilátky se objevují již v preklinickém stádiu cukrovky 1. typu (Pugliese A. et al., 1999) v souvislosti s probíhající (autoimunitní) inzultidou, která se rozvíjí zpravidla měsíce až léta před

vlastní manifestací diabetu (Gorsuch A. N. et al., 1981). V tomto období předpovídají ztrátu 1. fáze inzulínové sekrece (Keskinen P. et al., 2002). V době manifestace diabetu má alespoň jednu prokazatelnou autoprotilátku až 90% pacientů (Notkins A. L. & Lernmark Å., 2001), obvykle jsou pozitivní dvě a více autoprotilátek (Palmer J. P. et al., 2005).

Spektrum přítomných autoprotilátek je u jednotlivých pacientů různé. Předpokládá se, že na expresi autoprotilátek cílené na specifický autoantigen má modifikující vliv věk, pohlaví a HLA haplotypy (Graham J. et al., 2002; Ziegler R. et al., 1991; Pihoker C. et al., 2005). První autoprotilátka, která se obvykle objeví u dětí, je IAA (Yu L. I. et al., 1996; Ziegler A. G. et al., 1999). S postupem času mohou IAA vymizet (pravděpodobně paralelně s  $\beta$ -buněčnou destrukcí) a nahradit je např. GADA a IA-2A. U dospělých bývají častější GADA. Autoprotilátky v cirkulaci zůstávají různě dlouhou dobu. IA-2A s délkou trvání nemoci rapidně klesají, kdežto GADA zůstávají dlouho pozitivní. IAA se častěji vyskytují u jedinců nesoucích DR4 (Ziegler R. et al., 1991) a DQ8 (Graham J. et al., 2002). Vyšší frekvence výskytu GADA je známá u diabetiků 1. typu s rizikovými alelami HLA-DR3 nebo DQB1\*0201 (Graham J. et al., 2002). IA-2A se častěji objevují u jedinců s HLA DQ8 (Graham J. et al., 2002).

- *LADA*

U LADA se spektrum autoprotilátek v porovnání s diabetem 1. typu liší. U LADA pacientů častěji detekujeme pouze jednu autoprotilátku (Laugesen E. et al., 2015; Palmer J. P. et al., 2005), daleko nejčastěji GADA [vázané na DRB1\*03 (Novota P. et al., 2004)]. Přítomnost IA-2A a IAA je méně obvyklá (Naik R. G. & Palmer J. P., 2003). Počet přítomných autoprotilátek a výše titru koreluje s některými klinickými charakteristikami. Současná přítomnost více autoprotilátek anebo vysoký titr GADA je v porovnání s jednou autoprotilátkou a nízkým titrem, asociovaná s časnější manifestací diabetu, nízkou hodnotou lačného C-peptidu (reflektující sníženou  $\beta$ -buněčnou funkci), vyšší prediktivní hodnotou budoucí inzulíndependence, přítomností dalších autoimunitních chorob, nízkou prevalencí metabolického syndromu [tj. vysokého BMI (body mass index), arteriální hypertenze a dyslipidémie], a častějším výskytem HLA rizikového genotypu. Průkaz jen jedné autoprotilátky v nízkém titru naopak koreluje s manifestací diabetu v pozdějším věku, s pozvolnějším progresí v čase, typičtějším fenotypem diabetu 2. typu a s častějším výskytem metabolického syndromu (van Deutekom A. W. et al., 2008; Huang G. et al., 2016).

Hranice mezi klinicky zjevným diabetem 2. typu a LADA bývá vlastně tenká a způsobuje potíže v klasifikaci diabetu. Pacienti s autoprotilátkami a fenotypem diabetes mellitus 2. typu jsou někdy klasifikováni jako LADA nebo pomalu progredující typ diabetes mellitus 1. typu, latentní typ diabetu 1. typu, double diabetes nebo jako diabetes mellitus typu 1.5.

- *Diabetes mellitus 2. typu*

U diabetiků s „fenotypově“ typickým diabetes mellitus 2. typu mohou být ostrůvkové autoprotilátky detekovatelné s větší prevalencí v mladších věkových skupinách. Přítomnost alespoň jedné autoprotilátky (GADA, IA2A anebo IAA) je prokazatelná u téměř 30% dětí s cukrovkou 2. typu (Umpaichitra V. et al., 2002; Reinehr T. et al., 2006). Podobně byla prokázána přítomnost autoprotilátek také u dospělých diabetiků 2. typu (Brooks-Worrell B. M. et al., 2011), přičemž v obou

věkových skupinách byla i přes přítomnost autoprotilátek zachována inzulinová sekrece (na základě měření hladiny C-peptidu v séru).

- *Gestační diabetes mellitus*

Několik studií prokázalo přítomnost specifických ostrůvkových autoprotilátek v době diagnostiky gestačního diabetu (GDM). Prevalence je nižší než u pacientů s diabetem 1. typu – v případě IAA se pohybuje mezi 0-5.9%, IA-2A v rozmezí 0-6.2% a u GADA mezi 0-10.8%. Kombinace různých autoprotilátek je častá. Pozitivita autoprotilátek v průběhu těhotenství může reflektovat formu pomalu progredujícího autoimunitního diabetu a zvyšovat u pacientek s GDM riziko rozvoje diabetu krátce po porodu i v delším časovém horizontu (de Leiva A. et al., 2007; Fuchtenbusch M. et al., 2004).

- *Pankreatogenní diabetes mellitus*

V naší klinické praxi jsme se setkali s autoprotilátkami (GADA, IA-2A) také u pacientů s karcinomem pankreatu (Plíhalová A. et al., nepublikovaná data).

- *Autoimunitní choroby*

Některé ostrůvkové autoprotilátky (GADA, IA-2A, ZnT8A) se mohou vyskytovat i u jiných autoimunitně podmíněných chorob (Pihoker C. et al., 2005; Wenzlau J. M. et al., 2007). Nejčastěji se můžeme setkat s těmito autoprotilátkami u (nediabetických) pacientů s Hashimotovou tyreoiditidou (Aksoy D. Y. et al., 2006; Kawasaki E. et al., 1994), ale také s Graves-Basedowovou tyreoiditidou (Taniyama M. et al. 2010), celiakií (d'Annunzio G. et al., 2009), cerebelární ataxií a Stiffman syndromem (Solimena M. et al., 1988).

Frekvence výskytu GADA u nedibetiků s Hashimotovou tyreoiditidou se pohybuje okolo 5% (Aksoy D. Y. et al., 2006). V těchto případech nebylo prokázáno, že by samotná pozitivita GADA byla asociovaná s poruchou inzulinové senzitivity či inzulinové sekrece a účinku nebo že by předznamenávala vývoj diabetu (Aksoy D. Y. et al., 2006). Na druhou stranu průkaz GADA a zejména ZnT8A v době diagnostiky diabetu představuje (u neobězních diabetiků) několikanásobně vyšší riziko rozvoje autoimunitní tyreoiditidy (Kordonouri O. et al., 2011; Rogowicz-Frontczak A. et al., 2014). Podobně se GADA (bez vazby na  $\beta$ -celulární destrukci) objevuje u pacientů s Graves-Basedowovou tyreoiditidou a její prediktivní význam na rozvoj diabetu též není znám (Taniyama M. et al. 2010).

- *Zdravá populace*

Výskyt ostrůvkových autoprotilátek ve zdravé (nediabetické populaci) nepřekračuje 5% [GADA 0-2,5%, IA-2A 0-2,5%, obě autoprotilátky 0-0,1%, IA-2A/GADA 0-5%; ZnT8A < 2%] (Leslie R. D. et al., 1999; Wenzlau J. M. et al., 2007). Mnoho jedinců, jenž má ostrůvkové autoprotilátky, diabetem vůbec onemocní. Studie z Finska, kde je výskyt diabetes mellitus 1. typu velmi vysoký, zjistila, že diabetem onemocní pouze 26% mladých jedinců s GADA (v populaci nad 25 let), v porovnání

s pouhými 0,26% GADA-negativních jedinců, u nichž se diabetes nakonec vyvine (Knip M. et al., 2010).

- *Monogenní diabetes mellitus*

V literatuře je popsáno několik jednotlivých případů náhodně zjištěné positivity autoprotilátek u pacientů s MODY (Aguilera E. et al, 2005; Bowden S. A. et al, 2008; Calcaterra, V. et al., 2012; Ortega-Rodrigues E. et al., 2001) [Tab. 2]. První studii, která se zmiňuje o prevalenci ostrůvkových autoprotilátek u pacientů s monogenním diabetem (pocházejících z Německa a Rakouska) publikovala Schoberová (byť to primárně nebylo jejím cílem). Autoprotilátky se mezi těmito pacienty vyskytovaly překvapivě až v 17% případů (Schober E. et al., 2009). Nicméně asi u 20% jedinců zařazených do studie byla diagnóza monogenního diabetu stanovena pouze na základě klinických údajů, bez molekulárně genetické verifikace.

McDonald a kolektiv autorů vyšetřovali přítomnost GADA a IA-2A u pacientů s nejběžnějšími formami recentně zjištěného MODY (*GCK*-, *HNF1A*- a *HNF4A*-MODY) v porovnání s nově diagnostikovanými diabetiky 1. typu (tj. do 6 měsíců od manifestace cukrovky), s cílem posoudit jejich schopnost odlišit diabetes mellitus 1. typu od monogenního diabetu (McDonald T. J. et al., 2011). Přítomné autoprotilátky mělo 82% diabetiků 1. typu a méně než 1% MODY pacientů, tedy podobně jako zdravé kontroly. V MODY skupině byly navíc prokazatelné pouze GADA. Detekci ostrůvkových autoprotilátek (zejména pak IA-2A) v době diagnostiky diabetu tak považují autoři této studie za dostatečně senzitivní marker diferenciální diagnostiky monogenního diabetu a diabetes mellitus 1. typu.

**Tab. 2. Přehled publikovaných případů MODY pacientů s ostrůvkovými autoprotilátkami**

| <b>Autor studie</b>                     | <b>Předpokládaný typ diabetes mellitus</b>              | <b>Autoprotilátky</b>     | <b>Mutace nalezené v MODY genech</b>                 | <b>Rodinná anamnéza diabetu</b>                                   |
|---|---|---------------------------|--|---|
| <i>Aguilera E. et al., 2005</i>         | Diabetes mellitus 1. typu                               | Pozitivní                 | Mutace (varianta v exonu 5 Ser165Gly) v <i>HNF4A</i> | Otec – nositel mutace, glukózová tolerance normální               |
| <i>Bowden S. A. et al., 2008</i>        | Diabetes mellitus 2. typu, nadváha, metabolický syndrom | Pozitivní ICA a GADA      | Mutace (T196A) v <i>HNF1A</i> genu                   | Pozitivní (genetika u rodinných příslušníků nevyšetřena)          |
| <i>Calcaterra V. et al., 2012</i>       | Diabetes mellitus 1. typu, metabolický syndrom          | Pozitivní GADA a IA2A     | Mutace (L134P) v <i>GCK</i> genu                     | Matka, dvě matčiny sestry a jejich dvě děti – mírná hyperglykémie |
| <i>Maltoni G. et al., 2012</i>          | Diabetes mellitus 1. typu                               | Pozitivní ICA a GADA      | Mutace (IVS+2T>A) v <i>GCK</i> genu                  | Otec, strýc a babička – nositelé mutace, mírná hyperglykémie      |
|   | Diabetes mellitus 1. typu                               | Pozitivní ICA a GADA      | Mutace (p.G31D) v <i>HNF1A</i> genu                  | Matka – nositelka mutace, glukózová tolerance normální            |
| <i>Ortega-Rodrigues E. et al., 2001</i> | Diabetes mellitus 1. typu                               | Pozitivní ICA, GADA a IAA | Mutace (G279A) v <i>GCK</i> genu                     | Matka, bratr – nositelé mutace, diabetes mellitus                 |

MODY – maturity onset diabetes of the young; HNF1A – hepatální nukleární faktor 1 $\alpha$ ; HNF4A – hepatální nukleární faktor 4 $\alpha$ ; GCK – glukokináza; ICA – autoprotilátky proti cytoplasmě ostrůvkových buněk; GADA – autoprotilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové; IAA – autoprotilátky proti inzulínu

## 2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

Testování ostrůvkových autoprotilátek je v současné době rutinně prováděno k odlišení diabetes mellitus 1. typu od jiných typů cukrovky, včetně MODY. Mezinárodně platná a uznávaná diagnostická kritéria MODY zahrnují absenci ostrůvkových autoprotilátek (Ellard S. et al., 2008). V drtivé většině

případů se proto nákladně molekulárně genetické vyšetření na MODY provádí až po jejich rutinním laboratorním vyloučení. Pacienti s pozitivním nálezem GADA anebo IA-2A jsou obvykle z genetického testování vyloučeni.

Zahraniční literatura (i naše vlastní klinické zkušenosti) však popisuje reálné případy MODY pacientů s pozitivními ostrůvkovými autoprotilátkami. Mylná interpretace jejich nálezu přitom může vést k diagnostice nesprávného typu diabetes mellitus a konečně k volbě neadekvátní léčebné strategie a podcenění reálné prognózy takového pacienta. Správná diferenciální diagnostika MODY versus diabetes mellitus 1. typu nebo LADA je klíčová, jelikož umožňuje:

- přesnější individualizaci léčby,
- kvalitní predikci a monitorování diabetických komplikací,
- efektivnější stanovení dědičných rizik.

Významný počet MODY pacientů totiž může být léčen deriváty sulfonylurey (tj. perorální cestou) namísto inzulínu (v podobě podkožních injekcí). Navíc spektrum a prevalence akutních a pravděpodobně i chronických diabetických komplikací se u diabetiků 1. typu a LADA pacientů liší v porovnání s konkrétním typem MODY. Diferenciální diagnostika MODY umožňuje jejich lepší predikci a efektivnější monitoring. MODY též může být predikován na základě genetického testování u potomků probanda, což umožňuje časnou detekci příznaků rozvíjející se cukrovky a okamžitou léčbu předcházející její manifestaci.

Ačkoliv benefitů správné diferenciální diagnostiky MODY je mnoho, aktuální selekční kritéria pro genetické testování mutací asociovaných s MODY stále nemohou zajistit dostatečnou selektivitu a specificitu; dokonce mohou vést k vyloučení některých MODY pacientů z genetického testování. Takovým příkladem může být právě přítomnost ostrůvkových autoprotilátek.

## 2.1 Cíle práce

V naší klinické praxi jsme se opakovaně setkali s jednotlivými případy pacientů s MODY, u kterých byla zároveň náhodně laboratorně zdokumentována přítomnost ostrůvkových autoprotilátek (Urbanová J. et al., 2011, posterové sdělení). Na základě těchto překvapivých nálezů jsme se rozhodli:

- zdokumentovat *výskyt ostrůvkových autoprotilátek v kohortě českých pacientů s MODY;*
- zodpovědět *pravděpodobnou primární příčinu jejich sekrece.*

Základním cílem této práce bylo:

- *stanovit specifické ostrůvkové autoprotilátky u všech námi doposud vyšetřených MODY pacientů a zjistit tak jejich skutečnou prevalenci mezi českými MODY pacienty (v porovnání s prevalencí ostrůvkových autoprotilátek u kontrolní skupiny českých diabetiků 1. typu a LADA);*
- *sledovat a posoudit dynamiku autoprotilátkové sekrece v čase;*

- *popsat skupinu MODY pacientů s ostrůvkovými autoprotilátkami (v porovnání s MODY pacienty bez ostrůvkových autoprotilátek) v širším klinickém kontextu;*
- *na základě zjištěných souvislostí blíže specifikovat příčinu jejich produkce.*

Konečným cílem je na základě zjištěných údajů *revidovat diferencially diagnostická kritéria MODY a indikační kritéria k provedení molekulárně genetického vyšetření na MODY.*

## 2.2 Hypotézy

Sekrece specifických ostrůvkových autoprotilátek u pacientů s MODY by mohla mít dvojitou podstatu:

- *mohla by signalizovat vývoj diabetes mellitus 1. typu či LADA (v koexistenci s MODY);*
- *mohla by reflektovat primárně neautoimunitní destrukci  $\beta$ -buněk aktivující imunitní systém, jež sekundárně iniciuje protilátkovou sekreci. Přítomnost specifických autoprotilátek by tak mohla potencionálně odrážet období  $\beta$ -buněčné destrukce, která byla příčinou (ne následkem) pozorovaného autoimunitního procesu.*

A) *Přítomnost ostrůvkových autoprotilátek může predikovat vznik či přímo signalizovat koexistenci diabetes mellitus 1. typu s MODY*

Tak jako se u MODY diabetiků může rozvinout při obezitě diabetes mellitus 2. typu, není vyloučeno, že u geneticky determinovaných jedinců s MODY nemůže dojít také ke vzniku diabetes mellitus 1. typu. V kontextu s nosičstvím rizikových alel [reprezentované HLA-DR3 a HLA-DR4 (Cejkova P. et al., 2008)] mohou ostrůvkové autoprotilátky v preklinickém stádiu predikovat vznik diabetes mellitus 1. typu v blízké budoucnosti.

Takový stav by byl provázen progresivní dysfunkcí  $\beta$ -buněk a nakonec úplným vyhasnutím endogenní inzulínové sekrece, jež by se časně manifestoval typickou symptomatologií diabetes mellitus 1. typu s ketoacidózou a úplnou inzulínodependencí.

B) *Ostrůvkové autoprotilátky mohou být u MODY asociovány s autoimunitním diabetem s pozvolnou progresí – LADA*

Přítomnost ostrůvkových autoprotilátek může naznačovat také rozvoj LADA u geneticky predisponovaných MODY pacientů. Genetické riziko pro vznik LADA je spjato s nízkou frekvencí protektivních HLA genotypů diabetes mellitus 1. typu, zejména HLA DQA1-DQB1\*0102(3)-\*0602(3)/X (Stenström G. et al., 2002).

V takovém případě by došlo k pozvolnému selhávání  $\beta$ -buněk a brzkému zahájení injekční terapie inzulínem.

C) *Přítomnost ostrůvkových autoprotilátek může odrážet  $\beta$ -buněčnou destrukci podmíněnou různými (tj. neautoimunitními) mechanismy*



Fungování  $\beta$ -buněk závisí jednak na normální regulaci inzulínové syntézy a sekrece, a jednak na udržení funkční  $\beta$ -buněčné masy. Hlavní formou  $\beta$ -celulární regenerace je replikace stávajících buněk. Neogeneze  $\beta$ -buněk (de novo formace) probíhá u lidských jedinců z kmenových buněk nebo z jiných prekursorových buněk, zřejmě duktálních (Bonner-Weir S. et al., 2010), a je nejspíše řízena sítí transkripčních faktorů, včetně HNF-4 $\alpha$  a HNF-1 $\alpha$ . Na druhé straně, klíčovým mechanismem  $\beta$ -celulární smrti je apoptóza.

Křehká rovnováha mezi  $\beta$ -celulární obnovou a destrukcí je determinována genetickými faktory a ovlivňována environmentálními podněty. Snadno tak může být narušena nejrůznějšími vlivy – genetickou predispozicí, pohlavím, intrauterinním prostředím, stárnutím, životním stylem (dieta, cvičení), infekcí, střevní mikroflórou, těhotenstvím, krevním zásobením a nervovou inervací, tkáňovou komunikací mezi buňkami (včetně signálů z GIT) nebo též metabolickým stresem, záněty a autoimunitou. Genetická predispozice (ale také např. věk) ovlivní, jak na nejrůznější stresory (tj. výše zmíněné imunitní, zánětlivé, infekční, metabolické aj. vlivy)  $\beta$ -buňky konkrétního jedince zareagují (Mandrup-Poulsen T., 2001).

Porucha buněčné kinetiky (regenerace vs. buněčná smrt), nakloněná blíže zániku buněk, je významnou součástí patofyziologie diabetes mellitus jako takového a může být pojátkem při pátrání po příčině protilátkové sekrece napříč tak heterogenní skupinou onemocnění jakým je diabetes mellitus. Postupný úbytek  $\beta$ -buněk při převažující buněčné destrukci je dobře znám u diabetes mellitus 1. a 2. typu (Weir G. C. & Bonner-Weir, S., 2004) a byl experimentálně detekován i u MODY (Uchizono Y. et al., 2009). Hlavní formou takového zániku  $\beta$ -buněk je apoptóza, ovšem nelze vyloučit ani podíl nekrózy na destrukci  $\beta$ -buněk, např. v průběhu progresu cukrovky (Cnop M. et al., 2005; Mathis D. et al., 2001). Relativní význam autofagie a dalších mechanismů buněčné smrti je zatím nejasná.

Budeme-li předpokládat, že ve většině případů nedetekujeme autoprotilátky namířené proti antigenu exponovanému na buněčném povrchu, ale v cytoplasmě, lze se domnívat, že se tyto autoantigeny mohly setkat s imunitním systémem až po destrukci  $\beta$ -buněk, způsobené různými činiteli, ať již primárně autoimunitními (u diabetes mellitus 1. typu) či neautoimunitními (diabetes mellitus 2. typu a MODY). Vystává tedy otázka, zda může být rozpad  $\beta$ -buněk (bez ohledu na primární příčinu) v menší či větší míře provázen (stálou či transientní) produkcí specifických ostrůvkových autoprotilátek.

U diabetes mellitus 1. typu jsou pravděpodobně nejběžněji detekovatelné autoprotilátky proti IA-2 a GAD produkovány následkem destrukce drtivé většiny  $\beta$ -buněk v důsledku inzulitidy na popud nějakého (např. virového) antigenu. Uniklý sekvestr IA-2 či GAD antigenu posléze indukuje humorální imunitní odpověď (Leslie R. D. et al., 1999). IA-2 a GAD ale mohou být i vlastním primárním cílem imunitního systému, tj. autoantigenem. Jiným možným vysvětlením přítomnosti ostrůvkových autoprotilátek jsou „molekulární mimikry“, kdy je imunitní odpověď sice řízena proti patogennímu antigenu, ovšem obsahující homologní sekvence jako tělu vlastní antigen [např. podobnost GAD<sub>65</sub> peptidu 247-279 s P2-C proteinem Coxackie viru nebo VP7 proteinu lidského rotaviru s IA-2 (Honeyman M. C. et al., 2010; Leslie R. D. et al., 1999)].

U diabetes mellitus 2. typu dochází k destrukci  $\beta$ -buněk nepochybně vlivem glukotoxicity, lipotoxicity, oxidačního stresu a dalších metabolických faktorů, včetně amyloidózy (Cnop M. et al., 2005). Rizikem zániku  $\beta$ -buněk hrozí také enormní potřeba inzulínu při inzulínové rezistenci, daleko převyšující sekreční kapacitu nepřiměřeně zatížených  $\beta$ -buněk (Prentki M. & Nolan C. J., 2006). Nelze vyloučit, že při zániku ostrůvkových buněk, se podobně jako u diabetes mellitus 1. typu neuvolní intracelulární antigen indukující protilátkovou sekreci.

Mutací *HNF4A* a *HNF1A* genu zase dochází k alteraci exprese genů ovlivňující buněčný růst a proliferaci. Pokles celkového obratu pankreatických  $\beta$ -buněk (nárůstu apoptózy a snížení schopnosti proliferace) byl prokázán na zvířecích i buněčných modelech (Uchizono Y. et al., 2009; Wobser H. et al., 2002). U *HNF1A*-MODY pacientů by mohlo snížení buněčné proliferace a aktivace mitochondriální cesty apoptózy přispívat k progresivní deterioraci  $\beta$ -buněčné funkce.

Postupná destrukce a kulminující selhání  $\beta$ -buněk je v každém případě multifaktoriální proces, ať už je iniciální příčinou cokoliv. V momentě, kdy celková  $\beta$ -buněčná masa a její funkce klesne pod kritickou hranici, stanou se  $\beta$ -buňky terčem prohlubujícího se metabolického stresu ze strany glukózy a volných mastných kyselin (Mandrup-Poulsen T., 2001; Němcová-Fürstová V. et al., 2011). Nerovnováha mezi (nedostatečnou) inzulínovou sekrecí a (obvyklými či zvýšenými) nároky organismu na inzulínovou produkci spustí bludný kruh událostí, gradující k rostoucí hyperglykémii a hyperlipidémii, jež kulminuje v další kvantitativní úbytek inzulínové sekrece a pokles funkční kapacity  $\beta$ -buněk. Jakkoliv je tedy diabetes mellitus heterogenní skupinou onemocnění, lze předpokládat, že minimálně pod vlivem metabolických faktorů se mohou jednotlivé signální cesty  $\beta$ -celulární destrukce (iniciované primárně různými faktory) sbíhat do jedné společné, kterou eventuálně může provázet aktivace imunitního systému (intracelulárními proteiny) a tvorba příslušných ostrůvkových autoprotilátek.

Domníváme se, že prakticky jakýkoliv destruktivní proces postihující Langerhansovy ostrůvky může potencionálně zapříčinit expresi autoprotilátek (Příloha 2). Příčinné faktory mohou zahrnovat infekční agens, jak je předpokládáno u diabetes mellitus 1. typu [pankreatotropní virová infekce (Leslie R. D. et al., 1999)], toxický metabolický efekt hyperglykémie a dyslipidémie (Mandrup-Poulsen T., 2001; Němcová-Fürstová V. et al., 2011), prolongovanou nadměrnou funkční stimulaci a námahu (Prentki M. & Nolan C. J., 2006) a defektní buněčný obrat ve spojitosti s mutací v genech pro transkripční faktory *HNF1A* nebo *HNF4A* (Uchizono Z. et al., 2009).

### 3. METODIKA

V náhodně vybrané skupině pacientů s molekulárně geneticky potvrzeným monogenním diabetem, byly stanoveny definované klinické a laboratorní parametry (včetně specifických ostrůvkových autoprotilátek), a stanoven HLA genotyp. Přítomnost či absence autoprotilátek byla posuzována jak v klinickém kontextu, tak i v kontextu se zjištěnými laboratorními parametry.

Psaný informovaný souhlas byl získán od všech pacientů. Studie byla též odsouhlasena místní etickou komisí.

### 3.1 Molekulárně genetické vyšetření

U všech pacientů zařazených do studie byla izolována DNA a provedeno genetické testování somatických mutací v sekvencích exonů a přilehlých intronových oblastí *HNF1A*, *HNF4A* a *GCK* genů, pomocí obousměrného Sanger sekvenování.

DNA pro genetické vyšetření byla získána z periferní (antikoagulované) krve (do EDTA) za použití QIAamp DNA kitu. Primery všech exonů *HNF1A*, *HNF4A* a *GCK* genů byly vytvořeny pomocí Genamic Expression softwaru; pro promotorové oblasti byly použity dříve použité primery. Primery byly vytvořeny k vyšetření všech exonů a přilehlých intronových oblastí. PCR produkty byly čištěny pomocí ExoSAP-IT1 (USB corporation). Přímé sekvenovací reakce byly provedeny za pomoci BigDye1 Terminator v3.1, přídatné chemikálie byly odstraněny pomocí BigDye XTerminator1 Purification Kitu. Sekvenování bylo provedeno na ABI PRISM 3130 genetickém analyzátoru (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a výsledky stanoveny pomocí SeqScape softwaru.

Vyšetření pacienti byli indikováni ke genetickému testování na MODY na základě následujících kritérií:

- rodinná anamnéza diabetes mellitus (popř. poruchy glukózové homeostázi, definované jako porucha glykémie nalačno a porucha glukózové tolerance), nejméně ve dvou generacích (Příloha 1);
- manifestace diabetes mellitus u štíhlých ( $BMI < 30 \text{ kg/m}^2$ ) mladistvých nebo dospělých;
- absence diabetické ketoacidózy v osobní anamnéze;
- zachovalá inzulinová sekrece (hodnocená pomocí hladiny lačného C-peptidu);

nebo

- perzistentní mírná hyperglykémie s nízkým vzestupem glykémie při orálním glukózovém tolerančním testu (oGTT) [pouze u GCK-MODY].

### 3.2 Charakteristika sledované kohorty pacientů s monogenním diabetem

Studovaná kohorta se skládala z 28 českých MODY pacientů s molekulárně geneticky verifikovanou mutací v *HNF4A* ( $n = 5$ ), *HNF1A* ( $n = 13$ ) nebo *GCK* genu ( $n = 10$ ). Z toho bylo 10 mužů a 18 žen.

Od všech pacientů byla získána podrobná anamnestická data (Tab. 3). Ke zjišťovaným klinickým údajům patřil:

- věk v době manifestace, resp. diagnostiky diabetes mellitus;
- délka trvání cukrovky;
- aktuální tělesná hmotnost a výška;
- přítomnost diabetické ketoacidózy v osobní anamnéze;
- minulá a současná léčba diabetu.

**Tab. 3** Charakteristika pacientů zařazených do studie

| <b>Charakteristiky</b>                                   |               |
|--|---------------|
| <b>Pohlaví</b>   |               |
| Muž  | 10            |
| Žena   | 18            |
| <b>Typ diabetes mellitus</b>                             |               |
| - HNF4A-MODY   | 5             |
| - HNF1A-MODY   | 13            |
| - GCK-MODY   | 10            |
| <b>Věk v době vzniku diabetes mellitus [roky]</b>        | 21.4 ± 11.3   |
| - HNF4A-MODY   | 20.6 ± 9.4    |
| - HNF1A-MODY   | 21.1 ± 12     |
| - GCK-MODY   | 22.2 ± 11.2   |
| <b>Trvání diabetu [roky]*</b>                            | 14.2 ± 11.7   |
| <b>BMI [kg*m<sup>2</sup>]</b>                            | 24.5 ± 4.3    |
| <b>HbA1c [mmol*<sup>-1</sup>mol<sup>-1</sup> (%)]</b>    | 63.3 ± 19.3   |
| - HNF4A-MODY   | 69 ± 19.3     |
| - HNF1A-MODY   | 72.1 ± 18.8   |
| - GCK-MODY   | 47.6 ± 4.6    |
| <b>Lačný C-peptid [pmol*<sup>-1</sup>l<sup>-1</sup>]</b> | 343.7 ± 189.1 |
| <b>Episody ketoacidózy [počet pacientů]</b>              | 1             |
| <b>Typ léčby</b>   |               |
| - Dieta  | 9             |
| - PAD  | 10            |
| - Inzulín (IIT)  | 7             |
| - PAD + inzulín  | 2 **          |

MODY – maturity onset diabetes of the young; HNF1A – hepatální nukleární faktor 1 $\alpha$ ; HNF4A – hepatální nukleární faktor 4 $\alpha$ ; GCK – glukokináza; BMI – body mass index; HbA1c – glykovaný hemoglobin; IIT – intenzifikovaný inzulínový režim, PAD – perorální antidiabetika; SUR - deriváty sulfonylurey

\* Délka trvání diabetu je vyjádřena jako počet let uplynulých mezi dobou manifestace a stanovením autoprotilátek. \* \* Kombinace SUR + NPH inzulín (středně dlouze působící humánní inzulín) nebo metformin + IIT.

### 3.3 Vyšetření ostrůvkových autoprotilátek

Hladina GADA a IA2A v primárním séru (bez CaCl<sub>2</sub> nebo trombinu) byla detekována enzymovou immunoassay (Medipan GmbH, Dahlewitz, Germany), kalibrována na referenční materiál NIBSC 97/550. Analytická senzitivita byla 0.8 IU\*ml<sup>-1</sup> pro GADA a 0.5 IU\*ml<sup>-1</sup> pro IA-2A. Nejzazší hodnota klinické významnosti byla určena na hladině 5 IU\*ml<sup>-1</sup> pro GADA a 10 IU\*ml<sup>-1</sup> pro IA-2A.

Senzitivita a specifická použitá imunoassaye byla potvrzena na dvou kohortách kontrol za použití analytické ROC (Receiver Operating Characteristic) křivky, kalkulované v programu JLABROC4 v. 1.0.1. K tomu byly použity číselné hodnoty GADA a IA-2A hladin MODY pacientů a obou kontrolních skupin. Negativní kontrola se skládala z českých nediabetiků a pozitivní kontrola z českých pacientů s klinicky definovaným diabetes mellitus 1. typu nebo LADA, s lačným imunoreaktivním C-peptidem pod  $300 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Ostrůvkové autoprottilátky byly stanoveny minimálně dvakrát. Retrospektivně byla analyzována také minulá laboratorní vyšetření ostrůvkových autoprottilátek nacházející se v lékařské dokumentaci jednotlivých pacientů (pokud byla provedena na stejném pracovišti podle výše uvedeného postupu). Pokud nebylo možné zajistit kontinuitu opakovaného stanovení ostrůvkových autoprottilátek, byli pacienti z dlouhodobého sledování vyřazeni.

### 3.4 Vyšetřované klinické a laboratorní parametry

V době měření ostrůvkových autoprottilátek byly stanoveny následující klinické a laboratorní parametry:

- body mass index (BMI);
- glykovaný hemoglobin (HbA1c);
- hladina C-peptidu nalačno a
- HLA genotyp.

BMI ( $\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$ ) byl kalkulován z výšky a aktuální tělesné váhy zjištěné v době měření autoprottilátek [normální rozmezí  $18.5\text{-}25 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ ]. HbA1c byl stanoven pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na bázi referenční metody IFCC (International Federation of the Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) a vyjádřen v jednotkách  $\text{mmol} \cdot \text{mol}^{-1}$  [normální rozmezí  $20\text{-}42 \text{ mmol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]. Lačný sérový C-peptid byl stanoven chemiluminiscenční imunoassay (Immulite 2000; Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) v  $\text{pmol} \cdot \text{l}^{-1}$  [normální rozmezí  $268\text{-}1274 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ , cut-off  $33 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ].

BMI, HbA1c, lačný C-peptid a specifické autoprottilátky byli v celé skupině MODY pacientů sledováni a analyzováni v průběhu let 2004-2013. Měření autoprottilátek bylo prováděno náhodně dle klinických kontrol pacientů.

HLA-DRB1 a HLA-DQB1 genotyp [vysoce rizikový pro diabetes mellitus 1. typu (Thompson G. et al., 2007)] byl stanoven pomocí PCR (polymerázové řetězové reakce) se sekvenčně specifickými primery [Olerup SSP AB, Stockholm, Sweden].

### 3.5 Statistické zpracování

Pokud není uvedeno jinak, data jsou vyjádřena jako průměry  $\pm$  směrodatná odchylka (SO). Provedené testy zahrnují dvouvzorkový t-test a jednosměrnou analýzu rozptylu (ANOVA) s Tureckými post-testy. Analýza byla provedena v PAST verzi 2.14.

Ve statistické analýze GADA a IA-2A jsou zahrnuty hodnoty AUC (area under the curve)  $\pm$  SO vycházející z analýzy ROC (Receiver Operating Characteristic) křivky a  $p$  hodnoty Fisherova exaktního testu (Tab. 4). ROC analýza využívá syrová číselná data (souvislou ratingovou stupnici). Fisherův test využívá sloučená binární data. K rozlišení mezi negativními a pozitivními hodnotami byla určena arbitrární cut-off hodnota 5.0 IU\*ml<sup>-1</sup> v případě GADA a 10.0 IU\*ml<sup>-1</sup> v případě IA-2A. Zdrojová data jsou uvedena v tabulce 5 a 6. ROC analýza byla provedena v JLABROC4 v. 1.0.1; Fisherovi exaktní testy byly provedeny v programu PAST v. 2.14.

**Tab. 4** Statistická analýza GADA a IA2A

Zahrnuty jsou: AUC (area under the curve – plocha pod křivkou) hodnoty  $\pm$  S.O. (směrodatná odchylka) vycházející z analýzy křivky ROC (receiver operating characteristic), a  $p$  hodnoty Fisherova exaktního testu.

| Skupina 1 (pozitivní) | n1 | Skupina 2 (negativní) | n2 | AUC $\pm$ S.O.                      | $p$ hodnota      |
|-----------------------|----|-----------------------|----|-------------------------------------|------------------|
| <b>GADA</b>           |    |                       |    |                                     |                  |
| MODY                  | 28 | Ne-diabetici          | 89 | 0.505 $\pm$ 0.095                   | 0.002            |
| DM1T nebo LADA        | 91 | Ne-diabetici          | 89 | 0.704 $\pm$ 0.048                   | < 0.001          |
| DM1T nebo LADA        | 28 | MODY                  | 91 | <b>0.672 <math>\pm</math> 0.205</b> | <b>0.029</b>     |
| <b>IA2A</b>           |    |                       |    |                                     |                  |
| MODY                  | 28 | Ne-diabetici          | 88 | 0.667 $\pm$ 0.083                   | > 0.05           |
| DM1T nebo LADA        | 91 | Ne-diabetici          | 88 | 0.622 $\pm$ 0.061                   | < 0.001          |
| DM1T nebo LADA        | 28 | MODY                  | 91 | <b>0.508 <math>\pm</math> 0.061</b> | 0.004            |
| <b>GADA a IA2A</b>    |    |                       |    |                                     |                  |
| MODY                  | 28 | Ne-diabetici          | 88 | N / A                               | > 0.05           |
| DM1T nebo LADA        | 91 | Ne-diabetici          | 88 | N / A                               | < 0.001          |
| DM1T nebo LADA        | 28 | MODY                  | 91 | N / A                               | <b>&gt; 0.05</b> |
| <b>GADA nebo IA2A</b> |    |                       |    |                                     |                  |
| MODY                  | 28 | Ne-diabetici          | 89 | N / A                               | 0.003            |
| DM1T nebo LADA        | 91 | Ne-diabetici          | 89 | N / A                               | <0.001           |
| DM1T nebo LADA        | 28 | MODY                  | 91 | N / A                               | <b>0.001</b>     |

MODY – maturity onset diabetes of the young; GADA – autoantilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové; IA2A – autoantilátky proti tyrozin fosfatáze; D1TM – diabetes mellitus 1. typu, LADA – latent autoimmune diabetes in the adults

**Tab. 5** Validace sensitivity a specificity detekce GADA a IA2A na kohortě českých ne-diabetiků a kohortě českých pacientů s diabetes mellitus 1. typu nebo LADA, s imunoreaktivním C-peptidem (IRCP) pod 300 pmol\*I-1.

|                       | DM1T nebo LADA | Ne-diabetici |
|-----------------------|----------------|--------------|
| <b>GADA</b>           |                |              |
| Průměr                | 75.3           | 3.8          |
| S.O.                  | 102.6          | 26.4         |
| Min                   | 0.0            | 0.0          |
| Max                   | 250.0          | 250.0        |
| n                     | 91             | 89           |
| n nad cut off (%)     | 46 (51 %)      | 3 (3 %)      |
| <b>IA2A</b>           |                |              |
| Průměr                | 30.5           | 0.8          |
| S.O.                  | 89.8           | 2.4          |
| Min                   | 0.0            | 0.0          |
| Max                   | 400.0          | 20.6         |
| N                     | 91             | 88           |
| n nad cut off (%)     | 26 (29 %)      | 1 (1 %)      |
| <b>GADA a IA2A</b>    |                |              |
| n                     | 91             | 88           |
| n over cut off (%)    | 17 (19 %)      | 0 (0 %)      |
| <b>GADA nebo IA2A</b> |                |              |
| n                     | 91             | 88           |
| n nad cut off (%)     | 55 (60 %)      | 4 (5 %)      |

GADA – autoprotiátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové; IA2A – autoprotiátky proti tyrozin fosfatáze; DM1T – diabetes mellitus 1. typu, LADA – latent autoimmune diabetes in the adults; S.O. – směrodatná odchylka; n – počet

## 4. VÝSLEDKY

Na naší klinice jsme se setkali s pacientkou s dlouhodobou anamnézou diabetes mellitus 1. typu a signifikantní pozitivitou GADA (250 IU/ml; IA-2A negativní), která byla opakovaně hospitalizována pro diabetickou ketoacidózu při neadekvátní substituci inzulínem. U této pacientky jsme překvapivě – vzhledem ke zřetelné rodinné anamnéze dvougeneračního výskytu diabetu a nezvykle pomalé ztrátě sekreční funkce  $\beta$ -buněk (trvajících déle než 20 let) – molekulárně geneticky prokázali missence mutaci (Ala158Val, c.473C>T) v *HNF4A* genu a monogenní diabetes *HNF4A*-MODY. Následné pátrání po přítomnosti autoprotilátek mezi dalšími našimi MODY pacienty, objevilo i další případy v jednotlivých rodinách.

### 4.1 Příklad *HNF1A*-MODY rodiny s ostrůvkovými autoprotilátkami

Jako první jsme popsali *rodinou manifestaci ostrůvkových autoprotilátek* v rodině neobézních *HNF1A*-MODY pacientů (Urbanová J. et al., 2013). Jednalo se o tři pacienty ve věku od 14 do 35 let s prokázanou mutací v *HNF1A* genu (p. Arg159Gln), kteří exprimovali GADA nebo IA-2A při nepřítomnosti dalších znaků diabetes mellitus 1. typu (Graf 1). Hodnoty autoprotilátek však byly vysoce variabilní. Průběh onemocnění byl podobný jako u *HNF1A*-MODY pacientů bez autoprotilátek, ačkoliv bylo na inzulínoterapii dosaženo lepší kompenzace. Na tomto případě jsme zároveň jako první popsali *vzácnou přítomnost IA2A u jedince s MODY*.

U probanda (\*1978) byl diagnostikován diabetes na základě náhodné detekce glykosurie ve 14 letech. Pro zdánlivý diabetes mellitus 1. typu byla léčena inzulínem. Inzulínoterapie byla pacientkou spontánně vysazena v 19 letech, avšak bez následného rozvoje diabetické ketoacidózy. O několik let později bylo pro klinicky zjevnou pomalou progresi onemocnění a laboratorně verifikovanou perzistentní inzulínovou sekreci provedeno genetické vyšetření potvrzující *HNF1A*-MODY. Pacientka byla převedena na perorální léčbu glibenklamidem a později nahrazena gliklazidem. Zřejmě vlivem špatné compliance (svévolné vysazování medikace) nebyla léčba diabetu uspokojivá (vyjádřeno vysokou lačnou glykemií a hodnotou HbA1c) [Graf 2]. Tato pacientka již trpěla neproliferativní diabetickou retinopatií.

U matky probanda (\*1950) byl diabetes diagnostikován v 15 letech, a vždy byl léčen inzulínem. Stejně jako u její dcery nemoc progredovala pomalu (bez poklesu lačného C-peptidu). Po diagnostice *HNF1A*-MODY byla léčba změněna na glibenklamid, avšak uspokojivé kompenzace bylo dosaženo až po přidání inzulínu k derivátům sulfonylurey (Graf 2).

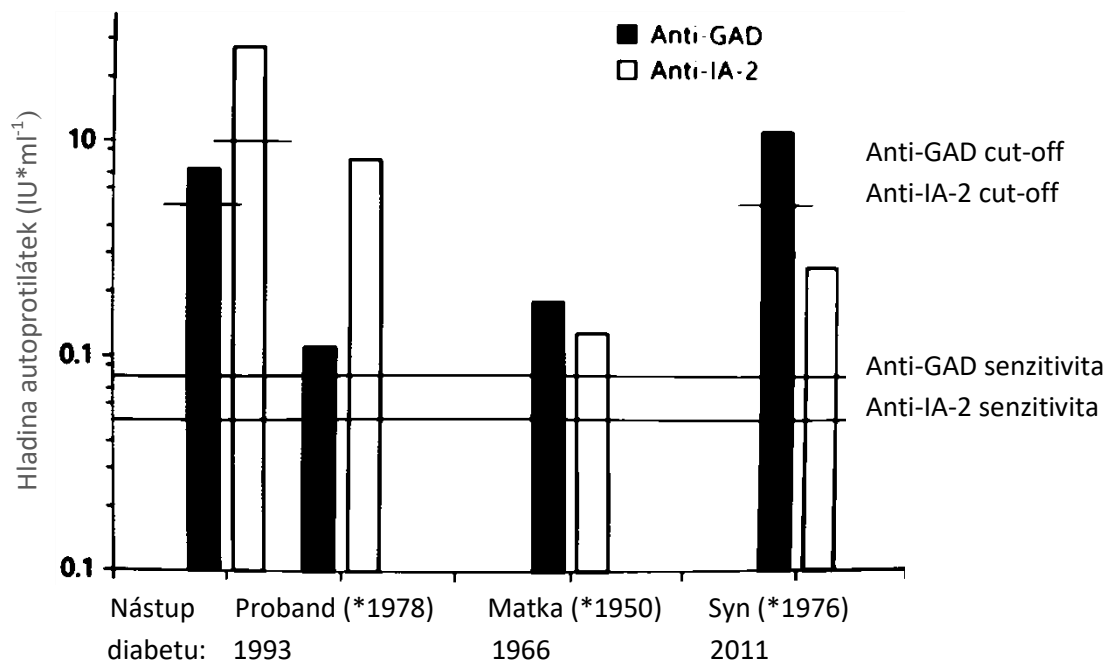
U babičky probanda [matka matky probanda] (\*1923) se příznaky diabetu objevily okolo 30. roku života. Byla léčena inzulínem od svých 45 let. Zemřela v 74 letech následkem recidivujících mozkových příhod.

U bratra probanda (\*1976) byl diabetes diagnostikován v 35 letech. V době diagnózy byla přítomna kombinovaná dyslipidémie a nadváha. Pacient byl uspokojivě léčen po zavedení režimových opatření a léčby glibenklamidem (Graf 2).



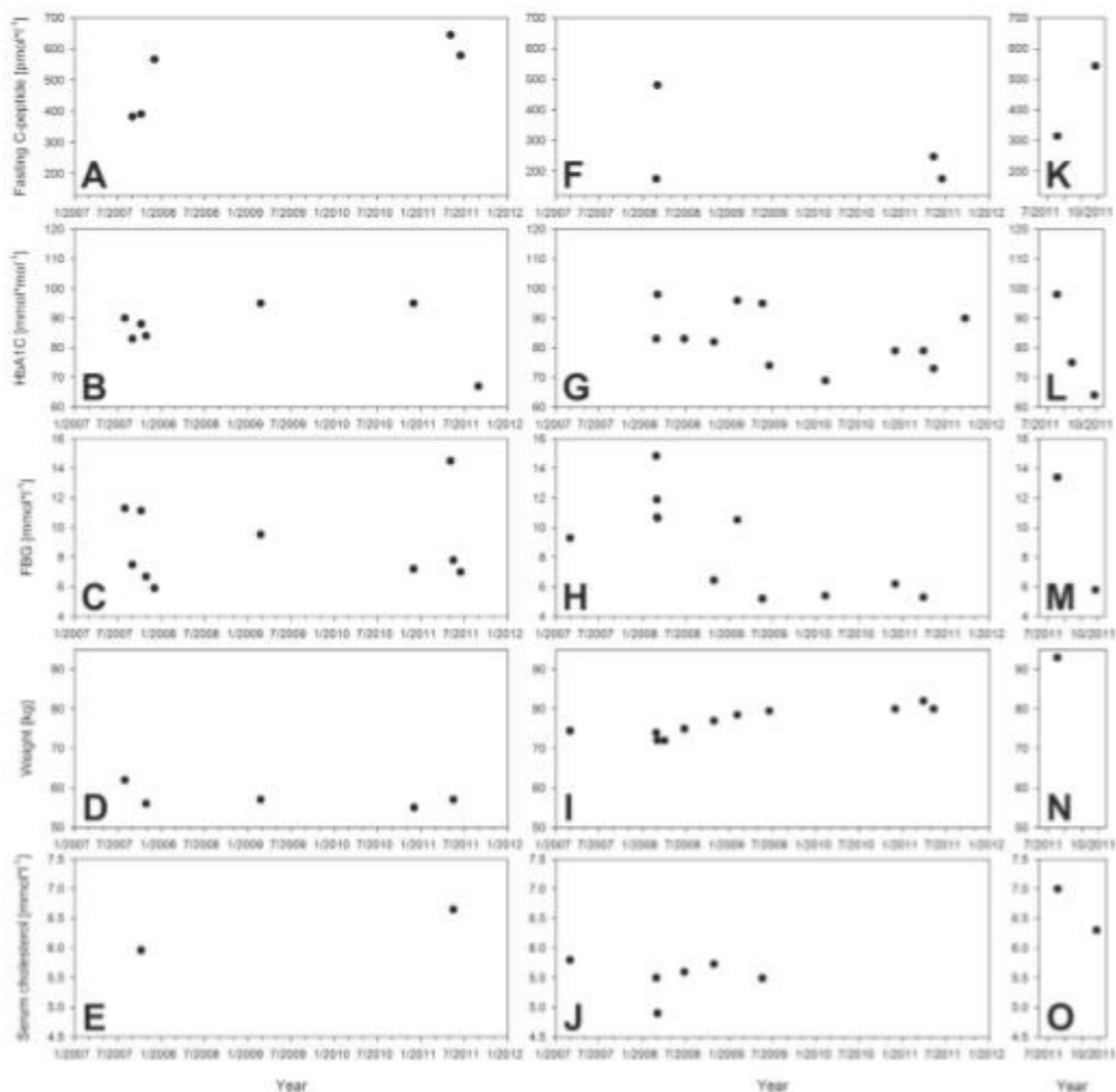
Všichni tři pacienti exprimovali GADA nebo IA2A, jejichž hodnoty byly vysoce variabilní (Graf 1). Proband měl 14 let od vzniku diabetu pozitivní obě testované ostrůvkové autoprotiátky. Při opětovném měření o čtyři roky později (18 let od vzniku diabetu) již klesly pod hranici positivity, byly však stále nad limitem pro analytickou senzitivitu. Bratr probanda měl v době vzniku diabetu pozitivní GADA; IA-2A byly detekovatelné, ale pod hranicí positivity. Matka probanda měla detekovatelné hodnoty obou testovaných autoprotiátek, ale ani jedna z nich nepřesáhla hranici positivity (zřejmě na vrub dlouhé době, jež od vyšetření uběhla, tj. 45 let od vzniku diabetu).

**Graf 1** Hodnota specifických ostrůvkových autoprotiátek GADA (anti-GAD) a IA2A (anti-IA-2) u probanda a jejích příbuzných.



**Graf 2** Biochemické parametry probanda (A-E), její matky (F-J) a bratra (K-O)

Parametry probanda a její matky byly měřeny v letech 2007-2011, parametry probandova bratra byly měřeny v době diagnostiky diabetu (07/2011) a v průběhu dvouměsíčního kontrolního období. (A, F, K) lačný C-peptid [pmol\* $l^{-1}$ ] (normální rozmezí 290-2,300 pmol\* $l^{-1}$ ). (B, L, G) HbA1c (glykovaný hemoglobin) [mmol\* $mol^{-1}$  podle IFCC] (normální rozmezí  $\leq 42$  mmol\* $mol^{-1}$ ). (C, H, M) glykémie nalačno [mmol\* $l^{-1}$ ] (normální rozmezí 3.6 – 6.1 mmol\* $l^{-1}$ ). (D, I, N) tělesná hmotnost [kg]. (E, J, O) sérový cholesterol [mmol\* $l^{-1}$ ] (normální rozmezí 3.6 – 5.2 mmol\* $l^{-1}$ ).



#### 4.2 Diskriminace MODY a diabetes mellitus 1. typu na základě stanovení ostrůvkových autoprotilátek

S ohledem na tento nový familiární fenotyp, jsme testovali širší kohortu českých MODY pacientů (*HNF4A*-MODY  $n = 3$ , *HNF1A*-MODY  $n = 12$ , *GCK*-MODY  $n = 13$ ), jež byli v minulosti doporučeni ke genetickému vyšetření. Pozitivní titr GADA nebo IA-2A měli dva ze tří *HNF4A*-MODY pacientů, čtyři z 12 *HNF1A*-MODY a jeden ze 13 *GCK*-MODY (Tab. 6).

**Tab. 6** Prevalence GADA a IA2A u českých MODY pacientů

|                       | <b>HNF4A–MODY</b> | <b>GCK–MODY</b> | <b>HNF1A–MODY</b> |
|-----------------------|-------------------|-----------------|-------------------|
| <b>GADA</b>           |                   |                 |                   |
| Medián                | 107.3             | 0.0             | 1.8               |
| IQR                   | N/D               | 0.0             | 10.8              |
| Průměr                | 119.7             | 0.6             | 8.9               |
| Min                   | 1.9               | 0.0             | 0.0               |
| Max                   | 250.0             | 6.4             | 74.0              |
| n                     | 3                 | 13              | 12                |
| n nad cut off (%)     | 2                 | 1 (8 %)         | 4 (25 %)          |
| <b>IA2A</b>           |                   |                 |                   |
| Medián                | 1.6               | 0.0             | 1.3               |
| IQR                   | N/D               | 1.2             | 3.0               |
| Průměr                | 1.2               | 1.0             | 3.3               |
| Min                   | 0.0               | 0.0             | 0.0               |
| Max                   | 2.02              | 6.8             | 26.4              |
| n                     | 3                 | 13              | 12                |
| n nad cut off         | 0                 | 0 (0 %)         | 1 (8 %)           |
| <b>GADA a IA2A</b>    |                   |                 |                   |
| n                     | 3                 | 13              | 12                |
| n nad cut off         | 0                 | 0 (0 %)         | 1 (8 %)           |
| <b>GADA nebo IA2A</b> |                   |                 |                   |
| n                     | 3                 | 13              | 12                |
| n nad cut off         | 2                 | 1 (8 %)         | 4 (25 %)          |

MODY – maturity onset diabetes of the young; HNF1A – hepatální nukleární faktor 1 $\alpha$ ; HNF4A – hepatální nukleární faktor 4 $\alpha$ ; GCK – glukokináza; GADA – autoantikéla proti dekarboxyláze kyseliny glutamové; IA2A – autoantikéla proti tyrozin fosfatáze; IQR (*interquartile range*) – interkvartilové rozpětí; n – počet; N/D – žádná data

ROC analýza získaných dat odhalila, že pozitivita ostrůvkových autoantikéla neumožňuje rozlišit mezi MODY a diabetes mellitus 1. typu (včetně LADA), navzdory skutečnosti, že prevalence pacientů s pozitivními autoantikéla byla významně vyšší ve skupině diabetiků 1. typu než ve skupině MODY (Tab. 4). Tento případ tedy *zpochybnil selektivitu ostrůvkových autoantikéla jako markeru diabetes mellitus 1. typu nebo LADA v porovnání s MODY, stejně tak ve smyslu jejich použití jako vylučovacího kritéria ke genetickému vyšetření na MODY.*

V podrobnějším zkoumání jsme se opakovaným měřením zaměřili k vyšetření kinetiky ostrůvkových autoprotilátek. Jejich přítomnost jsme se pokusili analyzovat v kontextu se sledovanými klinickými a laboratorními parametry za účelem odhalení jejich dosud nepoznaného významu.

### 4.3 Incidence ostrůvkových autoprotilátek u MODY pacientů

Ze všech provedených měření v letech 2004-2013 mělo alespoň jednou pozitivní ostrůvkové autoprotilátky celkem sedm pacientů z 28 (7/28; 25%) [Tab. 7].

**Tab. 7** Incidence ostrůvkových autoprotilátek, lačný C-peptid a HbA1c, HLA genotyp v české kohortě MODY pacientů, stanovené v době měření autoprotilátek

| Číslo pacienta    | Identifikace rodiny | Datum narození [roky] | Pohlaví | Typ mutace (aminokyselinová záměna, číslo v HGMD databázi, změna v kodonu) | Datum manifestace diabetu [roky] | Věk v době manifestace diabetu [roky] | Léčba                  | GADA [IU*ml <sup>-1</sup> ] | IA2A [IU*ml <sup>-1</sup> ] | C-peptid [pmol*l <sup>-1</sup> ] | HbA1c [mmol*mol <sup>-1</sup> ] | HLA riziko, DRB1, DQB1 |
|-------------------|---------------------|-----------------------|---------|--|----------------------------------|---------------------------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------------|
| <b>HNF4A-MODY</b> |                     |                       |         |  |                                  |                                       |                        |                             |                             |                                  |                                 |                        |
| 1                 | A                   | 1950                  | Ž       | R134W, CM030468, g.CGG→TGG   | 1977                             | 27                                    | SUR + Ins <sup>1</sup> | <b>107.3</b>                | 0                           | 275                              | 86                              | Ne                     |
| 2                 | A                   | 1977                  | Ž       | R134W, CM030468, g.CGG→TGG   | 1986                             | 9                                     | Ins                    | 1.8                         | 2                           | 2507                             | 71                              | Ne                     |
| 3                 | B                   | 1961                  | Ž       | A158V, nová, GCG→GTG   | 1986                             | 25                                    | Ins                    | <b>250</b>                  | 1                           | < 33                             | 93                              | Ne                     |
| 4                 | C                   | 1980                  | M       | L245AMB, nová,   | 2012                             | 32*                                   | Dieta                  | 0                           | 1.1                         | 592                              | 42                              | Ne                     |
| 5                 | C                   | 2002                  | M       | L245AMB, nová, CGTGCTG245CTCcTAGGCAAT                                      | 2012                             | 10*                                   | Dieta                  | 0                           | 1.5                         | N/D                              | 53                              | Ne                     |
| <b>HNF1A-MODY</b> |                     |                       |         |  |                                  |                                       |                        |                             |                             |                                  |                                 |                        |
| 6                 | D                   | 1982                  | M       | R200G, CM030525, g.CGG→GGG   | 2000                             | 18                                    | SUR                    | 1.2                         | 2.3                         | 351                              | 52                              | Ne                     |
| 7                 | D                   | 1985                  | Ž       | R200G, CM030525, g.CGG→GGG   | 1999                             | 14                                    | SUR                    | <b>74</b>                   | 0                           | 187                              | 109                             | Ne                     |
| 8                 | E                   | 1996                  | Ž       | T260M, CM971457, ACG→ATG   | 2008                             | 12                                    | Ins→SUR                | 1.50                        | 1.6                         | 622                              | 55                              | Ne                     |
| 9                 | F                   | 1979                  | Ž       | R159Q, CM971450, CGG→CAG   | 1993                             | 14                                    | SUR                    | <b>7.3</b>                  | <b>26.4</b>                 | 391                              | 84                              | <b>Ano</b>             |
| 10                | F                   | 1950                  | Ž       | R159Q, CM971450, CGG→CAG   | 1966                             | 16                                    | Ins                    | 1.76                        | 1.2                         | 247                              | 79                              | Ne                     |
| 11                | F                   | 1976                  | M       | R159Q, CM971450, CGG→CAG   | 2011                             | 35                                    | SUR                    | <b>10.8</b>                 | 2.5                         | 314                              | 98                              | Ne                     |
| 12                | G                   | 1938                  | M       | P291S, nová, c.CCA→TCA   | 1996                             | 58                                    | SUR+MTF→MTF+Ins        | <b>14.6</b>                 | 1.8                         | 493                              | 73                              | Ne                     |
| 13                | H                   | 1984                  | M       | R272H, CM971459, CGC→CAC   | 2007                             | 23                                    | SUR                    | 0                           | 2.4                         | 730                              | 52                              | <b>Ano</b>             |
| 14                | H                   | 1963                  | M       | R272H, CM971459, CGC→CAC   | 1980                             | 17                                    | Ins                    | 0                           | 3                           | 111                              | 68                              | Ne                     |
| 15                | I                   | 1973                  | Ž       | N62fsdelT, nová, AGCTG61CCCAAtGGGCTGGG                                     | 1992                             | 19                                    | Dieta                  | 0                           | 0                           | 204                              | 75                              | Ne                     |
| 16                | J                   | 1965                  | Ž       | P379fsdelCT, CD962165,   | 1981                             | 16                                    | SUR                    | 0                           | 1                           | 210                              | 56                              | Ne                     |

| CCCCTC378CCCCtGT |   |      |   |   |      |    |           |            |     |     |     |            |
|------------------|---|------|---|---|------|----|-----------|------------|-----|-----|-----|------------|
| 17               | K | 1977 | Ž | A98V, CM971442, GCC→GTC                   | 1992 | 15 | Dieta     | 0          | 3.6 | 181 | 46  | Ne         |
| 18               | K | 1980 | Ž | A98V, CM971442, GCC→GTC                   | 1997 | 17 | Ins→SUR   | 2.1        | 4   | 374 | 90  | Ne         |
| GCK-MODY         |   |      |   |   |      |    |           |            |     |     |     |            |
| 19               | L | 1989 | Ž | L314P, CM082780,<br>c.CTG→CCG             | 2007 | 18 | Dieta     | 0          | 3.9 | 310 | 51  | Ne         |
| 20               | M | 1955 | M | V244fsdelG, nová,<br>ATGTG243GAGCTgGTGGAG | 2002 | 47 | Dieta+MTF | <b>6.3</b> | 1.2 | 655 | 56  | Ne         |
| 21               | M | 1984 | M | V244fs, nová,<br>ATGTG243GAGCTgGTGGAG     | 2007 | 23 | Dieta+REP | 0          | 3.6 | 493 | 45  | Ne         |
| 22               | N | 1958 | Ž | C252Y, CM021266, TGC→TAC                  | 1988 | 30 | Ins       | 0          | 0   | 566 | 51  | Ne         |
| 23               | O | 1982 | Ž | G318R, CM030447,<br>GGG→AGG               | 2005 | 23 | Dieta     | 0          | 0   | N/D | 43  | <b>Ano</b> |
| 24               | P | 1975 | Ž | IVS1-3A>G, nová                           | 1995 | 20 | Ins       | 0          | 0   | 175 | 43  | Ne         |
| 25               | P | 1970 | Ž | IVS1ds+3A>G, nová                         | 1989 | 19 | Ins       | 0          | 0   | 200 | 49  | Ne         |
| 26               | Q | 1973 | Ž | E40K, CM030440,<br>g.GAG→AAG              | 2002 | 29 | Dieta     | 0          | 0   | N/D | 41  | Ne         |
| 27               | Q | 2002 | Ž | E40K, CM030440,<br>g.GAG→AAG              | 2010 | 8  | Dieta     | 0          | 0   | N/D | N/D | Ne         |
| 28               | Q | 2005 | M | E40K, CM030440,<br>g.GAG→AAG              | 2010 | 5  | Dieta     | 1.4        | 0   | 224 | 49  | Ne         |

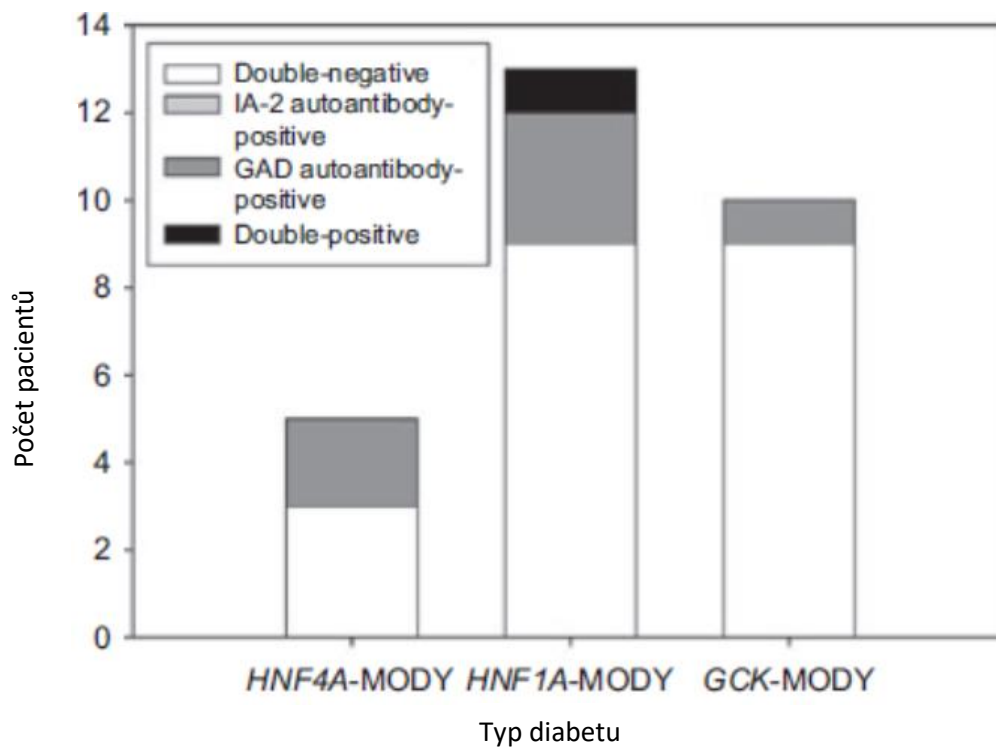
HGMD – human gene mutation database; GADA – autoprotilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové; IA2A – autoprotilátky proti tyrozin fosfatáze; HbA1c – glykovaný hemoglobin; MODY – maturity onset diabetes of the young; HNF1A – hepatální nukleární faktor 1 $\alpha$ ; HNF4A – hepatální nukleární faktor 4 $\alpha$ ; GCK – glukokináza; Ž – žena; M – muž; SUR - deriváty sulfonylurey; MTF – metformin; REP – repaglinid; Ins – inzulín – intenzifikovaný inzulínový režim; Ins<sup>1</sup> – bazální analog / NPH (středně dlouze působící humánní inzulín); NT (not treated) – bez léčby; → změna léčby z-na; N/D – žádná data

\* IGT (impaired glucose tolerance) – porucha glukózové tolerance

Tučně vyznačeny signifikantně pozitivní hodnoty ostrůvkových autoprotilátek

Všech sedm pacientů mělo *pozitivní GADA*, zatímco jeden vykazoval *dvojitou pozitivitu pro obě testované autoprotilátky*, GADA i IA2A (Graf 3). Případy autoprotilátkové positivity byly nalezeny u čtyř ze 13 (31%) pacientů s *HNF1A-MODY*, u dvou z pěti (40%) s *HNF4A-MODY*, ale pouze u jediného pacienta z 10 s *GCK-MODY* (10%).

**Graf 3** Incidence autoantiláték u pacientů s HNF4A-MODY, HNF1A-MODY a GCK-MODY



Double-negative – negativní pro obě ostrůvkové autoantilátky; IA-2 autoantibody-positive – pozitivní na IA2A; GAD autoantibody-positive – pozitivní na GADA; double-positive – pozitivní pro obě obě ostrůvkové autoantilátky; GADA – autoantilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové; IA2A – autoantilátky proti tyrozin fosfatáze; MODY – maturity onset diabetes of the young; HNF1A – hepatální nukleární faktor 1 $\alpha$ ; HNF4A – hepatální nukleární faktor 4 $\alpha$ ; GCK – glukokináza

Expresse ostrůvkových autoantiláték *nebyla vázána na žádný konkrétní typ mutace* (Tab. 8). Ostrůvkové autoantilátky se objevovaly u pacientů s různými typy mutací (což koresponduje též s analýzou případových článků zmiňujících se o sekreci ostrůvkových autoantiláték u MODY).

**Tab. 8** Typy mutací určené u MODY pacientů s ostrůvkovými autoprotilátkami

Označeny jsou jednak mutace prvně asociované s MODY v této studii a jednak již známé z publikovaných případů.

| Typ MODY          | Mutace asociované s přítomností autoprotilátek |  | Reference   |
|-------------------|--|--|---|
|                   | Tato studie                                    | Dříve publikované                                |   |
| <b>HNF4A-MODY</b> | R134W<br>A158V                                 | Varianta v exonu 5 (Ser165Gly) <i>HNF4A</i> genu | Aguilera E. et al., 2005  |
| <b>HNF1A-MODY</b> | R200G<br>R159Q<br>P291S                        | p.G31D<br>T196A                                  | Maltoni G. et al., 2012<br>Bowden S. A. et al., 2008                                      |
| <b>GCK-MODY</b>   | V244fs   | IVS7+2T>A<br>L134P<br>G279A                      | Maltoni G. et al., 2012<br>Calcaterra V. et al., 2012<br>Ortega-Rodriguez E. et al., 2001 |

MODY – maturity onset diabetes of the young; HNF1A – hepatální nukleární faktor 1 $\alpha$ ; HNF4A – hepatální nukleární faktor 4 $\alpha$ ; GCK – glukokináza

Zaznamenali jsme pouze *jeden případ rodiny s více než jedním členem s pozitivními autoprotilátkami* (Příloha 1). Kausální p.Arg159 mutace v *HNF1A* genu, identifikovaná u těchto třech rodinných příslušníků, je běžnou příčinou *HNF1A-MODY*. Příčinná souvislost mezi touto či jinou *HNF1A*, *HNF4A* či *GCK* mutací a produkcí autoprotilátek však není známá.

#### 4.4 Dynamika ostrůvkových autoprotilátek

*Hladina autoprotilátek se měnila s časem:* Autoprotilátky po detekci buď perzistovaly po několik let na přibližně stejné, nebo nižší hodnotě [případ pacienta 3 a 9 (IA-2A)] nebo později zcela vymizeli [případ pacientů 7, 9 (GADA) a 11 (IA-2A)] (Tab. 9). Zajímavé je, že u pacienta 1 se autoprotilátky objevily až 34 let po vzniku diabetu. Průměrný čas, který uběhl od diagnostiky diabetu k detekci ostrůvkových autoprotilátek, byl  $16.3 \pm 10.1$  let.

**Tab. 9** Kinetika exprese ostrůvkových autoprotilátek, vybrané charakteristiky a léčba u pacientů s pozitivními autoprotilátkami

| Číslo pacienta          | Rok 1. vyšetření | Titř GADA [IU*ml <sup>-1</sup> ] | Titř IA2A [IU*ml <sup>-1</sup> ] | C-peptid [pmol*l <sup>-1</sup> ] | HbA1c [mmol*mol <sup>-1</sup> ] | Léčba                                 | Rok 2. vyšetření | Titř GADA [IU*ml <sup>-1</sup> ] | Titř IA2A [IU*ml <sup>-1</sup> ] | C-peptid [pmol*l <sup>-1</sup> ] | HbA1c [mmol*mol <sup>-1</sup> ] | Léčba                                      |
|-------------------------|------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|--|
| <b>HNF4A-MODY (n=2)</b> |                  |                                  |                                  |                                  |                                 |                                       |                  |                                  |                                  |                                  |                                 |  |
| 1                       | 2009             | 0                                | 0                                | 293                              | 112                             | Glib. 10mg + NPH (6IU)                | 2011             | <b>107.3</b>                     | 0                                | 275                              | 86                              | Glib. 10mg + NPH (6IU)                     |
| 3                       | 2010             | <b>250</b>                       | 0                                | < 33                             | 91                              | IIT – IA (34 IU)                      | 2011             | <b>250</b>                       | 0                                | < 33                             | 93                              | MDI (34 IU)                                |
| <b>HNF1A-MODY (n=4)</b> |                  |                                  |                                  |                                  |                                 |                                       |                  |                                  |                                  |                                  |                                 |  |
| 7                       | 2004             | <b>74</b>                        | 0                                | 187                              | 109                             | IIT – HI (76 IU) →PAD                 | 2011             | 0                                | 2.3                              | 427                              | 68                              | Glib. 7.5mg od r. 2004                     |
| 9                       | 2007             | <b>7.3</b>                       | <b>26.4</b>                      | 391                              | 84                              | Glib. 5mg                             | 2011             | 0                                | <b>12.9</b>                      | 506                              | 67                              | Glicl. 90mg                                |
| 11                      | 2011             | <b>10.8</b>                      | 2.5                              | 314                              | 98                              | NT                                    | 2012             | 0                                | 0                                | 566                              | 61                              | Glib. 7.5mg                                |
| 12                      | 2008             | 0                                | 2.2                              | 368                              | N/A                             | Glicl. 90mg + MTF 3000mg (od r. 2008) | 2011             | <b>14.6</b>                      | 1.8                              | 493                              | 73                              | MDI – IA (80 IU) + MTF 2000mg (od r. 2011) |
| <b>GCK-MODY (n=1)</b>   |                  |                                  |                                  |                                  |                                 |                                       |                  |                                  |                                  |                                  |                                 |  |
| 20                      | 2008             | <b>6.3</b>                       | 1.2                              | 655                              | 56                              | MTF 1700mg                            | 2013             | 0                                | 0                                | N/D                              | 58                              | MTF 2000mg                                 |

GADA – autoprotilátka proti dekarboxyláze kyseliny glutamové; IA2A – autoprotilátka proti tyrozin fosfatáze; HbA1c – glykovaný hemoglobin; MODY – maturity onset diabetes of the young; HNF1A – hepatální nukleární faktor 1 $\alpha$ ; HNF4A – hepatální nukleární faktor 4 $\alpha$ ; GCK – glukokináza; Glib. – glibenklamid; Glicl. – gliklazid; MTF – metformin; IIT – intenzifikovaný inzulínový režim; IA – inzulínová analoga; HI – humánní inzulíny; NPH – středně dlouze působící lidský inzulín; NT (not treated) – bez léčby; → změna léčby z-na; N/D – žádná data

#### 4.5 Klinická charakteristika pacientů s ostrůvkovými autoprotilátkami

A) *Expres ostrůvkových autoprotilátek neovlivnila fenotyp nemoci:*

Všichni pacienti s autoprotilátkami splnili typická klinická kritéria pro MODY:

- pomalu progredující hyperglykémie se vznikem diabetu v časně dospělosti (u *HNF1A-MODY* a *HNF4A-MODY*), perzistentní mírná hyperglykémie (u *GCK-MODY*);
- neobézní habitus (BMI  $24.7 \pm 4.4$  kg\*m<sup>2</sup>);
- vícegenerační rodinná anamnéza diabetu (alespoň dvě generace);
- žádná epizoda ketoacidózy v osobní anamnéze;
- dlouhotrvající, zchovalá endogenní inzulínová sekrece (měřitelný lačný C-peptid);
- citlivost na deriváty sulfonylurey (u *HNF1A-MODY* a *HNF4A-MODY*) a nezávislost na injekčním podání inzulínu.



Jedinou výjimkou byl pacient 3, jehož fenotyp kombinoval *HNF4A*-MODY a diabetes mellitus 1. typu, po úplné ztrátě vlastní endogenní inzulínové sekrece za 24 let po manifestaci diabetu. Tento jediný pacient prodělal několik epizod ketoacidózy a byl plně inzulín-dependentní.

*B) Diabetes se u pacientů s ostrůvkovými autoprotilátkami manifestoval v pozdějším věku:*

Manifestace, resp. diagnostika diabetu byla u pacientů s autoprotilátkami pozdější v porovnání s pacienty bez autoprotilátek ( $31.4 \pm 15.2$  vs.  $18.0 \pm 6.9$  let věku) [Tab. 10]. Tento rozdíl byl signifikantní (jednosměrná ANOVA  $P < 0.00.1$ ; d.f.<sub>(1)</sub> = 5; d.f.<sub>(2)</sub> = 74;  $F = 5.07$ ; Turecký post-test BMI:  $P > 0.05$ ;  $q = 0.043$ ; trvání diabetu  $P > 0.05$ ,  $q = 0.656$ ; věk v době manifestace diabetu  $P < 0.01$ ;  $q = 5.158$ ).

**Tab. 10** Porovnání sledovaných parametrů u pacientů pozitivních a negativních na ostrůvkové autoprotilátky.

| Charakteristiky                                   | S ostrůvkovými autoprotilátkami (n = 7) | Bez ostrůvkových autoprotilátek (n = 21) |
|---|---|--|
| <b>Pohlaví</b>                                    |   |  |
| Muž   | 3                                       | 7  |
| Žena  | 4                                       | 14                                       |
| <b>Typ diabetes mellitus</b>                      |   |  |
| - HNF4A-MODY                                      | 2                                       | 3  |
| - HNF1A-MODY                                      | 4                                       | 9  |
| - GCK-MODY  | 1                                       | 9  |
| <b>Věk v době vzniku diabetes mellitus [roky]</b> |   |  |
|   | $31 \pm 15$                             | $18 \pm 7$                               |
| - HNF4A-MODY                                      | $26 \pm 1$                              | $17 \pm 11$                              |
| - HNF1A-MODY                                      | $30 \pm 18$                             | $17 \pm 3$                               |
| - GCK-MODY  | 47                                      | $19 \pm 8$                               |
| <b>Trvání diabetu [roky]*</b>                     | $16.1 \pm 10.2$                         | $13.6 \pm 12.1$                          |
| <b>BMI [kg*m<sup>2</sup>]</b>                     | $24.7 \pm 4.4$                          | $24.8 \pm 4.1$                           |
| <b>HbA1c [mmol*mol<sup>-1</sup>]</b>              | $84 \pm 15$                             | $56 \pm 13$                              |
| - HNF4A-MODY                                      | $90 \pm 4$                              | $55 \pm 12$                              |
| - HNF1A-MODY                                      | $91 \pm 14$                             | $64 \pm 14$                              |
| - GCK-MODY  | $56 \pm 0$                              | $47 \pm 4$                               |
| <b>Lačný C-peptid [pmol*l<sup>-1</sup>]</b>       | $356.7 \pm 184.8$                       | $349.4 \pm 185.8$                        |
| <b>Episody ketoacidózy [počet pacientů]</b>       | 1                                       | 0  |
| <b>Typ léčby</b>                                  |   |  |
| - Dieta   | 0                                       | 9  |
| - PAD   | 4                                       | 6  |
| - Inzulín (IIT)                                   | 1                                       | 6  |
| - PAD + inzulín                                   | 2 **                                    | 0  |

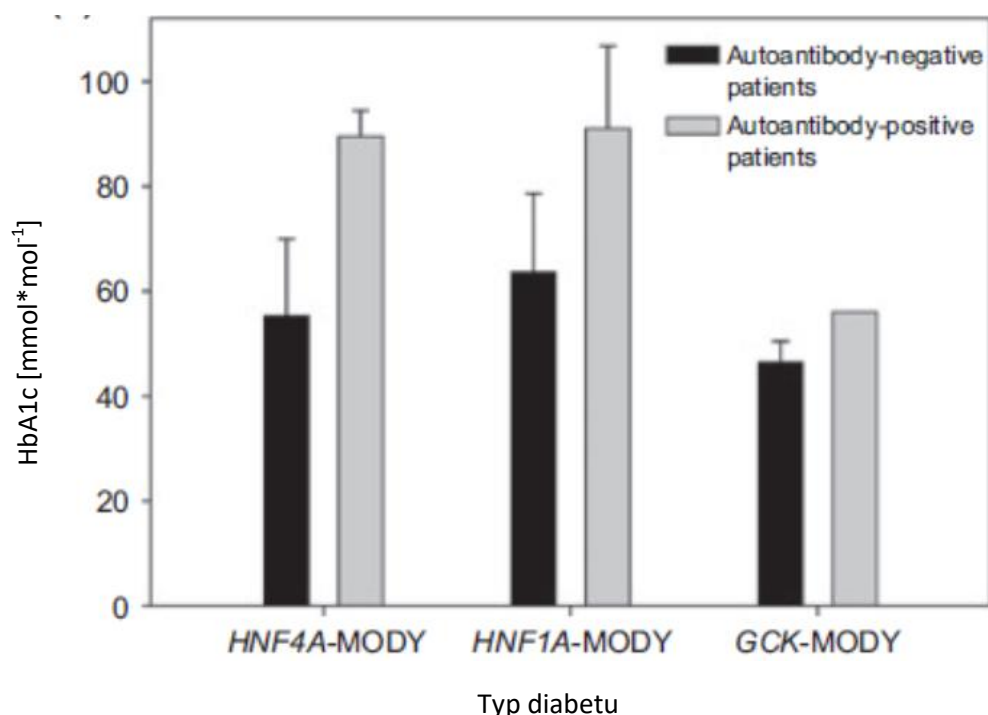
MODY – maturity onset diabetes of the young; HNF1A – hepatální nukleární faktor 1 $\alpha$ ; HNF4A – hepatální nukleární faktor 4 $\alpha$ ; GCK – glukokináza; BMI – body mass index; HbA1c – glykovaný hemoglobin; IIT – intenzifikovaný inzulínový režim, PAD – perorální antidiabetika; SUR - deriváty sulfonylurey

\* Délka trvání diabetu je vyjádřena jako počet let uplynulých mezi dobou manifestace a stanovením autoprotištětek. \* \* Kombinace SUR + NPH inzulín (středně dlouze působící humánní inzulín) nebo metformin + IIT.

C) *Expresa ostrůvkových autoprotištětek se měnila s úrovní glykemické kompenzace:*

Na základě dosahované hodnoty HbA1c jsme posuzovali úroveň glykemické kompenzace u jednotlivých pacientů s autoprotištětkami a pacientů bez autoprotištětek. Skupina pacientů, která produkovala ostrůvkové autoprotištětky, dosahovala signifikantně vyšších hodnot HbA1c v porovnání se skupinou bez autoprotištětek (dvouvzorkový *t*-test  $P < 0.001$ ,  $n_1 = 20$ ,  $n_2 = 7$ ,  $t = -4.662$ ) [Graf 5, Tab. 10]. HbA1c u HNF4A-MODY s autoprotištětkami dosahoval  $90 \pm 4$  mmol\* $\text{mol}^{-1}$  vs.  $55 \pm 12$  mmol\* $\text{mol}^{-1}$  u pacientů bez autoprotištětek. Podobný rozdíl byl patrný ve skupině HNF1A-MODY [ $91 \pm 14$  mmol\* $\text{mol}^{-1}$  při přítomnosti autoprotištětek vs. pouze  $64 \pm 14$  mmol\* $\text{mol}^{-1}$  v kohortě pacientů bez autoprotištětek], a GCK-MODY [ $56$  mmol\* $\text{mol}^{-1}$  při přítomnosti autoprotištětek vs. pouhých  $47 \pm 4$  mmol\* $\text{mol}^{-1}$  při jejich absenci].

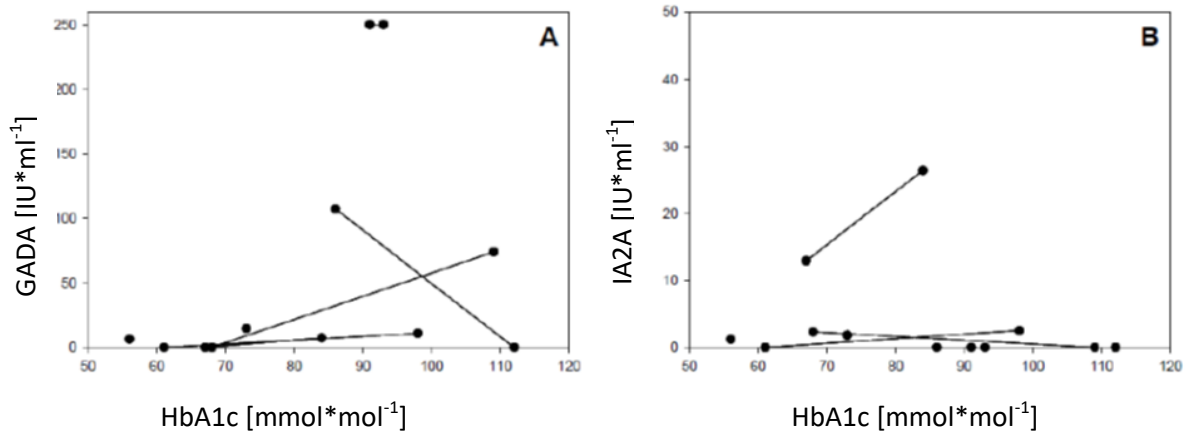
**Graf 5** Hodnota HbA1c u HNF4A-MODY, HNF1A-MODY a GCK-MODY pacientů s autoprotištětkami a bez autoprotištětek



HbA1c – glykovaný hemoglobin; autoantibody-negative patients – pacienti s ostrůvkovými autoprotištětkami; autoantibody-positive patients – pacienti bez ostrůvkových autoprotištětek; HNF4A – hepatální nukleární faktor 4 $\alpha$ ; HNF1A – hepatální nukleární faktor 1 $\alpha$ ; GCK – glukokináza; MODY – maturity onset diabetes of the young

Expres ostrůvkových autoptoláték se měnila podle dosahované glykemické kompenzace. S lepší se kompenzací diabetu (s klesajícím HbA1c) hladina autoptoláték klesala [pacient 9 (IA-2A)] nebo exprimované autoptolátky kompletně zmizely [pacient 7, 9 (GADA) a 11 (IA-2A)] (Graf 6 a, b).

**Graf 6 A, B** Kinetika ostrůvkových autoptoláték v souvislosti s HbA1c stanoveného v době jejich měření

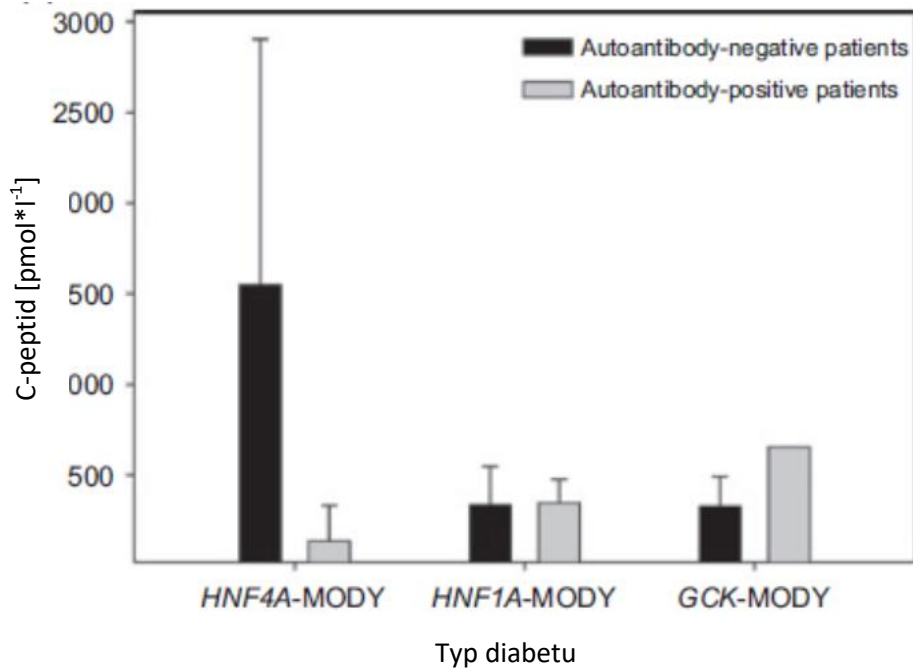


GADA – autoptolátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové; IA2A – autoptolátky proti tyrozin fosfatáze; HbA1c – glykovaný hemoglobin

D) *Expres autoptoláték nebyla provázána zhoršením  $\beta$ -buněčné funkce:*

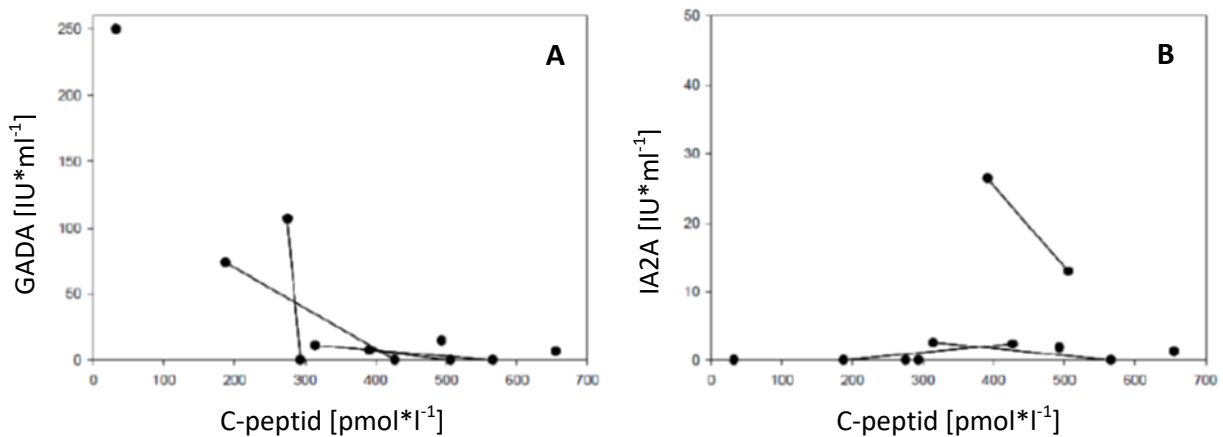
Mezi skupinami pacientů s přítomnými autoptolátkami a pacientů s jejich absencí nebyly zaznamenány žádné rozdíly v  $\beta$ -buněčné funkci, vyjádřené hodnotou lačného C-peptidu (dvouzorkový *t*-test  $P > 0.05$ ,  $n_1 = 14$ ,  $n_2 = 7$ ,  $t = 0.666$ ) [Graf 7; Graf 8 a, b; Tab. 10].

**Graf 7** Hodnota lačného C-peptidu u HNF4A-MODY, HNF1A-MODY a GCK-MODY pacientů s autoprotilátkami a bez autoprotilátek



Autoantibody-negative patients – pacienti s ostrůvkovými autoprotilátkami; autoantibody-positive patients – pacienti bez ostrůvkových autoprotilátek; HNF4A – hepatální nukleární faktor 4 $\alpha$ ; HNF1A – hepatální nukleární faktor 1 $\alpha$ ; GCK – glukokináza; MODY – maturity onset diabetes of the young

**Graf 8 A, B.** Kinetika ostrůvkových autoprotilátek v souvislosti s lačným C-peptidem stanoveným v době měření protilátek.



GADA – autoprotilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové 65, IA2A – protilátky proti proteinu tyrozin fosfatáze IA-2

E) HLA rizikový genotyp byl vzácný:

HLA rizikový genotyp byl v naší skupině pacientů pozorován zřídka (3/28; 11%) [Tab. 11]. Navíc pouze jeden z pacientů s rizikovým HLA genotypem (pacient 9 s HLA-DRB1\*03,07, HLA-DQB1\*02,0303) patřil ke kohortě jedinců s ostrůvkovými autoprotilátkami. Zajímavé je, že se jednalo o jediného pacienta v našem souboru, u kterého jsme spolu s GADA detekovali také významný titr IA-2A.

**Tab. 11** HLA genotyp u pacientů s ostrůvkovými autoprotilátkami a bez ostrůvkových autoprotilátek

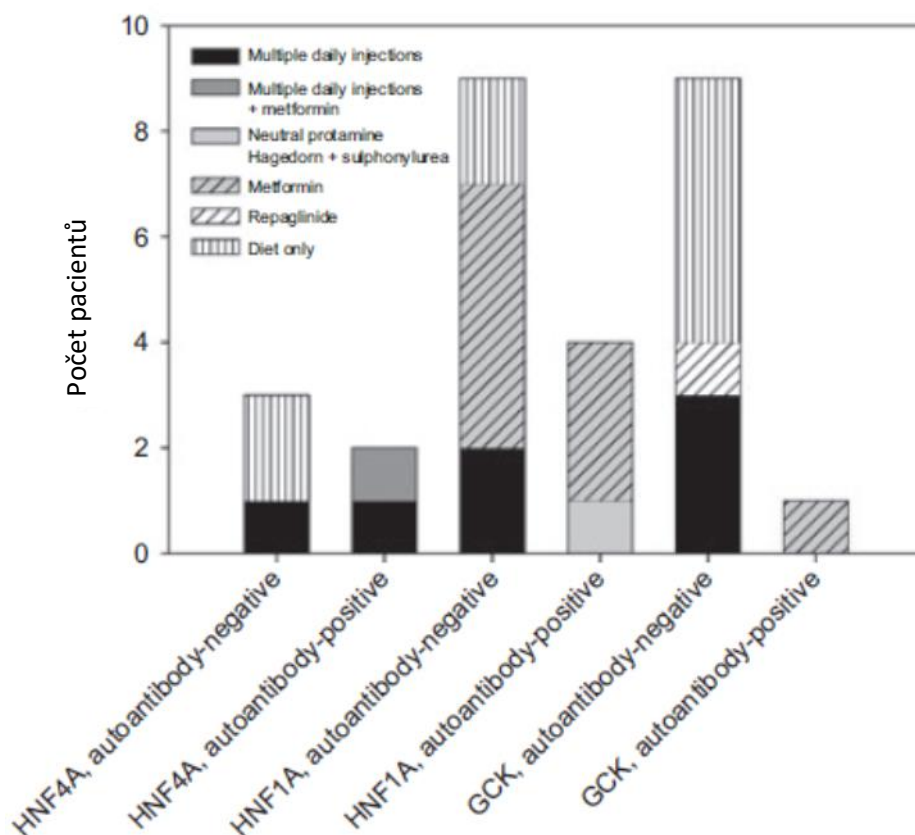
| Pacienti s ostrůvkovými autoprotilátkami |                               |                | Pacienti bez ostrůvkových autoprotilátek |                               |           |
|--|-------------------------------|----------------|--|-------------------------------|-----------|
| Číslo pacienta                           | HLA genotyp<br>(DRB1*, DQB1*) |                | Číslo pacienta                           | HLA genotyp<br>(DRB1*, DQB1*) |           |
| 1  | 08,15                         | 04,02          | 2  | 07,15                         | 02,06     |
| 3  | 07,14                         | 0303,0503      | 4  | 07,13                         | 02,06     |
| 7  | 08,15                         | 04,06          | 5  | 01,13                         | 05,06     |
| 9  | <b>03,07</b>                  | <b>02,0303</b> | 6  | 03,07                         | 04,02     |
| 11                                       | 07,15                         | 0303,06        | 8  | 07,15                         | 02,06     |
| 12                                       | 01,07                         | 05,02          | 10                                       | 07                            | 02,0303   |
| 20                                       | 04,08                         | 0301,04        | 13                                       | 15,16                         | 06,05     |
|  |                               |                | 14                                       | 13,15                         | 06        |
|  |                               |                | 15                                       | 04,15                         | 0301,06   |
|  |                               |                | 16                                       | 07,12                         | 02,0301   |
|  |                               |                | 17                                       | 11,12                         | 0301      |
|  |                               |                | 18                                       | 11,15                         | 0301,06   |
|  |                               |                | 19                                       | 15                            | 06        |
|  |                               |                | 21                                       | 04,11                         | 0301      |
|  |                               |                | 22                                       | 01,13                         | 05,06     |
|  |                               |                | 23                                       | <b>03</b>                     | <b>02</b> |
|  |                               |                | 24                                       | 07,14                         | 02,05     |
|  |                               |                | 25                                       | 15                            | 02,05     |
|  |                               |                | 26                                       | 08,11                         | 04,03     |
|  |                               |                | 27                                       | 08,13                         | 04,06     |
|  |                               |                | 28                                       | 11,14                         | 0301,05   |

Tučně vyznačeny rizikové HLA genotypy

F) *Přítomnost ostrůvkových autoprotilátek nenaznačovala větší tendenci k inzulin-dependenci:*

Terapie se lišila u každého pacienta v obou kohortách, bez ohledu na přítomnost či absenci autoprotilátek (Graf 9, Tab. 10). Expres autoprotilátek nebyla provázená nutností zahájení inzulinoterapie. Pouze u jedinců s autoprotilátkami a dlouhým trváním diabetu byl inzulín k dosažení lepší kompenzace nezbytný.

**Graf 9** Terapie použitá u *HNF4A-MODY*, *HNF1A-MODY* a *GCK-MODY* pacientů s autoprotilátkami a bez autoprotilátek



HNF4A – hepatální nukleární faktor 4 $\alpha$ ; HNF1A – hepatální nukleární faktor 1 $\alpha$ ; GCK – glukokináza; autoantibody-negative patients – pacienti bez ostrůvkových autoprotilátek; autoantibody-positive patients – pacienti s ostrůvkovými autoprotilátkami; MDI – intenzifikovaný inzulínový režim; Neutral Protamine Hagedorn – NPH inzulín (středně dloze působící humánní inzulín); diet only – pouze na terapii diabetickou dietou

## 5. DISKUZE

Prokázali jsme vysokou prevalenci specifických ostrůvkových autoprotilátek mezi pacienty s třemi nejběžnějšími subtypy MODY (*HNF1A-MODY*, *HNF4A-MODY* i *GCK-MODY*). Predominantní autoprotilátkou ze dvou rutinně testovaných v klinické praxi, byla GADA. Detekce ostrůvkových autoprotilátek byla spojena s manifestací diabetu v pozdějším věku a horší kontrolou diabetu, aniž by došlo k progresivnímu poklesu sekreční schopnosti  $\beta$ -buněk a potřebě výraznější intenzifikace stávající antidiabetické terapie. Hladina autoprotilátek navíc dynamicky fluktovala v čase a korespondovala s měnící se úrovní glykemické kompenzace.

Tento nálezn je překvapivý, jelikož monogenní typy diabetu jsou tradičně spojovány s absencí specifických ostrůvkových autoprotilátek, a na tomto tvrzení jsou též postavena diagnostická kritéria MODY a rozhodnutí o provedení molekulárně genetického vyšetření k verifikaci diagnózy. Negativita ostrůvkových autoprotilátek je považována za dostatečně silný diagnostický marker svědčící pro MODY, pokud jsou autoprotilátky testovány v období primomanifestace diabetu (McDonald T. J. et

al., 2011). U mnoha (zejména dospělých) pacientů ovšem nebývá v době manifestace diabetu učiněna správná diferenciálně diagnostická rozvaha a vyšetření na MODY se správnou klasifikací cukrovky přichází na řadu o mnoho let později. O výskytu ostrůvkové autoimunity, jakož i o kinetice autoprotilátkové sekrece však u takových pacientů s delším trváním diabetu žádná data neexistují.

Jistou představu nabízí pouze studie provedená mezi německými a rakouskými pacienty s MODY, která reportuje o pozitivitě ostrůvkových autoprotilátek v 17% případů (Schober E. et al., 2009).

Při takto odlišných nálezech lze v případě autoprotilátkové incidence uvažovat o geografické variabilitě; vysoká frekvence MODY pacientů s ostrůvkovou autoimunitou ve střední Evropě (Schober E. et al., 2009) a také náhodné případy odjinud (Aguilera E. et al., 2005; Bowden S. A. et al., 2008; Calcaterra V. et al., 2012; Maltoni G. et al., 2012; Ortega-Rodriguez E. et al., 2001) pak ukazují, že existuje alespoň jeden region s vysokou incidencí autoprotilátek u pacientů s MODY (Německo, Rakousko, Česká republika).

### **5.1. Diskuze výsledků práce a kauzálních souvislostí MODY s ostrůvkovými autoprotilátkami**

*V naší studii neměli pacienti s pozitivními ostrůvkovými autoprotilátkami jiné klinické ani laboratorní charakteristiky asociované s autoimunitní formou diabetes mellitus 1. typu či LADA. Ovšem při nastolení zásadní otázky týkající se vlastní příčiny autoprotilátkové sekrece u MODY, logicky prvně zvažujeme hypotetickou koexistenci právě s diabetes mellitus 1. typu, včetně LADA. Souběžnost těchto dvou typů cukrovky je ostatně naznačena v několika jednotlivých případech [u jedince s *HNF4A*-MODY (Aguilera E et al., 2005), *GCK*-MODY (Calcaterra V. e tal., 2012) i *HNF1A*-MODY (Miura J et al., 1998; Bowden S. A. et al., 2008)].*

Při úvaze o možné vzájemné koexistenci MODY s diabetem 1. typu anebo LADA jsme u pacientů s autoprotilátkami posuzovali jak klinické, tak laboratorní charakteristiky autoimunitního diabetu, včetně analýzy spektra a titru sekretovaných autoprotilátek a přítomnosti rizikového HLA genotypu (dle světově akceptovaných guidelines EASD/ADA pro diagnostiku diabetu a dat ze studií: Laugesen E. et al., 2015; Palmer J. P. et al., 2005; Novota P. et al., 2004).

U drtivé většiny pacientů (tj. s jedinou výjimkou – pacienta 3) jsme po celé sledované období nezaznamenali klinický vývoj směřující ke konečné manifestaci diabetes mellitus 1. typu s naprostou inzulínodeficiencí. U žádného z pacientů s autoprotilátkami nedošlo během sledovaného období k dokumentovanému signifikantnímu a rapidnímu poklesu  $\beta$ -buněčné sekreční funkce – vyjádřeno laboratorně stabilní hladinou lačného C-peptidu nebo též klinicky rozvojem diabetické ketoacidózy a nutností iniciace inzulínoterapie.

Na možný souběh s diabetes mellitus 1. typu by mohla poukazovat současná přítomnost IA-2A, jenž je považována za specifitější ukazatel destrukce  $\beta$ -buněk korelující s rapidní progresí do diabetu (Savola K. et al., 1998) a predikující zejména spolu s GADA rychlé  $\beta$ -buněčné selhání (Borg H. et al., 2002). Žádné typické symptomy diabetu 1. typu nebyly u jediného pacienta s IA-2A (pacient 9)

přítomny. Navzdory perzistentní hladině IA-2A byla u tohoto jedince dlouhodobě inzulinová sekrece a možnost léčby bez inzulinu zachována. HLA rizikový genotyp, prokazatelný u jediného pacienta s ostrůvkovými autoprotilátkami, se nestal významným diskriminačním ukazatelem, jenž by pomohl vytipovat pacienty s rizikem rozvoje autoimunitního diabetu.

Vývoj LADA s pozvolnou progresí  $\beta$ -buněčné dysfunkce v nadcházejících letech však nemůžeme u některých pacientů zcela vyloučit. Ve většině případů jsme totiž detekovaly nižší titry jediné autoprotilátky – a to GADA, které jsou příznačné právě pro LADA (Laugesen E. et al., 2015; Palmer J. P. et al., 2005; Novota P. et al., 2004) a jsou asociovány s pomalou progresí  $\beta$ -buněčné dysfunkce (Borg H. et al., 2001; van Deutekom A. W. et al., 2008; Huang G. et al., 2016). Symptomy typické pro LADA se tedy mohou projevit až v delším časovém horizontu, jenž přesahuje sledované období této studie. Dlouhodobá klinická observace je pro zodpovězení této otázky nezbytná.

*Z celého souboru MODY jedinců s pozitivními autoprotilátkami se pouze u jediného pacienta [pacienta 3] na základě klinického průběhu a sledovaných laboratorních parametrů domníváme, že by se skutečně mohlo jednat o paralelní manifestaci LADA u HNF4A-MODY. Příznačný je vysoký (prakticky nejvyšší námi naměřený) titr GADA, dokumentovaný pozvolný pokles inzulinové sekreční kapacity  $\beta$ -buněk vedoucí k úplné inzulinodeficienci v průběhu více než 20 let, rezultující v opakované epizody diabetické ketoacidózy a nutnost dramatické titrace dávek inzulinu. Současně byla zaznamenána rychlá progresse mikrovaskulárních diabetických komplikací (diabetické onemocnění ledvin a diabetické retinopatie).*

Takový průběh onemocnění odpovídá údajům získaných z prospektivních studií, které potvrzují, že u pacientů pouze s GADA dojde k  $\beta$ -celulárnímu selhání obvykle až po více než pěti letech trvání diabetu, a že vyšší titr GADA je asociován se závažnějším  $\beta$ -buněčným selháním, jenž koreluje s nízkou hodnotou lačného C-peptidu, výskytem chronických diabetických komplikací (jakou je např. retinopatie po 15 letech trvání diabetu) a disponuje vyšší prediktivní hodnotou budoucí inzulinodependence (Borg H. et al., 2001; Jensen R. A. et al., 2011). Na druhou stranu pacient s druhým nejvyšším naměřeným titrem GADA (pacient 1) po uplynutí podobně dlouhé doby od manifestace diabetu zatím k úplnému vyhasnutí endogenní inzulinové sekrece nedospěl. Byť k dosažení adekvátní kompenzace diabetu bylo nutné zahájit terapii bazálním inzulinem.

Jelikož tedy naprostá většina pacientů s MODY, u kterých byly v této studii detekovány autoprotilátky, neměla fenotyp typický pro diabetes mellitus 1. typu (s výjimkou pacienta 3) a neměla HLA rizikový genotyp asociovaný s diabetes mellitus 1. typu (s výjimkou pacienta 9 s oběma pozitivními autoprotilátkami), domníváme se, že v těchto případech ostrůvkové autoprotilátky nenaznačují probíhající autoimunitní intrainzulární zánět, resp. počínající diabetes mellitus 1. typu.

Naopak zjištěná *souvislost autoprotilátkové sekrece se zhoršením glykemické kompenzace může spíše reflektovat probíhající destrukci pankreatických  $\beta$ -buněk z jiných než autoimunitních příčin. Takovou  $\beta$ -buněčnou destrukci považujeme za příčinu námi pozorovaného autoimunitního procesu, nikoliv za její následek. Z dlouhodobého hlediska tato destrukce nemusí být kvantitativně signifikantní, jelikož stabilní hladina C-peptidu detekovaná v průběhu studijního období, svědčí pro stálou a zachovalou sekreční rezervu  $\beta$ -buněk.*



K aktivaci imunitního systému totiž může dojít během apoptózy  $\beta$ -buněk. I když je apoptóza tradičně považovaná za proces, který imunitní odpověď neindukuje, bylo prokázáno, že apoptotické buňky mohou *a)* na svém povrchu vystavit autoreaktivní antigeny; *b)* preferenčně aktivovat dendritické buňky schopné kontaktovat tkáňově specifické T-lymfocyty; a *c)* indukovat tvorbu autoantilátok (Trudeau, J. D. et al., 2000). Je tedy dost možné, že za určitých okolností dochází k rozvoji autoimunity i v případě fyziologické apoptózy. Spekuluje se, že se GAD65 a IA-2 autoantigeny mohou s imunitním systémem (dohledem) střetnout jako alternativně sestřižené formy po apoptóze  $\beta$ -buněk v postnatálním období nebo po imunitně zprostředkované destrukci ostrůvků cílené na jiné (povrchové nebo sekretované) autoantigeny (Wenzlau J. M. et al., 2007). Proto i primárně neautoimunitní  $\beta$ -buněčná apoptóza se může stát spouštěcím mechanismem pozorovaného autoimunitního procesu.

Pokud může dojít vlivem apoptotické smrti  $\beta$ -buněk (v obecném slova smyslu) k aktivaci imunitního systému např. některými intracelulárními proteiny, pak pozorovaná sekrece ostrůvkových autoantilátok může mít ve skutečnosti několik spouštěcích faktorů. V *případě MODY diabetu předpokládáme dvě takové cesty* – jednak *primární „genetickou“* a jednak *sekundární „metabolickou“*. V první řadě nelze opomenout *aktivaci apoptózy vycházející primárně z poškození  $\beta$ -buňky genetickým defektem*, v druhé řadě *postupný (a pozvolný) zánik celkové  $\beta$ -buněčné masy*, jenž pramení nejen z *geneticky  $\beta$ -buněk*, ale také z *metabolické dysregulace spojené s rozvinutou cukrovkou*.

V patogenezi MODY se spolu s kvalitativní poruchou inzulínové sekrece uplatňuje také defektní buněčný obrat, charakterizovatelný aktivací apoptózy, ale též poklesem buněčné proliferace (Frayling T. M. et al., 2001). Který z těchto mechanismů převažuje, není jasné. Avšak v současné době je přijímáno, že MODY transkripční faktory [nejen HNF-1 $\alpha$  a HNF-4 $\alpha$  (Bulla G. A. et al., 2001), ale také PDX-1 (Johnson J. D. et al., 2003) a NeuroD1 (Pennesi M. E. et al., 2003)] jsou důležitými supresory apoptózy  $\beta$ -buněk a tedy, že dominantním faktorem vedoucí k poklesu  $\beta$ -buněčné masy je u MODY nárůst apoptózy  $\beta$ -buněk. Přímé důkazy nicméně chybějí. Na druhou stranu se v séru pacientů s HNF1A-MODY podařilo prokázat zvýšenou hladinu PSP/reg proteinu, jenž je ve zvýšené míře detekovatelný u pacientů s diabetes mellitus 1. typu, kde jednoznačně svědčí pro poškození pankreatu a apoptózu  $\beta$ -buněk (Bonner C. et al., 2010).

Při představě o vlastním mechanismu apoptózy u MODY lze vycházet z buněčných modelů. Wobser et al. například zjistili, že prolongovaná suprese funkce HNF-1 $\alpha$  aktivuje v inzulín-secernujících buňkách evolučně konzervovaný program buněčné smrti jdoucí ve stopách *mitochondriální cesty* apoptózy, tedy uvolnění mitochondriálního cytochromu C aktivujícího kaspázu-9 (Wobser H. et al., 2002). Overexprese dominantně-negativního-HNF1 $\alpha$  vedla také k poklesu exprese ústředního proteinu přežití – anti-apoptotického Bcl-xL. Wobser et al. následně také objasnili, že k senzitivaci INS-1 buněk k mitochondriální apoptotické dráze dochází cestou snížení PI-3K/AKT1 kinázové (záchranné) signalizace (Wobser H. et al., 2006). Inaktivace AKT1 kinázy (proteinkinázy B) se projevuje nedostatečnou stimulací exprese zmíněného anti-apoptotického proteinu BCL-xL a neschopností inaktivovat pro-apoptotické proteiny (kaspázu 9, BAD).

Na postupném úbytku  $\beta$ -buněčné masy má zřejmě nezanedbatelný podíl i pokles proliferace, např. vlivem prokázaného nárůstu exprese inhibitoru buněčného cyklu – inhibitoru cyklin-dependentní kinázy p27<sup>KIP1</sup> (Wobser H. et al., 2002) či selhání exprese *IGF-1* genu (Yang Q. et al., 2002), který je rozhodující pro regulaci růstu pankreatických  $\beta$ -buněk. Některé zvířecí i buněčné modely *HNF1A*-*MODY* dokonce naznačují, že pokles funkční  $\beta$ -buněčné masy je primárním mechanismem defektní glukózou stimulované inzulínové sekrece (Wobser H. et al., 2002; Bonner C. et al., 2010). Spíše však k deterioraci  $\beta$ -buněčné funkce přispívá, a to velmi časně. Studie nositelů *HNF1A* a *HNF4A* mutace v prediabetickém období ukazují, že se inzulínová sekrece snižuje, už když plasmatická glykémie přesáhne 8 mmol/l (Byrne M. et al., 1996; Byrne M. et al., 1995). Což zcela reálně naznačuje, že k  $\beta$ -buněčné dysfunkci přispívá velmi brzy i redukce  $\beta$ -buněčné masy (Wobser H. et al., 2002).

K destrukci  $\beta$ -buněk u *MODY* proto může docházet vlivem: *a)* geneticky podmíněné aktivace apoptózy a oslabené schopnosti  $\beta$ -buněk proliferovat; *b)* nedostatku funkčních  $\beta$ -buněk; *c)* kvalitativního defektu v inzulínové sekreci a postupné deteriorace glykemické kompenzace.

*Hypoteticky však expresi ostrůvkových autoprotilátek může zapříčinit prakticky jakýkoliv destruktivní proces postihující Langerhansovy ostrůvky.* K dalším (navazujícím) spouštěcím mechanismům apoptózy  $\beta$ -buněk proto může patřit:

- *toxický metabolický efekt hyperglykémie a dyslipidémie* (Mandrup-Poulsen T., 2001; Němcová-Fürstová V. et al., 2011);
- *prolongovaná nadměrná funkční stimulace a námaha pankreatických  $\beta$ -buněk* (Prentki M. et al., 2006; Mandrup-Poulsen T., 2001);
- *popř. též infekční agens* [pankreatotropní virová infekce jak je předpokládáno u diabetes mellitus 1. typu (Leslie, R. D. et al., 1999)].

Hyperglykémie může významně přispívat k úbytku  $\beta$ -buněčné masy indukcí apoptózy v  $\beta$ -buňkách mechanismem aktivace dráhy receptoru smrti (tj. up-regulací exprese Fas receptoru, jenž může interagovat s konstitutivně exprimovaným Fas ligandem sousedních buněk) a aktivací iniciační kaspázy 8 (Maedler K. et al., 2001). Lipotoxicita by mohla hrát v apoptotické smrti  $\beta$ -buněk klíčovou roli. U buněk s dominantně-negativní supresí *HNF-1 $\alpha$*  totiž byla prokázána vysoká citlivost k ceramidové toxicitě (Wobser H. et al., 2002); a ceramid je klíčový mediátor apoptózy indukované volnými mastnými kyselinami. Naopak v případě glykemického stresu nebyla (překvapivě) taková citlivost prokázána (Wobser H. et al., 2002). K poškození  $\beta$ -buněk u *MODY* rezultující v apoptózu může potencionálně přispívat i další faktory *stres endoplasmatického retikula* (ER) [v *INS-1* buňkách s dominantně negativní expresí *Hnf-1 $\alpha$*  byla prokázána vyšší citlivost na stres ER a jím indukovanou apoptózu (Kirkpatrick C. L. et al., 2011)]. *HNF-1 $\alpha$*  je totiž potřebný pro transkripci *Xbp1*, genu kódující protein *XBP1*, jenž slouží jako hlavní regulátor odpovědi na stres ER. Ztráta funkce *XBP1* je v případě  $\beta$ -buňky jednoduše toxická pro neschopnost normální odpovědi na stres ER a navozuje buněčnou smrt.

Uvedené mechanismy  $\beta$ -buněčné smrti se účastní patogeneze různých typů diabetes mellitus. S iniciátory apoptózy  $\beta$ -buněk jako je např. hyperglykémie, lipotoxicita, stres ER a

mitochondriální dysfunkce, se setkáváme v patogenezi diabetes mellitus 2. typu (Pelikánová T., 2007). Je proto zajímavé, že podobně jako v naší studii byly ostrůvkové autoprotilátky prokázány v 31% případech dospělých diabetiků 2. typu (nově diagnostikovaných), přičemž také dominoval výskyt GADA [36%] (Brooks-Worrell B. M. et al., 2011). Hladina autoprotilátek také dynamicky fluktovala, a to dokonce v rámci několika málo měsíců. Také u dětských diabetiků s „fenotypově“ typickým diabetes mellitus 2. typu jsou ostrůvkové autoprotilátky detekovatelné s větší prevalencí. Přítomnost alespoň jedné autoprotilátky (GADA, IA-2A anebo IAA) je prokazatelná u téměř 30% dětí s cukrovkou 2. typu (Umpaichitra V. et al., 2002; Reinehr T. et al., 2006). Opět analogicky jako v naší studii s MODY pacienty, byla v obou věkových skupinách diabetiků 2. typu i přes přítomnost autoprotilátek zachována inzulínová sekrece (na základě měření hladiny C-peptidu v séru), nicméně u dospělých diabetiků byl zjištěn rozdíl v lačném C-peptidu po adjustaci na délku trvání diabetu.

*Horší glykemickou kompenzaci a potažmo též časnější nástup diabetu u pacientů s ostrůvkovými autoprotilátkami v této studii, by mohla alespoň částečně objasnit genetická výbava těchto jedinců, resp. zděděné susceptibilní geny diabetes mellitus 2. typu (Molven A. & Njolstad P. R., 2011), jež mohou ovlivnit fenotyp příslušné monogenní choroby. Přítomnost diabetes mellitus 2. typu u druhého rodiče, resp. spolu-zděděné susceptibilní geny k diabetes mellitus 2. typu (tzv. double gene dose) se prokazatelně pojí s horším fenotypem HNF1A-MODY – tj. časnější diagnostikou diabetu, závažnější hyperglykemií a rozvojem komplikací (Tack C. J. J. et al., 2000). Genetické varianty predisponujících k diabetes mellitus 2. typu působí prostřednictvím snížení  $\beta$ -celulární funkce, spíše než zvýšením inzulínové rezistence. Nelze tak vyloučit, že interagují s  $\beta$ -buněčnou dysfunkcí vycházející primárně z HNF1A mutace a přispívají ke zvýšené míře destrukce  $\beta$ -buněk a tím k dřívějšímu nástupu diabetu (Lango Allen H. et al., 2010).*

*Mladší věk v době diagnostiky diabetu mohla modifikovat i pozice HNF1A mutace a pohlaví. Zasahuje-li kauzální mutace alespoň dvě izoformy, doba manifestace cukrovky se zkracuje o 5,2 let; ženy jsou diagnostikovány o tři roky dříve (Lango Allen H. et al., 2010).*

## **5.2. Význam studie a diskuze nad klinickými výstupy**

Námi provedená studie zpochybňuje selektivitu specifických ostrůvkových autoprotilátek jako výlučného markeru diabetes mellitus 1. typu nebo LADA ve srovnání s MODY. Jelikož výše titru u těchto pacientů přesahovala cut-off hranici používanou v klinické praxi k diagnostice diabetes mellitus 1. typu, může mít tento nálezný dopad na běžnou diferenciálně diagnostickou rozvahu.

Detekce ostrůvkových autoprotilátek u pacientů s hyperglykemií a diabetes mellitus totiž může lékaře odradit od genetického testování a vést ke stanovení nesprávné diagnózy. Mylné přiřazení diagnózy autoimunitního diabetes mellitus 1. typu může vyústit do zcela zbytečné iniciace inzulínoterapie, jež přináší jak akutní zdravotní rizika (hypoglykémie), tak i značný diskomfort a nadměrnou chronickou zátěž pacienta. Nerozpoznání MODY taktéž odpadá možnost detekce této choroby u dalších rodinných příslušníků probanda.

Polemika nad otázkou, zda není načase změnit diagnostická kritéria MODY, vyvstává taktéž z práce Průhové et al., jež prokazuje možný výskyt diabetické ketoacidózy u HNF1-MODY pacientů, byť

její anamnestická přítomnost vylučuje takto postiženého jedince z genetického testování na MODY (Průhová Š. et al., 2013).

## 6. ZÁVĚR

Prokázali jsme vysokou prevalenci specifických ostrůvkových autoprotilátek mezi českými pacienty s MODY. Nejčteněji byly exprimovány GADA, ale též vysoce specifické IA-2A. S výjimkou jediného případu jejich výskyt nekoreloval s jiným faktorem asociovaným tradičně se vznikem diabetes mellitus 1. typu, tj. s progresivním úbytkem  $\beta$ -buněk, diabetickou ketoacidózou, absolutní inzulinodependencí či přítomností rizikového HLA genotypu.

Přítomnost ostrůvkových autoprotilátek byla u pacientů s monogenním diabetem spojena s pozdějším nástupem diabetu a provázena horší glykemickou kompenzací. Jejich exprese však klesla při jakémkoliv zlepšení kontroly diabetu. I malé zvýšení dávky stávajících perorálních antidiabetik nebo těsnější compliance s léčbou vedli ke zlepšení glykemické kompenzace, jež byla provázena poklesem nebo úplným ukončením autoprotilátkové sekrece.

Předpokládáme, že podkladem autoprotilátkové exprese není autoimunitní inzulitida, ale destrukce (tj. apoptóza)  $\beta$ -buněk z jiných než autoimunitních příčin. Buněčná smrt může být důsledkem jak komplexní poruchy  $\beta$ -buněčné funkce vycházející z genetického defektu, tak i řady metabolických ataků, spouštějící v obou případech apoptotickou signalizační kaskádu, jakmile je překročen práh pro životaschopnost buňky. Z trvale zachovalé endogenní inzulinové sekrece usuzujeme, že tato destrukce nemusí být v zásadě kvantitativně významnou.

Význam této studie spočívá ve zpochybnění platného dogma o absenci autoprotilátek u MODY a v nabourání tradičních diagnostických a diferenciálně diagnostických kritérií pro diagnostiku MODY a diskriminaci jiných typů diabetes mellitus. Chybná interpretace nálezu specifických ostrůvkových autoprotilátek má v případě MODY pacientů zdrcující následky v podobě zbytečné doživotní léčby injekcemi inzulinu a dramatické akcelerace diabetických komplikací v případě, že tato léčba selhává v dosažení terapeutických cílů; a to nejen u postižených jednotlivců, ale i v celých generacích diabetických příbuzných.

## 7. SOUHRN

Tato práce přináší svědectví o prevalentní a tranzientní sekreci specifických ostrůvkových autoprotilátek u širokého spektra českých MODY pacientů (včetně familiárního výskytu). Na základě zjištěných dat navrhuje hypotézu, že přítomnost ostrůvkových autoprotilátek u pacientů s MODY může být asociována s rozdíly v rozvoji a progresi MODY diabetu, kdy kinetika jejich exprese reflektuje probíhající neautoimunitní destrukci  $\beta$ -buněk rezultující v klinicky významné zhoršení glykemické kompenzace, jež může provázet vyšší nároky na compliance a léčbu. Konkrétní mechanismus sekrece ostrůvkových autoprotilátek u MODY však zůstává nejasný a měl by být dále detailněji prozkoumán.

Práce zároveň upozorňuje na možnost chybné diferenciální diagnostiky diabetu při mylné interpretaci nálezu ostrůvkových autoprotilátek, se všemi jejími následky (tj. chybné vedení léčby a

stanovení prognózy v rozsahu celé postižené rodiny) a upozorňuje na nutnost revize diagnostických kritérií MODY.

## SUMMARY

This study reports on highly prevalent and transient islet cell autoantibody expression in a wide spectrum of Czech patients with maturity-onset diabetes of the young (including familiar appearance). Based on obtained data, we suggest hypothesis that presence of islet autoantibodies in patients with MODY is associated with differences in diabetes onset and progression, and that kinetics of autoantibodies expression reflects ongoing non-autoimmune  $\beta$ -cell destruction which results in clinically significant deterioration of diabetes control with higher claims on patient's compliance and diabetes treatment. The specific mechanism of autoantibodies secretion, however, remains unclear and should be further explored in detail.

This study also highlights possibility of erroneous interpretation of autoantibodies presence in diabetes diagnosis, with all its consequences (wrong medication management and prognosis, concerning all the family members), and highlights the need for revising the MODY diagnostic criteria.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Aguilera, E., Casamitjana, R., Ercilla, G., Oriola, J., Nicoletti, F., Gomis, R., & Conget, I. (2005). Clinical characteristics,  $\beta$ -cell function, HLA class II and mutations in MODY genes in non-paediatric subjects with Type 1 diabetes without pancreatic autoantibodies. *Diabetic medicine*, 22(2), 137-143.

Ahn, S. H., Shah, Y. M., Inoue, J., Morimura, K., Kim, I., Yim, S., Lambert, G., Kurotani, R., Nagashima, K., Gonzalez F. J., & Inoue, Y. (2008). Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  in the intestinal epithelial cells protects against inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, 14(7), 908-920.

Akiyama, T. E., Ward, J. M., & Gonzalez, F. J. (2000). Regulation of the Liver Fatty Acid-binding Protein Gene by Hepatocyte Nuclear Factor 1 $\alpha$  (HNF1 $\alpha$ ) Alterations in fatty acids homeostasis in HNF1 $\alpha$ -deficient mice. *Journal of Biological Chemistry*, 275(35), 27117-27122.

Aksoy, D. Y., Yürekli, B. P., Yildiz, B. O., & Gedik, O. (2006). Prevalence of glutamic acid decarboxylase antibody positivity and its association with insulin secretion and sensitivity in autoimmune thyroid disease: A pilot study. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes: official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 114(8), 412-416.

D'Angelo, A., Bluteau, O., Garcia-Gonzalez, M. A., Gresh, L., Doyen, A., Garbay, S., Robine, S., & Pontoglio, M. (2010). Hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$  and  $\beta$  control terminal differentiation and cell fate commitment in the gut epithelium. *Development*, 137(9), 1573-1582.

d'Annunzio, G., Giannattasio, A., Poggi, E., Castellano, E., Calvi, A., Pistorio, A., ... & Lorini, R. (2009).  $\beta$ -cell autoimmunity in pediatric celiac disease: the case for routine screening?. *Diabetes care*, 32(2), 254-256.

- Bartoov-Shifman, R., Hertz, R., Wang, H., Wollheim, C. B., Bar-Tana, J., & Walker, M. D. (2002). Activation of the insulin gene promoter through a direct effect of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*, 277(29), 25914-25919.
- Bell, G. I., Xiang, K. S., Newman, M. V., Wu, S. H., Wright, L. G., Fajans, S. S., Spielman, R. S., & Cox, N. J. (1991). Gene for noninsulin-dependent diabetes mellitus (maturity-onset diabetes of the young subtype) is linked to DNA polymorphism on human chromosome 20q. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 88(4):1484-1488.
- Bellanné-Chantelot, C., Carette, C., Riveline, J. P., Valéro, R., Gautier, J. F., Larger, E., Reznik, Y., Ducluzeau, P. H., Sola, A., Hartemann-Heurtier, A., Lecomte, P., Chaillous, L., Laloi-Michelin, M., Wilhem, J. M., Cuny, P., Duron, F., Guerci, B., Jeandidier, N., Mosnier-Pudar, H., Assayag, M., Dubois-Laforgue, D., Velho, G., & Timsit J. (2008). The type and the position of HNF1A mutation modulate age at diagnosis of diabetes in patients with maturity-onset diabetes of the young (MODY)-3. *Diabetes*, 57(2), 503-508.
- Bluteau, O., Jeannot, E., Bioulac-Sage, P., Marques, J. M., Blanc, J. F., Bui, H., Beaudoin, J. C., Franco, D., Balabaud, C., Laurent-Puig, P., & Zucman-Rossi, J. (2002). Bi-allelic inactivation of TCF1 in hepatic adenomas. *Nature Genetics*, 32(2), 312–315.
- Bogan, A. A., Dallas-Yang, Q., Ruse Jr, M. D., Maeda, Y., Jiang, G., Nepomuceno, L., Scanlan, T. S., Cohen, E. F., & Sladek, F. M. (2000). Analysis of protein dimerization and ligand binding of orphan receptor HNF4 $\alpha$ . *Journal of molecular biology*, 302(4), 831-851.
- Boj, S. F., Parrizas, M., Maestro, M. A., & Ferrer, J. (2001) A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 98(25):14481-6
- Boj, S. F., Servitja, J. M., Martin, D., Rios, M., Talianidis, I., Guigo, R., & Ferrer, J. (2009). Functional targets of the monogenic diabetes transcription factors HNF-1 $\alpha$  and HNF-4 $\alpha$  are highly conserved between mice and humans. *Diabetes*, 58(5), 1245-53.
- Bolotin, E., Schnabl, J., & Sladek, F. M. (2010). HNF4A (Homo sapiens). *Transcription Factor Encyclopedia*.
- Bolotin, E., Liao, H., Ta, T. C., Yang, C., Hwang-Verslues, W., Evans, J. R., Jiang, T. & Sladek, F. M. (2010). Integrated approach for the identification of human hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  target genes using protein binding microarrays. *Hepatology*, 51(2), 642-653.
- Bonifacio, E., Bingley, P. J., Shattock, M., Dean, B. M., Dunger, D., Gale, E. A., & Bottazzo, G. F. (1990). Quantification of islet-cell antibodies and prediction of insulin-dependent diabetes. *Lancet*, 335(8682), 147-149.
- Bonner, C., Bacon, S., Concannon, C. G., Rizvi, S. R., Baquié, M., Farrelly, A. M., Kilbride, S. M., Dussmann, H., Ward, M. W., Boulanger, C. M., Wollheim, C. B., Graf, G., Byrne, M. M., & Prehn

- J. H. M. (2010). INS-1 Cells Undergoing Caspase-Dependent Apoptosis Enhance the Regenerative Capacity of Neighboring Cells. *Diabetes*, 59(11), 2799–2808.
- Bonner-Weir, S., Li, W. C., Ouziel-Yahalom, L., Guo, L., Weir, G. C., & Sharma, A. (2010).  $\beta$ -cell growth and regeneration: replication is only part of the story. *Diabetes*, 59(10), 2340-2348.
- Borg, H., Gottsäter, A., Landin-Olsson, M., Fernlund, P., & Sundkvist, G. (2001). High levels of antigen-specific islet antibodies predict future beta- cell failure in patients with onset of diabetes in adult age. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86 (7), 3032 –3038.
- Borg, H., Gottsäter, A., Fernlund, P., & Sundkvist, G. (2002). A 12-year prospective study of the relationship between islet antibodies and beta-cell function at and after the diagnosis in patients with adult-onset diabetes. *Diabetes*, 51(6), 1754-62.
- Bosse, T., Fialkovich, J. J., Piaseckyj, C. M., Beuling, E., Broekman, H., Grand, R. J., Montgomery, R. K., & Krasinski, S. D. (2007). Gata4 and Hnf1 $\alpha$  are partially required for the expression of specific intestinal genes during development. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(5), G1302-G1314.
- Bottazzo, G., Florin-Christensen, A., & Doniach, D. (1974). Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *The Lancet*, 304(7892), 1279-1283.
- Bowden, S. A., & Hoffman, R. P. (2008). Triple diabetes: coexistence of type 1 diabetes mellitus and a novel mutation in the gene responsible for MODY3 in an overweight adolescent. *Pediatric diabetes*, 9(2), 162-164.
- Boyd, M., Bressendorff, S., Møller, J., Olsen, J., & Troelsen, J. T. (2009). Mapping of HNF4 $\alpha$  target genes in intestinal epithelial cells. *BMC gastroenterology*, 9(1), 68.
- Brooks-Worrell, B., Gersuk, V. H., Greenbaum, C., & Palmer, J. P. (2001). Intermolecular antigen spreading occurs during the preclinical period of human type 1 diabetes. *Journal of Immunology*, 166(8), 5265–5270
- Brooks-Worrell, B. M., Reichow, J. L., Goel, A., Ismail, H., & Palmer, J. P. (2011). Identification of autoantibody-negative autoimmune type 2 diabetic patients. *Diabetes care*, 34(1), 168-173.
- Brunerová, L., Brož, J., Průhová, Š., Lébl, J., & Anděl, M. (2006). Maturity-onset diabetes of the young 3 (MODY3). *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa*, 2, 53-56.
- Bulla, G. A., Givens, E., Brown, S., Oladiran, B., & Kraus, D. (2001). A common regulatory locus affects both HNF4/HNF1 ( $\alpha$ ) pathway activation and sensitivity to LPS-mediated apoptosis in rat hepatoma cells. *Journal of cell science*, 114(6), 1205-1212.
- Byrne, M. M., Sturis, J., Menzel, S., Yamagata, K., Fajans, S. S., Dronsfield, M. J., Bain, S. C, Hattersley, A. T, Velho, G., Froguel, P., Bell, G. I. & Polonsky, K. S. (1996). Altered insulin secretory responses to glucose in diabetic and nondiabetic subjects with mutations in the diabetes susceptibility gene MODY3 on chromosome 12. *Diabetes*, 45(11), 1503-1510.

Byrne, M. M., Sturis, J., Fajans, S. S., Ortiz, F. J., Stoltz, A., Stoffel, M., Smith, M. J., Bell, G. I., Halter, J. B., & Polonsky, K. S. (1995). Altered insulin secretory responses to glucose in subjects with a mutation in the MODY1 gene on chromosome 20. *Diabetes*, 44(6), 699-704.

Calcaterra, V., Martinetti, M., Salina, A., Aloï, C., & Larizza, D. (2012). The coexistence of type 1 diabetes, MODY2 and metabolic syndrome in a young girl. *Acta diabetologica*, 49(5), 401-404.

Cardot, P., Chambaz, J., Cladaras, C., & Zannis, V. I. (1991). Regulation of the human ApoA-II gene by the synergistic action of factors binding to the proximal and distal regulatory elements. *Journal of Biological Chemistry*, 266(36), 24460-24470.

Cejkova, P., Novota, P., Cerna, M., Kolostova, K., Novakova, D., Kucera, P., Novak, J., Andel, M., Weber, P. and Zdarsky, E. (2008), HLA DRB1, DQB1 and insulin promoter VNTR polymorphisms: interactions and the association with adult-onset diabetes mellitus in Czech patients. *International Journal of Immunogenetics*, 35: 133–140

Cereghini S. (1996). Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB Journal*, 10(2), 267-282.

Černá, M., Novota, P., Kolostová, K., Čejková, P., Žďárský, E., Nováková, D., Kučera, P., Novak, J., & Anděl, M. (2003). HLA in Czech adult patients with autoimmune diabetes mellitus: comparison with Czech children with type 1 diabetes and patients with type 2 diabetes. *European Journal of Immunogenetics*; 30(6): 401-407.

Černá, M., Průhová, Š., Dušátková, P. (2013). *Genetika diabetes mellitus a jeho komplikací*. Praha: Tigris.

Chakrabarti, S. K., & Mirmira, R. G. (2003). Transcription factors direct the development and function of pancreatic  $\beta$  cells. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 14(2), 78-84.

Chen, W. S., Manova, K., Weinstein, D. C., Duncan, S. A., Plump, A. S., Prezioso, V. R., Bachvarova, R. F., & Darnell, J. E., Jr. (1994). Disruption of the *HNF-4* gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes & Development*, 8(20), 2466–2477.

Chiba, H., Gotoh, T., Kojima, T., Satohisa, S., Kikuchi, K., Osanai, M., & Sawada, N. (2003). Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 $\alpha$  triggers formation of functional tight junctions and establishment of polarized epithelial morphology in F9 embryonal carcinoma cells. *Experimental Cell Research*, 286(2), 288–297.

Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J. C., Jörns, A., Lenzen, S., & Eizirik, D. L. (2005). Mechanisms of pancreatic  $\beta$ -cell death in Type 1 and Type 2 diabetes many differences, few similarities. *Diabetes*, 54(suppl 2), S97-S107.

Coffinier, C., Thépot, D., Babinet, C., Yaniv, M., & Barra J. (1999). Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1 $\beta$  in visceral endoderm differentiation. *Development* 126(21), 4785-4794.



Colclough, K., Saint-Martin, C., Timsit, J., Ellard, S., & Bellanné-Chantelot, C. (2014). Clinical utility gene card for: Maturity-onset diabetes of the young. *European Journal of Human Genetics*, advance online publication 12 February 2014; doi: 10.1038/ejhg.2014.14.

Darsigny, M., Babeu, J.-P., Dupuis, A.-A., Furth, E. E., Seidman, E. G., Lévy, É., Verdu, E. F., Gendron F.-P., & Boudreau F. (2009). Loss of Hepatocyte-Nuclear-Factor-4a Affects Colonic Ion Transport and Causes Chronic Inflammation Resembling Inflammatory Bowel Disease in Mice. *PLoS ONE*, 4(10), e7609.

Davis, S. N., Thompson, C. J., Peak, M., Brown, M. D., & Albert, K. G. (1992). Effects of human insulin on insulin binding antibody production in nondiabetic subjects. *Diabetes Care*, 15(1), 124–126.

Dukes, I. D., Sreenan, S., Roe, M. W., Levisetti, M., Zhou, Y. P., Ostrega, D., Bell, G. I., Pontoglio, M., Yaniv, M., Philipson, I., & Polonsky, K. S. (1998). Defective pancreatic  $\beta$ -cell glycolytic signaling in hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$ -deficient mice. *Journal of Biological Chemistry*, 273(38), 24457-24464.

Duncan, S. A., Navas, M. A., Dufort, D., Rossant, J., & Stoffel, M. (1998). Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. *Science*, 281(5377), 692-695.

Duncan, S. A., Nagy, A., & Chan, W. (1997). Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: Tetraploid rescue of HNF-4 $^{-/-}$  embryos. *Development*, 124(2), 279–287.

Eisenbarth, G. S., Moriyama, H., Robles, D. T., Liu, E., Yu, L., Babu, S., Redondo, M., Gottlieb, P., Wegmann, D., & Rewers, M. (2002). Insulin autoimmunity: prediction/precipitation/prevention type 1A diabetes. *Autoimmunity reviews*, 1(3), 139-145.

Eisenbarth, G. S. (2010). Banting Lecture 2009: An Unfinished Journey: Molecular Pathogenesis to Prevention of Type 1A Diabetes. *Diabetes*, 59(4), 759-774.

Ellard, S., & Colclough, K. (2006). Mutations in the genes encoding the transcription factors hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1A) and 4 alpha (HNF4A) in maturity-onset diabetes of the young. *Human mutation*, 27(9), 854-869.

Ellard, S., Bellanné-Chantelot, C., & Hattersley, A. T. (2008). Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia*, 51(4), 546-553.

Erickson, R. H., Lai, R. S., & Kim, Y. S. (2000). Role of hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$  and 1 $\beta$  in the transcriptional regulation of human dipeptidyl peptidase IV during differentiation of Caco-2 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 270(1), 235-239.

Evan, G., Harrington, E., Fanidi, A., Land, H., Amati, B., & Bennett, M. (1994). Integrated control of cell proliferation and cell death by the c-myc oncogene. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 345(1313), 269–75.

Fajans, S. S. & Conn, J. W. (1954). An approach to the prediction of diabetes mellitus by modification of the glucose tolerance test with cortisone. *Diabetes*, 3(4), 296-304.

Fajans, S. S., & Conn, J. W. (1959). The early recognition of diabetes mellitus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 82(2), 208-218.

Fajans, S. S. & Conn, J. W. (1965). Prediabetes, subclinical diabetes and latent clinical diabetes: interpretation, diagnosis and treatment. *On the Nature and Treatment Diabetes, Excerpta Medica, Int. Cong. Ser. 84*, 641-656.

Fajans, S. S., Bell, G. I., & Polonsky, K. S. (2001). Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *New England Journal of Medicine*, 345(13), 971-980.

Fajans, S. S. & Bell, G. I. (2011). MODY: History, genetics, pathophysiology, and clinical decision making. *Diabetes Care*, 34(8), 1878-1884.

Feeney, S. J., Myers, M. A., Mackay, I. R., Zimmet, P. Z., Howard, N., Verge, C. F., & Rowley, M. J. (1997). Evaluation of ICA512As in combination with other islet cell autoantibodies at the onset of IDDM. *Diabetes Care*, 20(9), 1403-1407.

Ferrer, J. (2002). A Genetic Switch in Pancreatic  $\beta$ -Cells: Implications for Differentiation and Haploinsufficiency. *Diabetes*, 51(8), 2355-2362.

Frayling, T. M., Evans, J. C., Bulman, M. P., Pearson, E., Allen, L., Owen, K., Bingham, C., Hanneman, M., Shepard, M., Ellard, S. & Hattersley, A. T. (2001). Beta-cell genes and diabetes: molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors. *Diabetes*, 50(1), 94-100.

Froguel, P., Vaxillaire, M., Sun, F., Velho, G., Zouali, H., Butel, M. O., Lesage, S., Vionnet, N., Clément, K., & Fougerousse, F., et al. (1992). Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*, 356(6365):162-164.

Füchtenbusch, M., Bonifacio, E., Lampasona, V., Knopff, A., & Ziegler, A. G. (2004). Immune responses to glutamic acid decarboxylase and insulin in patients with gestational diabetes. *Clinical and Experimental Immunology*, 135(2), 318-321.

Gardner, S. G., Gale, E. A., Williams, A. J., Gillespie, K. M., Lawrence, K. E., Bottazzo, G. F., & Bingley, P. J. (1999). Progression to diabetes in relatives with islet autoantibodies. Is it inevitable?. *Diabetes care*, 22(12), 2049-2054.

Garrison, W. D., Battle, M. A., Yang, C., Kaestner, K. H., Sladek, F. M., & Duncan, S. A. (2006). Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  is essential for embryonic development of the mouse colon. *Gastroenterology*, 130(4), 19-e1.

Gautier-Stein, A., Zitoun, C., Lalli, E., Mithieux, G., & Rajas, F. (2006). Transcriptional Regulation of the Glucose-6-phosphatase Gene by cAMP/Vasoactive Intestinal Peptide in the Intestine ROLE OF HNF4 $\alpha$ , CREM, HNF1 $\alpha$ , and C/EBP $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*, 281(42), 31268-31278.

Glucksmann, M. A., Lehto, M., Tayber, O., Scotti, S., Berkemeier, L., Pulido, J. C., Wu, Y., Ni, W. J., Fang, L., Markel, P., Munnely, K. D., Goranson, J., Orho, M., Young, B. M., Whitacre, J. L., McMenimen, C., Wantman, M., Tuomi, T., Warram, J., Forsblom, C. M., Carlsson, M., Rosenzweig, J., Kennedy, G., Duyk, G. M., & Thomas, J. D. (1997). Novel mutations and a mutational hotspot in the MODY3 gene. *Diabetes*, 46(6), 1081-1086.

Gonzalez F. J. (2008). Regulation of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ -mediated transcription. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 23(1), 2-7.

Gorsuch, A. N., Spencer, K. M., Lister, J., McNally, J. M., Dean, B. M., Bottazzo, G. F., & Cudworth, A. G. (1981). Evidence for a long prediabetic period in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Lancet*, 2(8260-61), 1363-1365.

Gragnoli, C., Lindner, T., Cockburn, B.N., Kaisaki, P.J., Gragnoli, F., Marozzi, G. & Bell, G.I. (1997). Maturity-onset diabetes of the young due to a mutation in the hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  binding site in the promoter of the hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  gene. *Diabetes*, 46(10), 1648–1651.

Graham, J., Hagopian, W. A., Kockum, I., Li, L. S., Sanjeevi, C. B., Lowe, R. M., Schaefer, J. B., Zarghami, M., Day, H. L., Landin-Olsson, M., Palmer, J. P., Janer-Villanueva, M., Hood, L., Sundkvist, G., Lernmark, A., Breslow, N., Dahlquist, G., Blohmé, G.; Diabetes Incidence in Sweden Study Group; Swedish Childhood Diabetes Study Group. (2002). Genetic effects on age-dependent onset and islet cell autoantibody markers in type 1 diabetes. *Diabetes*, 51(5), 1346-1355.

Gupta, R. K., Vatamaniuk, M. Z., Lee, C. S., Flaschen, R. C., Fulmer, J. T., Matschinsky, F. M., Duncan, S. A. & Kaestner, K. H. (2005). The MODY1 gene HNF-4 $\alpha$  regulates selected genes involved in insulin secretion. *Journal of Clinical Investigation*, 115(4), 1006–1015.

Hagenfeldt-Johansson, K. A., Herrera, P. L., Wang, H., Gjinovci, A., Ishihara, H., Wollheim, C. B. (2001). Beta-cell-targeted expression of a dominant-negative hepatocyte nuclear factor-1 alpha induces a maturity-onset diabetes of the young (MODY)3-like phenotype in transgenic mice. *Endocrinology*, 142(12), 5311–5320.

Hansen, S. K., Párrizas, M., Jensen, M. L., Pruhova, S., Ek, J., Boj, S. F., Johansen, A., Maestro, M. A., Rivera, F., Eiberg, H., Andel, M., Lebl, J., Pedersen, O., Ferrer J., & Hansen, T. (2002). Genetic evidence that HNF-1 $\alpha$ -dependent transcriptional control of HNF-4 $\alpha$  is essential for human pancreatic  $\beta$  cell function. *Journal of Clinical Investigation*, 110(6), 827-833.

Hattersley, A. T., Turner, R. C., Patel, P., O'Rahilly, S., Wainscoat, J. S., Permutt, M. A., Tanazawa, Y., Chin, K. C., & Watkins, P. (1992). Linkage of type 2 diabetes to the glucokinase gene. *The Lancet*, 339(8805), 1307-1310.

- Hattersley A. T. (1998). Maturity-onset diabetes of the young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity. *Diabetic Medicine*, 15(1), 15–24.
- Hayhurst, G. P., Lee, Y. H., Lambert, G., Ward, J. M., & Gonzalez, F. J. (2001). Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Molecular and Cellular Biology*, 21(4), 1393-403.
- Herman, W. H., Fajans, S. S., Smith, M. J., Polonsky, K. S., Bell, G. I., & Halter, J. B. (1997). Diminished insulin and glucagon secretory responses to arginine in nondiabetic subjects with a mutation in the hepatocyte nuclear factor-4alpha/MODY1 gene. *Diabetes*, 46(11), 1749-1754.
- Hiraiwa, H., Pan, C. J., Lin, B., Akiyama, T. E., Gonzalez, F. J., & Chou, J. Y. (2001). A molecular link between the common phenotypes of type 1 glycogen storage disease and HNF1 $\alpha$ -null mice. *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 7963-7967.
- Holmkvist, J., Almgren, P., Lyssenko, V., Lindgren, C. M., Eriksson, K. F., Isomaa, B., Tuomi, T., Nilsson, P., & Groop, L. (2008). Common variants in maturity-onset diabetes of the young genes and future risk of type 2 diabetes. *Diabetes*, 57(6), 1738-1744.
- Honeyman, M. C., Stone, N. L., Falk, B. A., Nepom, G., & Harrison, L. C. (2010). Evidence for molecular mimicry between human T cell epitopes in rotavirus and pancreatic islet autoantigens. *The journal of immunology*, 184(4), 2204-2210.
- Horikawa, Y., Iwasaki, N., Hara, M., Furuta, H., Hinokio, Y., Cockburn, B. N., Lindner T., Yamagata, K., Ogata, M., Tomonaga, O., Kuroki, H., Kasahara, T., Iwamoto, Y., & Bell, G. I. (1997). Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nature Genetics*, 17(4), 384-385.
- Huang, G., Yin, M., Xiang, Y., Li, X., Shen, W., Luo, S., Lin, J., Xie, Z., Zheng, P., and Zhou, Z. (2016) Persistence of glutamic acid decarboxylase antibody (GADA) is associated with clinical characteristics of latent autoimmune diabetes in adults: a prospective study with 3-year follow-up. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 32(6), 615-622.
- Ilag, L. L. , Tabaei, B. P., Herman, W. H., Zawacki, C. M., D'Souza, E., Bell, G. I. & Fajans, S. S. (2000). Reduced pancreatic polypeptide response to hypoglycemia and amylin response to arginine in subjects with a mutation in the HNF-4alpha/MODY1 gene. *Diabetes*, 49(6), 961-968.
- Inoue, Y., Hayhurst, G. P., Inoue, J., Mori, M., & Gonzalez, F. J. (2002). Defective ureagenesis in mice carrying a liver-specific disruption of hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha). HNF4alpha regulates ornithine transcarbamylase in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25257–25265.
- Inoue, Y., Peters, L. L., Yim, S. H., Inoue, J. & Gonzalez, F. J. (2006). Role of hepatocyte nuclear factor 4alpha in control of blood coagulation factor gene expression. *Journal of Molecular Medicine*, 84(4), 334–344.

- Inoue, Y., Yu, A. M., Yim, S. H., Ma, X., Krausz, K. W., Inoue, J., Xiang, C. C., Brownstein, M. J., Eggertsen, G., Björkhem, I., & Gonzalez, F. J. (2006). Regulation of bile acid biosynthesis by hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ . *Journal of Lipid Research*, 47(1), 215-227.
- Inoue, Y., Yu, A. M., Inoue, J. & F. J. Gonzalez. (2004). Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  is a central regulator of bile acid conjugation. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (4), 2480–2489.
- Isomaa, B., Henricsson, M., Lehto, M., Forsblom, C., Karanko, S., Sarelin, L., M. Häggblom, & Groop, L. (1998). Chronic diabetic complications in patients with MODY3 diabetes. *Diabetologia*, 41(4), 467-473.
- Jensen, R. A., Agardhm, E., Lernmark, A., Gudbjornsdottir, S., Smith, N. L., Siscovick, D. S., & Törn, C.; DISS Group. (2011). HLA genes, islet autoantibodies and residual C-peptide at the clinical onset of type 1 diabetes mellitus and the risk of retinopathy 15 years later. *PLoS One*, 6(3), e17569
- Johnson, J. D., Ahmed, N. T., Luciani, D. S., Han, Z., Tran, H., Fujita, J., Mislner, S., Edlund, H., & Polonsky, K. S. (2003). Increased islet apoptosis in Pdx1+/-mice. *The Journal of clinical investigation*, 111(8), 1147-1160.
- Johnson J. D. (2007). Pancreatic Beta-cell apoptosis in maturity onset diabetes of the young. *Canadian Journal of Diabetes*, 31(1), 67-74.
- Kaisaki, P. J., Menzel, S., Lindner, T., Oda, N., Rjasanowski, I., Sahm, J., Meincke, G., Schulze, J., Schmechel, H., Petzold, C., Ledermann, H. M., Sachse, G., Boriraj, V. V., Menzel, R., Kerner, W., Turner, R. C., Yamagata, K., & Bell, G. I. (1997). Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  gene in MODY and early-onset NIDDM: evidence for a mutational hotspot in exon 4. *Diabetes*, 46(3), 528-35.
- Kamiyama, Y., Matsubara, T., Yoshinari, K., Nagata, K., Kamimura, H., & Yamazoe, Y. (2007). Role of Human Hepatocyte Nuclear Factor 4. ALPHA. in the Expression of Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters in Human Hepatocytes Assessed by Use of Small Interfering RNA. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 22(4), 287-298.
- Kash, S. F., Condie, B. G., & Baekkeskov, S. (1999). Glutamate decarboxylase and GABA in pancreatic islets: Lessons from knock-out mice. *Hormone and metabolic research*, 31(5), 340–344.
- Kawasaki, E., Takino, H., Yano, M., Uotani, S., Matsumoto, K., Takao, Y., Yamaguchi, Y., Akazawa, S., & Nagataki, S. (1994). Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in patients with IDDM and autoimmune thyroid disease. *Diabetes*, 43(1), 80-86.
- Kent, S. C., Chen, Y., Bregoli, L., Clemmings, S. M., Kenyon, N. S., Ricordi, C., Hering, B. J., & Hafler, D. A. (2005). Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope. *Nature*, 435(7039), 224-228.
- Keskinen, P., Korhonen, S., Kupila, A., Veijola, R., Erkkilä, S., Savolainen, H., Arvilommi, P., Simell, T., Ilonen, J., Knip, M. & Simell, O. (2002). First-phase insulin response in young healthy children at genetic and immunological risk for Type I diabetes. *Diabetologia*, 45(12), 1639-1648.

Kim, S. H., Ma, X., Klupa, T., Powers, C., Pezzolesi, M., Warram, J. H., Rich, S. S., Krolewski, A. S., & Doria, A. (2003). Genetic modifiers of the age at diagnosis of diabetes (MODY3) in carriers of hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  mutations map to chromosomes 5p15, 9q22, and 14q24. *Diabetes*, 52(8), 2182-2186.

Kirkpatrick, C. L., Wiederkehr, A., Baquié, M., Akhmedov, D., Wang, H., Gauthier, B. R., Akerman, I., Ishihara, H., Ferrer, J. & Wollheim, C. B. (2011). Hepatic Nuclear Factor 1 $\alpha$  (HNF1 $\alpha$ ) Dysfunction Down-regulates X-box-binding Protein 1 (XBP1) and Sensitizes  $\beta$ -Cells to Endoplasmic Reticulum Stress. *Journal of Biological Chemistry*, 286(37), 32300–32312.

Klupa, T., Warram, J. H., Antonellis, A., Pezzolesi, M., Nam, M., Malecki, M. T., Doria, A., Rich, S. S., Krolewski, A. S. (2002). Determinants of the development of diabetes (maturity-onset diabetes of the young-3) in carriers of HNF-1 $\alpha$  mutations: evidence for parent-of-origin effect. *Diabetes Care*, 25(12), 2292–2301.

Knip, M., Korhonen, S., Kulmala, P., Veijola, R., Reunanen, A., Raitakari, O. T., Viikari, J. & Åkerblom, H. K. (2010). Prediction of type 1 diabetes in the general population. *Diabetes Care*, 33(6), 1206-1212.

Kordonouri, O., Charpentier, N., & Hartmann, R. (2011). GADA positivity at onset of type 1 diabetes is a risk factor for the development of autoimmune thyroiditis. *Pediatric diabetes*, 12(1), 31-33.

Krischer, J. P., Cuthbertson, D. D., Yu, L., Orban, T., Maclaren, N., Jackson, R., Winter, W. E, Schatz, D. A., Palmer J. P. & Eisenbarth, G. S.; the Diabetes Prevention Trial-Type 1 Study Group. (2003). Screening strategies for the identification of multiple antibody-positive relatives of individuals with type 1 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(1), 103-108.

Kubosaki, A., Miura, J., & Notkins, A. L. (2004). IA-2 is not required for the development of diabetes in NOD mice. *Diabetologia*, 47(1), 149-150.

Lachance, Ch. (2016). Practical Aspects of Monogenic Diabetes: A Clinical Point of View. *Canadian Journal of Diabetes*, 40(5), 368-375.

Lampasona, V., Petrone, A., Tiberti, C., Capizzi, M., Spoletini, M., di Pietro, S., Songini, M., Bonicchio, S., Giorgino, F., Bonifacio, E., Bosi, E., Buzzetti, R.; & Non Insulin Requiring Autoimmune Diabetes (NIRAD) Study Group. (2010). Zinc transporter 8 antibodies complement GAD and IA-2 antibodies in the identification and characterization of adult-onset autoimmune diabetes: Non Insulin Requiring Autoimmune Diabetes (NIRAD) 4. *Diabetes Care*, 33(1),104-108.

Lango Allen, H., Johansson, S., Ellard, S., Shields, B., Hertel, J. K., Ræder, H., Colclough, K., Molven, A., Frayling, T. M., Njølstad, P. R., Hattersley A. T., & Weedon M. N. (2010). Polygenic Risk Variants for Type 2 Diabetes Susceptibility Modify Age at Diagnosis in Monogenic HNF1A Diabetes. *Diabetes*, 59(1), 266–271.

Latchman, D. S. (1997). Transcription factors: an overview. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 29(12), 1305–12.

- Laugesen, E., Østergaard, J. A., & Leslie, R. D. G. (2015). Latent autoimmune diabetes of the adult: current knowledge and uncertainty. *Diabetic Medicine*, 32(7), 843-852.
- Lausen, J., Thomas, H., Lemm, I., Bulman, M., Borgschulze, M., Lingott, A., Hattersley, A. T. & Ryffel G. U. (2000). Naturally occurring mutations in the human HNF4 $\alpha$  gene impair the function of the transcription factor to a varying degree. *Nucleic Acids Research*, 28(2), 430–437.
- Lébl, J., & Průhová, Š. (2009). *Monogenní diabetes mellitus: od genetiky k léčbě*. Praha: Maxdorf.
- Lee, Y. H., Sauer, B., & Gonzalez, F. J. (1998). Laron dwarfism and non-insulin-dependent diabetes mellitus in the Hnf-1 $\alpha$  knockout mouse. *Molecular and cellular biology*, 18(5), 3059-3068.
- Lehto, M., Tuomi, T., Mahtani, M. M., Widén, E., Forsblom, C., Sarelin, L., Gullström, M., Isomaa, B., Lehtovirta, M., Hyrkkö, A., Kanninen, T., Orho, M., Manley, S., Turner, R. C., Brettin, T., Kirby, A., Thomas, J., Duyk, G., Lander, E., Taskinen M. R. & Groop, L. (1997). Characterization of the MODY3 phenotype. Early-onset diabetes caused by an insulin secretion defect. *Journal of Clinical Investigation*, 99(4), 582.
- de Leiva, A., Mauricio, D., & Corcoy, R. (2007). Diabetes-related autoantibodies and gestational diabetes. *Diabetes Care*, 30(Supplement 2), S127-S133.
- Leslie, R. D., Atkinson, M. A., & Notkins, A. L. (1999). Autoantigens IA-2 and GAD in Type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*, 42(1), 3-14.
- Li, J., Ning, G. & Duncan S. A. (2000). Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4 $\alpha$ . *Genes & Development*, 14(4), 464–474.
- Littorin, B., Sundkvist, G., Hagopian, W., Landin-Olsson, M., Lernmark, A., Ostman, J., Arnqvist, H. J., Blohmé, G., Bolinder, J., Eriksson, J. W., Lithner, F., Scherstén, B., & Wibell, L. (1999). Islet cell and glutamic acid decarboxylase antibodies present at diagnosis of diabetes predict the need for insulin treatment. A cohort study in young adults whose disease was initially labeled as type 2 or unclassifiable diabetes. *Diabetes Care*, 22(3), 409-412.
- Lobe, C. G. (1992). Transcription Factors and Mammalian Development. *Current Topics on Developmental Biology*, 27:351-383.
- Love-Gregory, L. D., Wasson, J., Ma, J., Jin, C. H., Glaser, B., Suarez, B. K., & Permutt, M. A. (2004). A common polymorphism in the upstream promoter region of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene on chromosome 20q is associated with type 2 diabetes and appears to contribute to the evidence for linkage in an Ashkenazi Jewish population. *Diabetes* 53(4), 1134-1140
- Lundgren, V. M., Isomaa, B., Lyssenko, V., Laurila, E., Korhonen, P., Groop, L. C., Tuomi, T., & for the Botnia Study Group. (2010). GAD Antibody Positivity Predicts Type 2 Diabetes in an Adult Population. *Diabetes*, 59(2), 416–422.

Maedler, K., Spinas, G. A., Lehmann, R., Sergeev, P., Weber, M., Fontana, A., Kaiser, N. & Donath, M. Y. (2001). Glucose induces  $\beta$ -cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes*, *50*(8), 1683-1690.

Maestro, M., Cardalda, C., Boj, S., Luco, R., Servitja, J., & Ferrer, J. (2007). Distinct Roles of HNF1 B, HNF1  $\alpha$ , and HNF4  $\alpha$  in Regulating Pancreas Development, B-Cell Function and Growth. *Development of the Pancreas and Neonatal Diabetes*, *12*, 33-45.

Maltoni, G., Zucchini, S., Scipione, M., Mantovani, V., Salardi, S., & Cicognani, A. (2012). Onset of type 1 diabetes mellitus in two patients with maturity onset diabetes of the young. *Pediatric Diabetes*, *13*, 208–212.

Mandrup-Poulsen, T. (2001). beta-cell apoptosis: stimuli and signaling. *Diabetes*, *50*(suppl 1), 58.

Marcil, V., Sinnett, D., Seidman, E., Boudreau, F., Gendron, F. P., Beaulieu, J. F., Menard, D., Lambert, M., Bitton, A., Sanchez, R., Amre, D., & Levy, E. (2012). Association between genetic variants in the HNF4A gene and childhood-onset Crohn's disease. *Genes and Immunity*, *13*(7), 556-565.

Mathis, D., Vence, L., & Benoist, C. (2001).  $\beta$ -Cell death during progression to diabetes. *Nature*, *414*(6865), 792-798.

McCarthy M. I. & Hattersley A. T. (2008). Learning from molecular genetics: novel insights arising from definition of genes for monogenic and type 2 diabetes. *Diabetes*, *57*(\_), 2889-2898.

McDonald, T.J., Colclough, K., Brown, R., et al. (2011). Islet autoantibodies can discriminate maturity-onset diabetes of the young (MODY) from Type 1 diabetes. *Diabetic Medicine*, *28*, 1028-1033.

McDonald, T.J., Shields, B. M., Lawry, J., Owen, K. R., Gloyn, A. L., Ellard, S., & Hattersley, A. T. (2011). High-sensitivity CRP discriminates HNF1A-MODY from other subtypes of diabetes. *Diabetes Care*, *34*(8), 1860-1862.

Menzel, R., Kaisaki, P. J., Rjasanowski, I., Heinke, P., Kerner, W. & Menzel, S. (1998) A low renal threshold for glucose in diabetic patients with a mutation in the hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  (HNF-1 $\alpha$ ) gene. *Diabetic Medicine*, *15*(10), 816–820.

Miquerol, L., Lopez, S., Cartier, N., Tulliez, M., Raymondjean, M., & Kahn, A. (1994). Expression of the L-type pyruvate kinase gene and the hepatocyte nuclear factor 4 transcription factor in exocrine and endocrine pancreas. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(12), 8944-8951.

Mitchell, P. J., & Tjian, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*, *245*(4916), 371–8.

Miura, A., Yamagata, K., Kakei, M., Hatakeyama, H., Takahashi, N., Fukui, K., Nammo, T., Yoneda, K., Inoue, Y., Sladek, F. M., Magnuson, M. A., Kasai, H., Miyagawa, J., Gonzalez, F. J., & Shimomura, I. (2006). Hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  is essential for glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(8), 5246-5257.



- Molven, A., & Njølstad, P. R. (2011). Role of molecular genetics in transforming diagnosis of diabetes mellitus. *Expert Review of Molecular Diagnostic*, 11(3), 313–320.
- Murphy, R., Ellard, S., & Hattersley, A.T. (2008). Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic  $\beta$ -cell diabetes. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*, 4(4), 200-213.
- Mouchel, N., Henstra, S. A., McCarthy, V. A., Williams, S. H., Phylactides, M., & Harris, A. (2004). HNF1 $\alpha$  is involved in tissue-specific regulation of CFTR gene expression. *Biochemical Journal*, 378(3), 909-918.
- Naik, R. G., & Palmer, J. P. (2003). Latent autoimmune diabetes in adults (LADA). *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 4(3), 233-241.
- Němcová-Fürstová, V., James, R. F., & Kovář, J. (2011). Inhibitory effect of unsaturated fatty acids on saturated fatty acid-induced apoptosis in human pancreatic  $\beta$ -cells: Activation of caspases and ER stress induction. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 27(5), 525-538.
- Niehof, M., & Borlak, J. (2005). RSK4 and PAK5 are novel candidate genes in diabetic rat kidney and brain. *Molecular Pharmacology*, 67(3), 604–611.
- Niehof, M., & Borlak, J. (2008). HNF4 $\alpha$  and the Ca-Channel TRPC1 Are Novel Disease Candidate Genes in Diabetic Nephropathy. *Diabetes*, 57(4), 1069-1077.
- Novota, P., Cerna, M., Kolostova, K., Cejkova, P., Zdarsky, E., Novakova, D., Kucera, P., Novak, J., & Andel, M. (2004). Diabetes mellitus in adults: association of HLA DRB1 and DQB1 diabetes risk alleles with GADab presence and C-peptide secretion. *Immunology Letters*, 95(2), 229-32.
- Notkins, A. L., & Lernmark, Å. (2001). Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *The Journal of clinical investigation*, 108(9), 1247-1252.
- Odom, D. T., Dowell, R. D., Jacobsen, E. S., Gordon, W., Danford, T. W., MacIsaac, K. D., Rolfe, P. A., Conboy, C. M., Gifford, D. K. & Fraenkel, E. (2007). Tissue-specific transcriptional regulation has diverged significantly between human and mouse. *Nature genetics*, 39(6), 730-732.
- Odom, D. T., Zizlsperger, N., Gordon, D. B., Bell, G. W., Rinaldi, N. J., Murray, H. L., Volkert, T. L., Schreiber, J., Rolfe, P. A., Gifford, D. K., Fraenkel, E., Bell, G. I., & Young, R. A. (2004). Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science*, 303(5662), 1378-1381.
- Ortega-Rodriguez, E., Levy-Marchal, C., Guillermine, S., & Polak, M. (2001). Beta-cell autoimmunity in a child with M.O.D.Y. (Maturity Onset Diabetes in the Young). *Diabetes Metabolism*; 27, 59-61.
- Palmer, J. P., Hampe, C. S., Chiu, H., Goel, A., & Brooks-Worrell, B. M. (2005). Is latent autoimmune diabetes in adults distinct from type 1 diabetes or just type 1 diabetes at an older age?. *Diabetes*, 54(suppl 2), S62-S67.

Parviz, F., Matullo, C., Garrison, W.D., Savatski, L., Adamson, J.W., Ning, G., Kaestner, K. H., Rossi, J.M., Zaret, K.S., & Duncan, S. A. (2003). Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nature Genetics*, 34(3), 292–296.

Pawson, T. (1993). Signal transduction--a conserved pathway from the membrane to the nucleus. *Developmental Genetics*. 14 (5): 333–8.

Pearson, E.R., Liddell, W. G., Shepherd, M., Corrall, R. J., & Hattersley, A. T. (2000). Sensitivity to sulphonylureas in patients with hepatocyte nuclear factor-1alpha gene mutations: evidence for pharmacogenetics in diabetes. *Diabetic Medicine*, 17(7), 543-545.

Pearson, E. R., Velho, G., Clark, P., Stride, A., Shepherd, M., Frayling, T. M., Bulman, M. P., Ellard, S., Froguel, P., & Hattersley, A. T. (2001). Beta-cell genes and diabetes: quantitative and qualitative differences in the pathophysiology of hepatic nuclear factor-1alpha and glucokinase mutations. *Diabetes*, 50(1), 101-107.

Pearson E. (2003). HDL-cholesterol: differentiating between HNF-1 $\alpha$  MODY and type 2 diabetes [abstract]. *Diabetic Medicine*, 20(suppl.22), 21–33.

Pearson, E. R., Starkey, B. J., Powell, R. J., Gribble, F. M., Clark, P. M., & Hattersley, A. T. (2003). Genetic cause of hyperglycaemia and response to treatment in diabetes. *The Lancet*, 362(9392), 1275-1281.

Pearson, E. R., Pruhova, S., Tack, C. J., Johansen, A., Castleden, H. A. J., Lumb, P. J., Wierzbicki, A. S., Clark, P. M., Lebl, J., Pedersen, O., Ellard, S., Hansen, T., & Hattersley A. T. (2005). Molecular genetics and phenotypic characteristics of MODY caused by hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  mutations in a large European collection. *Diabetologia*, 48(5), 878-885.

Pearson, E. R., Boj, S. F., Steele, A. M., Barrett, T., Stals, K., Shield, J. P., Sian, E., Ferrer, J. & Hattersley, A. T. (2007). Macrosomia and hyperinsulinaemic hypoglycaemia in patients with heterozygous mutations in the HNF4A gene. *PLoS medicine*, 4(4), e118.

Pelikánová, T., & Bartoš V. (2012). *Praktická diabetologie, 5. vydání*. Praha: Maxdorf.

Pelikánová, T. (2007). *Trendy soudobé diabetologie, svazek 11*. Praha: Galén.

Pennesi, M. E., Cho, J. H., Yang, Z., Wu, S. H., Zhang, J., Wu, S. M., & Tsai, M. J. (2003). BETA2/NeuroD1 null mice: a new model for transcription factor-dependent photoreceptor degeneration. *The Journal of neuroscience*, 23(2), 453-461.

Pihoker, C., Gilliam, L. K., Hampe, C. S., & Lernmark, Å. (2005). Autoantibodies in diabetes. *Diabetes*, 54(suppl 2), S52-S61.

- Plíhalová, A., Anděl, M., Andělová, M., Urbanová, J., Hajer, J., Gürlich, R., Kučera, P., Škrha, P., Polák, J., Novák, J., & Hneberg, P. Elevated serum levels of islet cell autoantibodies are present in a fifth non-diabetic patients with pancreatic cancer. *Unpublished data*.
- Pontoglio, M., Barra, J., Hadchouel, M., Doyen, A., Kress, C., Bach, J. P., Babinet, C., & Yaniv, M. (1996). Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell*, *84*(4), 575-585.
- Pontoglio, M., Sreenan, S., Roe, M., Pugh, W., Ostrega, D., Doyen, A., Pick, A. J., Baldwin, A., Velho, G., Froguel, P., Levisetti, M., Bonner-Weir, S., Bell, G. I., Yaniv, M., & Polonsky, K. S. (1998). Defective insulin secretion in hepatocyte nuclear factor 1alpha-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*, *101*(10), 2215-2222.
- Pontoglio, M., Prié, D., Cheret, C., Doyen, A., Leroy, C., Froguel, P., Velho, G., Yaniv, M., & Friedlander, G. (2000). HNF1 $\alpha$  controls renal glucose reabsorption in mouse and man. *EMBO reports*, *1*(4), 359-365.
- Potter, K. N., & Wilkin, T. J. (2000). The molecular specificity of insulin autoantibodies. *Diabetes/metabolism research and reviews*, *16*(5), 338-353.
- Prentki, M., & Nolan, C. J. (2006). Islet  $\beta$  cell failure in type 2 diabetes. *The Journal of clinical investigation*, *116*(7), 1802-1812.
- Průhová, Š., Ek, J., Lébl, J., Šumník, Z., Saudek, F., Anděl, M., Pedersen, O., & Hansen, T. (2003). Genetic epidemiology of MODY in the Czech Republic: Novel mutations in the MODY genes HNF-4 $\alpha$ , GCK and HNF-1 $\alpha$ . *Diabetologia*, *46*(2), 291-295.
- Pruhova, S., Dusatkova, P., Neumann, D., Hollay, E., Cinek, O., Lebl, J., & Sumnik, Z. (2013). Two cases of diabetic ketoacidosis in HNF1A-MODY linked to severe dehydration: is it time to change the diagnostic criteria for MODY? *Diabetes Care*, *36*(9), 2573-2574.
- Ptashne, M., & Gann, A. (1997). Transcriptional activation by recruitment. *Nature*, *386*(6625), 569–77.
- Pugliese, A., Kawasaki, E., Zeller, M., Yu, L., Babu, S., Solimena, M., Moraes, C. T., Pietropaolo, M., Friday, R. P., Trucco, M., Ricordi, C., Allen, M., Noble, J. A., Erlich, H. A., & Eisenbarth, G. S. (1999). Sequence analysis of the diabetes-protective human leukocyte antigen-DQB1\*0602 allele in unaffected, islet cell antibody-positive first degree relatives and in rare patients with type 1 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *84*(5), 1722–1728.
- Quasdorff, M., Hösel, M., Odenthal, M., Zedler, U., Bohne, F., Gripon, P., Dienes, H. P., Drebber, U., Stippel, D., Goeser, T., & Protzer, U. (2008). A concerted action of HNF4 $\alpha$  and HNF1 $\alpha$  links hepatitis B virus replication to hepatocyte differentiation. *Cellular Microbiology*, *10*(7), 1478-1490.
- Reese, J. C. (2003). Basal transcription factors. *Current Opinion on Genetic Development*, *13*(2), 114–8.

Phillips T, Hoopes L. Transcription factors and transcriptional control in eukaryotic cells. *Nature Education* 2008; 1(1):119.

Reijnen, M. J., Sladek, F. M., Bertina, R. M., & Reitsma, P. H. (1992). Disruption of a binding site for hepatocyte nuclear factor 4 results in hemophilia B Leyden. *Proceedings of the National Academy Sciences of the U S A*, 89(14), 6300-6303.

Reinehr, T., Schober, E., Wiegand, S., Thon, A., & Holl, R. (2006).  $\beta$ -cell autoantibodies in children with type 2 diabetes mellitus: subgroup or misclassification?. *Archives of disease in childhood*, 91(6), 473-477.

Reznik, Y., Dao, T., Coutant, R., Chiche, L., Jeannot, E., Clauin, S., Rousselot, P., Fabre, M., Oberti, F., Fatome, A., Zucman-Rossi, J., & Bellanne-Chantelot, C. (2004). Hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene inactivation: cosegregation between liver adenomatosis and diabetes phenotypes in two maturity-onset diabetes of the young (MODY3) families. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(3), 1476-1480.

Rogowicz-Frontczak, A., Zozulińska-Ziółkiewicz, D., Litwinowicz, M., Niedźwiecki, P., Wyka, K., & Wierusz-Wysocka, B. (2014). Are zinc transporter type 8 antibodies a marker of autoimmune thyroiditis in non-obese adults with new-onset diabetes?. *European Journal of Endocrinology*, 170(4), 651-658.

Ryffel, G. U. (2001). Mutation in human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. *Journal of Molecular Endocrinology* 27(1), 11-29.

Sabbah, E., Savola, K., Kulmala, P., Veijola, R., Vähäsalo, P., Karjalainen, J., Akerblom, H. K. & Knip, M. and The Childhood Diabetes in Finland Study Group (1999). Diabetes-Associated Autoantibodies in Relation to Clinical Characteristics and Natural Course in Children with Newly Diagnosed Type 1 Diabetes 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(5), 1534-1539.

Savola, K., Bonifacio, E., Sabbah, E., Kulmala, P., Vähäsalo, P., Karjalainen, J., Tuomilehto-Wolf, E., Meriläinen, J., Åkerblom, H. K., & Knip, M. (1998). IA-2 antibodies—a sensitive marker of IDDM with clinical onset in childhood and adolescence. *Diabetologia*, 41(4), 424-429.

Servitja, J. M., & Ferrer, J. (2004). Transcriptional networks controlling pancreatic development and beta cell function. *Diabetologia*, 47(4), 597-613.

Servitja, J. M., Pignatelli, M., Maestro, M. A., Cardalda, C., Boj, S. F., Lozano, J., Blanco, E., Lafuente, A., McCarthy, M. I., Sumoy, L., Guigó, R., & Ferrer, J. (2009). Hnf1alpha (MODY3) controls tissue-specific transcriptional programs and exerts opposed effects on cell growth in pancreatic islets and liver. *Molecular and Cellular Biology*, 29(11), 2945-2959.

Shepherd, M., Pearson, E. R., Houghton, J., Salt, G., Ellard, S., & Hattersley, A. T. (2003). No deterioration in glycemic control in HNF-1alpha maturity-onset diabetes of the young following transfer from long-term insulin to sulphonylureas. *Diabetes Care*, 26(11), 3191-3192.

- Shields, B. M., Hicks, S., Shepherd, M. H., Colclough, K., Hattersley, A. T., & Ellard, S. (2010). Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing? *Diabetologia*, *53*(12), 2504-2508.
- Shih, D. Q., Dansky, H. M., Fleisher, M., Assmann, G., Fajans, S. S., & Stoffel, M. (2000). Genotype/phenotype relationships in HNF-4/MODY1: haploinsufficiency is associated with reduced apolipoprotein (AII), apolipoprotein (CIII), lipoprotein(a), and triglyceride levels. *Diabetes* *49*(5), 832-837.
- Shih, D. Q., Bussen, M., Sehayek, E., Ananthanarayanan, M., Shneider, B. L., Suchy, F. J., Shefer, S., Bollileni, J. S., Gonzalez, F. J., Breslow, J. L., Stoffel, M. (2001). Hepatocyte nuclear factor-1alpha is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism. *Nature Genetics*, *27*(4), 375-382.
- Schober, E., Rami, B., Grabert, M., et al. (2009). Phenotypical aspects of maturity-onset diabetes of the young (MODY diabetes) in comparison with Type 2 diabetes mellitus (T2DM) in children and adolescents: experience from a large multicenter database. *Diabetic Medicine*, *26*, 466-473.
- Silander, K., Mohlke, K. L., Scott, L. J., Peck, E. C., Hollstein, P., Skol, A. D., Jackson, A. U., Deloukas, P., Hunt, S., Stavrides, G., Chines, P. S., Erdos, M. R., Narisu, N., Conneely, K. N., Li, C., Fingerlin, T. E., Dhanjal, S. K., Valle, T. T., Bergman, R. N., Tuomilehto, J., Watanabe, R. M., Boehnke, M., & Collins, F. S. (2004). Genetic Variation Near the Hepatocyte Nuclear Factor-4 $\alpha$  Gene Predicts Susceptibility to Type 2 Diabetes. *Diabetes* *53*(4), 1141-1149.
- Sladek, F. M., Zhong, W. M., Lai, E., & Darnell, J. E. (1990). Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes & Development*, *4*(12b), 2353-2365.
- Solimena, M., Folli, F., Denis-Donini, S., Comi, G. C., Pozza, G., De Camilli, P., & Vicari, A. M. (1988). Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in a patient with stiffman syndrome, epilepsy, and Type I diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*, *318*(16), 1012-1020.
- Sorenson, R. L., Garry, D. G., & Brelje, T. C. (1991). Structural and functional considerations of GABA in islets of Langerhans. Beta-cells and nerves. *Diabetes*, *40*(11), 1365-1374.
- Sperling, M., Menon, R., Dunger, D. (1999). Maturity-onset diabetes of the young (MODY). Karger AG.
- Steck, A. K., Johnson, K., Barriga, K. J., Miao, D., Yu, L., Hutton, J. C., Eisenbarth, G. S., & Rewers, M. J. (2011). Age of islet autoantibody appearance and mean levels of insulin, but not GAD or IA-2 autoantibodies, predict age of diagnosis of type 1 diabetes: diabetes autoimmunity study in the young. *Diabetes Care*, *34*(6), 1397-1399.
- Stenson, P. D., Mort, M., Ball, E. V., Howells, K., Phillips, A. D., Thomas, N. S., & Cooper, D. N. (2009). The human gene mutation database: 2008 update. *Genome Med*, *1*(1), 13.

Stenström, G., Berger, B., Borg, H., Fernlund, P., Dorman, J. S., & Sundkvist, G. (2002). HLA-DQ genotypes in classic type 1 diabetes and in latent autoimmune diabetes of the adult. *American journal of epidemiology*, 156(9), 787-796.

Stoffel, M., & Duncan, S. A. (1997). The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4 $\alpha$  regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(24), 13209-13214.

Stoffers, D. A., Ferrer, J., Clarke, W. L., & Habener, J. F. (1997). Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nature Genetics*, 17(2), 138-139.

Stride, A., Shepherd, M., Frayling, T. M., Bulman, M. P., Ellard, S., & Hattersley, A. T. (2002). Intrauterine hyperglycemia is associated with an earlier diagnosis of diabetes in HNF-1 $\alpha$  gene mutation carriers. *Diabetes Care*, 25(12), 2287–2291.

Stride, A., Vaxillaire, M., Tuomi, T., Barbetti, F., Njølstad, P. R., Hansen, T., Costa, A., Conget, I., Pedersen, O., Søvik, O., Lorini, R., Groop, L., Froguel, P., & Hattersley A. T. (2002). The genetic abnormality in the beta cell determines the response to an oral glucose load. *Diabetologia*, 45(3), 427-435.

Sujjitjoo, J., Jungtrakoon, P., Boonyasrisawat, W., Chongjaroen, N., Chukijrungrat, T., Kooptiwut, S., Plengvidhya, N., Banchuin, N., & Yenchitsomanus P. (2008). Molecular genetics of monogenetic beta-cell diabetes. *Thai Journal of Genetics*, 1(2), 93-108.

Tack, C. J. J., Ellard, S., & Hattersley, A. T. (2000). A severe clinical phenotype results from the co-inheritance of type 2 susceptibility genes and a hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  mutation. *Diabetes Care*, 23(3), 424–425.

Tanaka, T., Jiang, S., Hotta, H., Takano, K., Iwanari, H., Sumi, K., Daigo, K., Ohashi, R., Sugai, M., Ikegame, C., Umezue, H., Hirayama, Y., Midorikawa, Y., Hippo, Y., Watanabe, A., Uchiyama, Y., Hasegawa, G., Reid, P., Aburatani, H., Hamakubo, T., Sakai, J., Naito, M., & Kodama, T. (2006). Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  in the pathogenesis of human cancer. *Journal of Pathology*, 208(5), 662-672.

Taniyama, M., Kasuga, A., Nagayama, C., & Ito, K. (2010). Occurrence of Type 1 Diabetes in Graves' Disease Patients Who Are Positive for Antiglutamic Acid Decarboxylase Antibodies: An 8-Year Followup Study. *Journal of thyroid research*, 2011.

Tattersall, R. B. (1974). Mild familial diabetes with dominant inheritance. *QJM*, 43(2), 339-357.

Tattersall, R.B., & Fajans, S. S. (1975). A difference between the inheritance of classical juvenile-onset and maturity-onset type diabetes of young people. *Diabetes*, 24(1), 44-53.

Thebault-Baumont K, Dubois-Laforgue D, Krief P, Briand JP, Halbout P, Vallon-Geoffroy K, Morin J, Laloux V, Lehuen A, Carel JC, Jami, J., Muller, S., & Boitard Ch. (2003). Acceleration of type 1 diabetes mellitus in *proinsulin 2-deficient NOD* mice. *Journal of Clinical Investigation*, 111(6), 851–857.

Thomas, H., Jaschowitz, K., Bulman, M., Frayling, T. M., Mitchell, S. M., Roosen, S., Lingott-Frieg, A., Tack, C. J., Ellard, S., Ryffel, G. U., & Hattersley, A. T. (2001). A distant upstream promoter of the HNF-4alpha gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. *Human Molecular Genetics*, 10(19), 2089-2097.

Thomson, G., Valdes, A. M., Noble, J. A., Kockum, I., Grote, M. N., Najman, J., Erlich, H. A., Cucca, F., Pugliese, A., Steenkiste, A., Dorman, J. S., Caillat-Zucman, S., Hermann, R., Ilonen, J., Lambert, A. P., Bingley, P. J., Gillespie, K. M., Lernmark, A., Sanjeevi, C. B., Rønningen, K. S., Undlien, D. E., Thorsby, E., Petrone, A., Buzzetti, R., Koeleman, B. P., Roep, B. O., Saruhan-Direskeneli, G., Uyar, F. A., Günoz, H., Gorodezky, C., Alaez, C., Boehm, B. O., Mlynarski, W., Ikegami, H., Berrino, M., Fasano, M. E., Dametto, E., Israel, S., Brautbar, C., Santiago-Cortes, A., Frazer de Llado, T., She, J. X., Bugawan, T. L., Rotter, J. I., Raffel, L., Zeidler, A., Leyva-Cobian, F., Hawkins, B. R., Chan, S. H., Castano, L., Pociot, F., & Nerup, J. (2007). Relative predispositional effects of HLA class II DRB1-DQB1 haplotypes and genotypes on type 1 diabetes: a meta-analysis. *Tissue Antigens*; 70(2): 110-27.

Timsit, J., Bellanné-Chantelot, C., Dubois-Laforgue, D., & Velho, G. (2005). Diagnosis and management of maturity-onset diabetes of the young. *Treatments in Endocrinology*, 4(1), 9-18.

Towns, R., & Pietropaolo, M. (2011). GAD65 autoantibodies and its role as biomarker of Type 1 diabetes and Latent Autoimmune Diabetes in Adults (LADA). *Drugs Future*, 36(11), 847.

Triplitt, C., Solis-Herrera, C., Reasner, C., DeFronzo, R. A., & Cersosimo, E. (2015). Classification of diabetes mellitus. [Updated 2015 Mar 9]. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279119/>

Trudeau, J. D., Dutz, J. P., Arany, E., Hill, D. J., Fieldus, W. E., & Finegood, D. T. (2000). Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes? *Diabetes*, 49(1), 1-7.

Turner, R., Stratton, I., Horton, V., Manley, S., Zimmet, P., Mackay, I. R., Shattock, M., Bottazzo, G. F., Holman, R. (1997). UKPDS 25: autoantibodies to islet-cell cytoplasm and glutamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes. UK Prospective Diabetes Study Group. *Lancet*, 350(9087), 1288-1293.

Uchizono, Y., Baldwin, A. C., Sakuma, H., Pugh, W., Polonsky, K. S., & Hara, M. (2009). Role of HNF-1 $\alpha$  in regulating the expression of genes involved in cellular growth and proliferation in pancreatic beta-cells. *Diabetes research and clinical practice*, 84(1), 19-26.

Umpaichitra, V., Banerji, M. A., & Castells, S. (2002) Autoantibodies in children with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, 15(1),525-30.

van Deutekom, A. W., Heine, R. J., Simsek, S. (2008). The islet autoantibody titres: their clinical relevance in latent autoimmune diabetes in adults (LADA) and the classification of diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*, 25(2), 117-125.

- Vaxillaire, M., Abderrahmani, A., Boutin, P., Bailleul, B., Froguel, P., Yaniv, M., & Pontoglio, M. (1999). Anatomy of a homeoprotein revealed by the analysis of human MODY3 mutations. *Journal of Biological Chemistry*, 274(50):35639-35646.
- Verge, C. F., Gianani, R., Kawasaki, E., Yu, L., Pietropaolo, M., Chase, H. P., ... & Jackson, R. A. (1996). Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes*, 45(7), 926-933.
- Wang, H., Antinozzi, P. A., Hagenfeldt, K. A., Maechler, P., & Wollheim, C. B. (2000). Molecular targets of a human HNF1 alpha mutation responsible for pancreatic beta-cell dysfunction. *EMBO Journal*, 19(16), 4257-4264.
- Wang, H., Maechler, P., Antinozzi, P. A., Hagenfeldt, K. A., & Wollheim, C. B. (2000). Hepatocyte nuclear factor 4alpha regulates the expression of pancreatic beta-cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 35953 – 35959.
- Watt, A. J., Garrison, W. D. & Duncan, S. A. (2003). HNF4: A central regulator of hepatocyte differentiation and function. *Hepatology*, 37(), 1249–1253.
- Weedon, M. N., Owen, K. R., Shields, B., Hitman, G., Walker, M., McCarthy, M. I., Love-Gregory, L. D., Permutt, M. A., Hattersley A. T. & Frayling T. M. (2004). Common Variants of the Hepatocyte Nuclear Factor-4 $\alpha$  P2 Promoter Are Associated With Type 2 Diabetes in the U.K. Population. *Diabetes*, 53(11), 3002-3006.
- Weir, G. C., & Bonner-Weir, S. (2004). Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes*, 53(suppl 3), S16-S21.
- Weissglas-Volkov, D., Huertas-Vazquez, A., Suviolahti, E., Lee, J., Plaisier, C., Canizales-Quinteros, S., Tusie-Luna, T., Aguilar-Salinas, C., Taskinen, M. R., & Pajukanta, P. (2006). Common hepatic nuclear factor-4alpha variants are associated with high serum lipid levels and the metabolic syndrome. *Diabetes*, 55(7):1970-1977.
- Wendt, A., Birnir, B., Buschard, K., Gromada, J., Salehi, A., Sewing, S., Rorsman, P., & Braun, M. (2004). Glucose inhibition of glucagon secretion from rat alpha-cells is mediated by GABA released from neighboring beta-cells. *Diabetes*, 53(4), 1038–1045.
- Wenzlau, J. M., Juhl, K., Yu, L., Moua, O., Sarkar, S. A., Gottlieb, P., Rewers, M., Eisenbarth, G. S., Jansen, J., Davidson, H.W., & Hutton, J. C. (2007). The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(43), 17040-17045.
- Williams, A. J., Aitken, R. J., Chandler, M. A., Gillespie, K. M., Lampasona, V., & Bingley, P. J. (2008). Autoantibodies to islet antigen-2 are associated with HLA-DRB1\*07 and DRB1\*09 haplotypes as well



as DRB1\*04 at onset of type 1 diabetes: the possible role of HLA-DQA in autoimmunity to IA-2. *Diabetologia*, 51(8), 1368–1374.

Wisely, G. B., Miller, A. B., Davis, R. G., Thornquest Jr, A. D., Johnson, R., Spitzer, T., Sefler, A., Shearer, B., Moor, J. T., Miller, A. B., Willson T. M., & Williams, S. P. (2002). Hepatocyte nuclear factor 4 is a transcription factor that constitutively binds fatty acids. *Structure*, 10(9), 1225-1234.

Wobser, H., Düsselmann, H., Kögel, D., Wang, H., Reimertz, C., Wollheim, C. B., Byrne, M. M., & Prehn J. H. (2002). Dominant-negative suppression of HNF-1 alpha results in mitochondrial dysfunction, INS-1 cell apoptosis, and increased sensitivity to ceramide-, but not to high glucose-induced cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 277(8), 6413-6421.

Wobser H., Bonner, C., Nolan, J. J., Byrne, M. M., & Prehn, J. H. (2006). Downregulation of protein kinase B/Akt-1 mediates INS-1 insulinoma cell apoptosis induced by dominant-negative suppression of hepatocyte nuclear factor-1alpha function. *Diabetologia*, 49(3), 519–526

Yamagata, K., Oda, N., Kaisaki, P. J., Menzel, S., Furuta, H., Vaxillaire, M., Southam, L., Cox, R. D., Lathrop, G. M., Boriraj, V. V., Chen, X. N., Cox, N. J., Oda, Y., Yano, H., Le Beau, M. M., Yamada, S., Nishigori, H., Takeda, J., Fajans, S. S., Hattersley, A. T., Iwasaki, N., Hansen, T., Pedersen, O., Polonsky, K. S., Turner, R. C., Velho, G., Chevre, J. C., Froguel, P., & Bell, G. I. (1996). Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature*, 384(6608), 455-458.

Yamagata, K., Furuta, H., Oda, N., Kaisaki, P. J., Menzel, S., Cox, N. J., Fajans, S. S., Signorini, S., Stoffel, M., & Bell, G. I. (1996). Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature*, 384(6608), 458-60.

Yamagata, K., Yangm, Q., Yamamoto, K., Iwahashi, H., Miyagawa, J., Okita, K., Yoshiuchim I., Miyazaki, J., Noguchi, T., Nakajima, H., Namba, M., Hanafusa, T., & Matsuzawa, Y. (1998). Mutation P291fsinsC in the transcription factor hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  is dominant negative. *Diabetes* 47(8), 1231–1235.

Yamagata, K., Nammo, T., Moriwaki, M., Ihara, A., Iizuka, K., Yang, Q., Satoh, T., Li, M., Uenaka, R., Okita, K., Iwahashi, H., Zhu, Q., Cao, Y., Imagawa, A., Tochino, Y., Hanafusa, T., Miyagawa, J., & Matsuzawa, Y. (2002). Overexpression of dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor-1 alpha in pancreatic beta-cells causes abnormal islet architecture with decreased expression of E-cadherin, reduced beta-cell proliferation, and diabetes. *Diabetes*, 51(1), 114-123.

Yamagata, K. (2003). Regulation of pancreatic beta-cell function by the HNF transcription network: lessons from maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Endocrine Journal*, 50(5), 491-499.

Yang, Q., Yamagata, K., Yamamoto, K., Miyagawa, J. I., Takeda, J., Iwasaki, N., ... & Matsuzawa, Y. (1999). Structure/function studies of hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$ , a diabetes-associated transcription factor. *Biochemical and biophysical research communications*, 266(1), 196-202.

Yang, Q., Yamagata, K., Fukui, K., Cao, Y., Nammo, T., Iwahashi, H., Wang, H., Matsumura, I., Hanafusa, T., Bucala, R., Wollheim, C. B., Miyagawa, J., Matsuzawa, Y. (2002). Hepatocyte nuclear factor-1alpha modulates pancreatic beta-cell growth by regulating the expression of insulin-like growth factor-1 in INS-1 cells. *Diabetes*, 51(6), 1785-1792.

Yoon, J. C., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelmant, G., Stafford, J., Kahn, C. R., Granner, D. K., Newgard, C. B. & Spiegelman, B. M. (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*, 413(6852), 131-138.

Yoon, J-W., & Jun, H. S. (2005). Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. *American Journal of Therapeutics*, 12(6), 580-91.

Yoshiuchi, I., Yamagata, K., Yang, Q., Iwahashi, H., Okita, K., Yamamoto, K., Oue, T., Imagawa, A., Hamaguchi, T., Yamasaki, T., Horikawa, Y., Satoh, T., Nakajima, H., Miyazaki, J., Higashiyama, S., Miyagawa, J., Namba, M., Hanafusa, T., & Matsuzawa, Y. (1999) Three new mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in Japanese subjects with diabetes mellitus: clinical features and functional characterization. *Diabetologia*, 42(5), 621-626.

Yu, L. I., Rewers, M. A., Gianani, R. O., Kawasaki, E. I., Zhang, Y. I., Verge, C. H., Chase, P. E., Klingensmith, G. E., Erlich, H. E., Norris, J. I., & Eisenbarth, G. S. (1996). Antiislet autoantibodies usually develop sequentially rather than simultaneously. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81(12), 4264-4267.

Yuan, X., Ta, T. C., Lin, M., Evans, J. R., Dong, Y., Bolotin, E., Sherman, M. A., Forman, B. M., & Sladek, F. M. (2009). Identification of an endogenous ligand bound to a native orphan nuclear receptor. *PLoS One*, 4(5): 5609.

Ziegler, A. G., Hummel, M., Schenker, M., & Bonifacio, E. (1999). Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes*, 48(3), 460-468.

Ziegler, R., Alper, C. A., Awdeh, Z. L., Castano, L., Brink, S. J., Soeldner, J. S., Jackson, R. A. & Eisenbarth, G. S. (1991). Specific association of HLA-DR4 with increased prevalence and level of insulin autoantibodies in first-degree relatives of patients with type I diabetes. *Diabetes*, 40(6), 709-714.

## 9. SEZNAM PUBLIKACÍ

### 1. Publikace, které jsou podkladem disertace

URBANOVÁ, Jana; RYPÁČKOVÁ, Blanka; KUČERA, Petr; ANDĚL, Michal; HENEBERG, Petr: Should the negativity for islet cell autoantibodies be used in a prescreening for genetic testing in MODY? The case of autoimmunity-associated destruction of pancreatic  $\beta$ -cells in a family of HNF1A-MODY subjects. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2013; 161(3):279-284. **IF 2.403/2011**. ISSN: 1018-2438.

URBANOVÁ, Jana; RYPÁČKOVÁ; PROCHÁZKOVÁ, Zdeňka; KUČERA, Petr; ČERNÁ, Marie; ANDĚL, Michal; HENEBERG, Petr: Positivity for islet cell autoantibodies in patients with monogenic diabetes is associated with later diabetes onset and higher HbA1c level. *Diabetic Medicine*,2014;31(4):466-71. **IF 3.241/2012**. DOI: 10.1111/dme.12314

## 2. *Publikace bez vztahu k tématu dizertace*

### **Vědecké články v zahraničním časopise s IF**

URBANOVÁ, J.; ANDĚL, M.; POTOČKOVÁ, J.; KLÍMA, J.; MACEK, J.; PTÁČEK, P.; MAŤOŠKA, V.; KUMŠTÝŘOVÁ, T.; HENEBERG, P. (2015): Half-life of sulfonylureas in HNF1A and HNF4A human MODY patients is not prolonged as suggested by the mouse *Hnf1a*<sup>-/-</sup> model. *Current Pharmaceutical Design* 21 (39): 5736-5748; **IF 3,452/2014**. ISSN 1381-6128.

HENEBERG, P; MALÁ, M; YORIJFUJI,T; GAT-YABLONSKIJ, G; LEBENTHAL, Y; TAJIMA, T; NOGAROTO, V; RYPÁČKOVÁ, B; KOCKOVÁ, L; URBANOVÁ, J; ANDĚL, M. Low Frequencies of Autoimmunity-Associated PTPN22 Polymorphisms in MODY Patients, Including Those Transiently Expressing Islet Cell Autoantibodies. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2015;166(3):189-98. **IF 2.673/2015**. DOI: 10.1159/000380853.

### **Vědecké články v českém časopise bez IF**

URBANOVÁ, Jana; HOFFMANOVÁ, Iva; ANDĚL, Michal: Manifestace diabetes mellitus 1. typu u 97leté pacientky. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa*, 2011, 14(1): 22-24. SJR: 0.026/2011. ISSN 1211-9326.

URBANOVÁ, Jana; BROŽ, Jan. Hypoglykemie u pacientky s diabetes mellitus 2. typu a akutním srdečním selháním léčené intenzifikovaným inzulínovým režimem. *Kazuistiky v diabetologii*. 2012, 10(2): 25-26. ISSN: 1214-231X.

URBANOVÁ, Jana; BROŽ, Jan. Hypoglykemie u pacienta s diabetes mellitus 2. typu léčeného kombinací perorálních antidiabetik. *Kazuistiky v diabetologii*. 2012, 10(2): 27-28. ISSN: 1214-231X.

BROŽ, Jan; URBANOVÁ, Jana. Fatální hypoglykemie u pacienta s diabetes mellitus 2. typu léčeného deriváty sulfonylurey. *Kazuistiky v diabetologii*. 2012, 10( 2):23-24. ISSN: 1214-231X.

BROŽ, Jan; JANÍČKOVÁ-ŽĎÁRSKÁ, Denisa; URBANOVÁ, Jana. Hypoglykémie a diabetes mellitus 1. typu pro praxi. *Postgraduální medicína*. 2013, 15( 9): 1008-1009. ISSN: 1212-4184.

ANDĚL, Michal; NĚMCOVÁ, Vlasta; PAVLÍKOVÁ, Nela; URBANOVÁ, Jana; ČECHÁKOVÁ, Marie; HAVLOVÁ, Andrea; STARKOVÁ, Radka; VEČEŘOVÁ, L; MANDYS, V; KOVÁŘ, J; HENEBERG, Petr; TRNKA, Jan; POLÁK, Jan. Faktory vedoucí k poškození a destrukci B-buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu. *Vnitřní Lékařství*, 2014; 60(9): 684-690. ISSN: 1211-9326; 1212-6853 (elektronická verze).

### **Publikace spojené s prezentací na konferencích**

*Abstrakt v zahraničním časopise:*

URBANOVÁ, J; RYPÁČKOVÁ, B; HENEGER, P; BAZALOVÁ, Z; KUČERA, P; ANDĚL, M: The Identification of islet autoantibodies in patients with molecular genetically diagnosed monogenic diabetes. 2012. Diabetes, 2012, 61(Suppl. 1): A25-A26. ISSN: 0012-1797. IF: 8.3/2011.

Konference: American Diabetes Association's 72nd Scientific Sessions, Philadelphia, 08.06.2012-12.06.2012.

URBANOVÁ, J; RYPÁČKOVÁ, B; BAZALOVÁ, Z; KUČERA, P; ANDĚL, M; HENEGER, P: Positivity for Islet Cell Autoantibodies in Subjects With Monogenic Diabetes Is Associated With Later Diabetes Onset and Higher Hba1c Level. Late Breaking Abstracts printed in an online Diabetes® supplement: Diabetes, 2013, 62(Suppl. 1A): LB35.

Konference: American Diabetes Association's 73rd Scientific Sessions, Chicago, 21.06.2013-25.06.2013.

*Abstrakt v českém časopise:*

URBANOVÁ, J; RYPÁČKOVÁ, B; HENEGER, P; BAZALOVÁ, Z; KUČERA, P; ANDĚL, M: Výskyt ostrůvkových autoprotilátek u pacientů s monogenním diabetem. 2012. Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa, 2012, 15(Suppl. 1): 20-21. ISSN 1211-9326.

a

BROŽ, J; URBANOVÁ, J; BRABEC, M.; et al. Vybrané charakteristiky hypoglykemií u pacientů s diabetes mellitus 1. typu - výsledky dotazníkového šetření - pilotní studie. Diabetologie - Metabolismus - Endokrinologie - Výživa, 2012, roč. 15, Suppl. 1, s. 48. ISSN: 1211-9326.

Konference: 48. Diabetologické dny v Luhačovicích, Luhačovice, 19.04.2012-21.04.2012.

URBANOVÁ, J; RYPÁČKOVÁ, B; PROCHÁZKOVÁ, Z; KUČERA, P; ANDĚL, M; HENEGER, P: Specifické ostrůvkové autoprotilátky u pacientů s monogenním diabetem jsou asociovány s dobou manifestace diabetu a kompenzací. Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa, 2013, 16(Suppl. 1): 23. ISSN 1211-9326.

a

BROŽ, Jan, DONIČOVÁ, Viera; URBANOVÁ, Jana; BARBCOVÁ, I.; BODSKÁ, M.; VALENTOVÁ, Andrea; BRABEC, M. : Úspěšnost léčby hypoglykémie - analýza záznamů CGMS v průběhu následných 2 hodin u pacientů s DM 1. typu. Diabetologie, Metabolismus, Endokrinologie, Výživa, 2013, 16(Suppl. 1): 36-37. ISSN: 1211-9326; 1212-6853 (elektronická verze).

a

BROŽ, Jan; JANÍČKOVÁ-ŽDÁRSKÁ, Denisa; URBANOVÁ, Jana; BRABEC, M.; POLÁK, Jan; KOŽENÝ, Jiří. Vybrané charakteristiky hypoglykemií u pacientů s diabetes mellitus 1. typu - výsledky dotazníkového šetření - pilotní studie. Diabetologie, Metabolismus, Endokrinologie, Výživa, 2013, 16(Suppl. 1): 49. ISSN: 1211-9326; 1212-6853 (elektronická verze).

Konference: 49. Diabetologické dny v Luhačovicích, Luhačovice, 18.04.2013-20.04.2013.

URBANOVÁ, J.; ANDĚL, M.; POTOČKOVÁ, J.; KLÍMA, J.; MACEK, J.; PTÁČEK, P.; MAŤOŠKA, V.; KUMŠTÝŘOVÁ, T.; HENEBERG, P. Mutace v HNF-1 $\alpha$  a HNF4- $\alpha$  genu podmiňuje u HNF1A/HNF4A MODY pacientů prodloužení T1/2 glibenklamidu, ne však glipizinu. Diabetologie, Metabolismus, Endokrinologie, Výživa. 2014, 17(Suppl. 1): 26-27. ISSN: 1211-9326; 1212-6853 (elektronická verze).

Konference: 50. Diabetologické dny v Luhačovicích, Luhačovice, 10.04.2014–12.04. 2014

URBANOVÁ, J.; KRATOCHVÍL, A; ANDĚL, M. Přerušení léčby inzulinovou pumpou po diagnostice GCK-MODY. Diabetologie, Metabolismus, Endokrinologie, Výživa. 2016, 19 (Suppl. 1): 43-44. ISSN: 1211-9326; 1212-6853 (elektronická verze).

Konference: 52. Diabetologické dny v Luhačovicích, Luhačovice, 14.04.-16.04.2016

#### **Publikace – knihy, edukační brožury**

Brož J, Urbanová J: Hypoglykémie, 1. vydání, Praha, ing.Slávka Wiesnerová, 2012, ISBN 978-80-87630-02-0

Brož J, Urbanová J: Ještě něco k hypoglykémii, 1. vydání, Praha, ing.Slávka Wiesnerová, 2012, ISBN 978-80-87630-01-3

Brož J, Urbanová J. Pokračujeme s inzulinem: Měření glykémie, 1. vydání, Praha, ing.Slávka Wiesnerová, 2014, ISBN 978-80-87630-09-9.

Brož J, Urbanová J. Začínáme s inzulinem, Praha, Slávka Wiesnerová, 1. vydání, 2014, ISBN 978-80-87630-10-5.

Stříbrná D, Urbanová J, Brož J. Dieta a inzulin trochu jinak, 1. vydání, Praha, ing.Slávka Wiesnerová, 2015, ISBN 978-80-87630-11-2

Brož J a kolektiv. Léčba inzulinem, 1. Vydání, Praha, Maxdorf, 2015, ISBN: 978-80-7345-440-1

#### **Odborné články na webových portálech**

*Dm2t.cz:*

Jan Brož, Jana Urbanová. Hypoglykémie: Co by měly vědět sestry? Publikováno 04. června 2012

Zdeňka Bazalová, Jan Brož, Jana Urbanová. Monogenní diabetes mellitus. Publikováno 04. ledna 2010

Jan Brož, Jana Urbanová. Diferenciální diagnostika diabetes mellitus s obezitou. Publikováno 14. září 2010

*Život a cukrovka:*

Zdeňka Bazalová, Jan Brož, Jana Urbanová. Monogenní diabetes mellitus. Publikováno: 31. března 2010

*DIAsyl:*

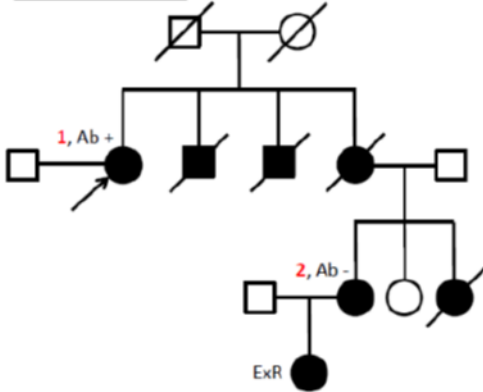
Jana Urbanová. Režim diabetika 1. Typu. Publikováno 16. prosince 2011

## **10. PŘÍLOHY**

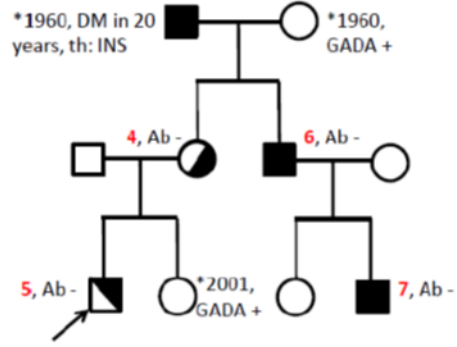
### **Příloha 1** *Rodokmeny vyšetřených MODY pacientů*

Vyznačeny jsou symboly rodin (family A-Q), typ mutace (aminokyselinová záměna), čísla pacientů zařazených do studie (1-28), věk v době vzniku diabetes mellitus (DM, roky) a jeho terapie (th), autoprotilátková pozitivita (Ab<sup>+</sup>) či negativita (Ab<sup>-</sup>).

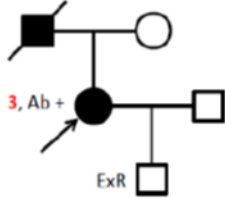
**Family A, R134W**



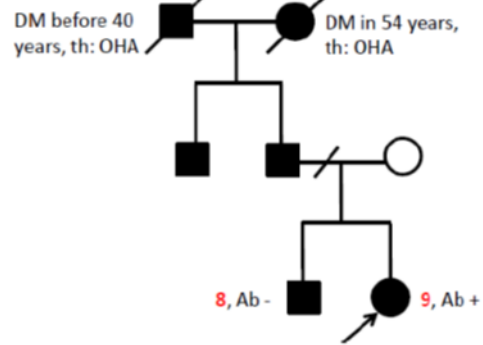
**Family C, L245AMB**



**Family B, A158V**



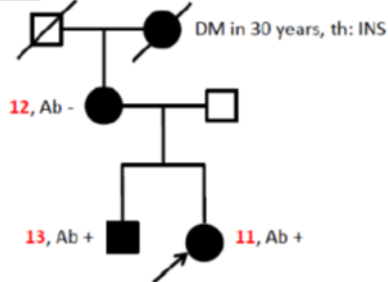
**Family D, R200G**



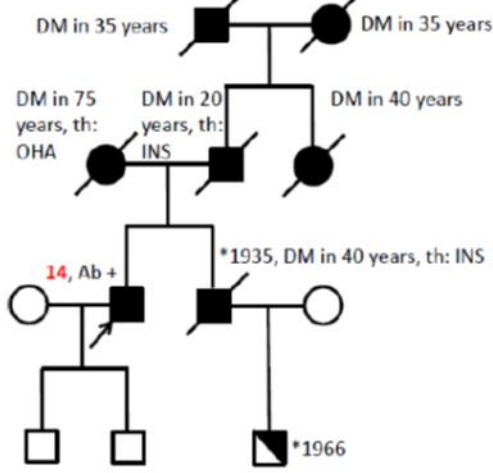
**Family E, T260M**



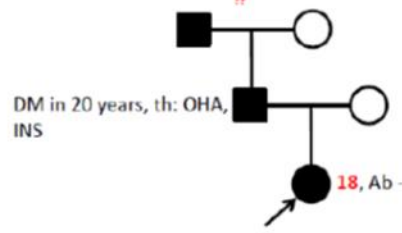
**Family F, R159Q**



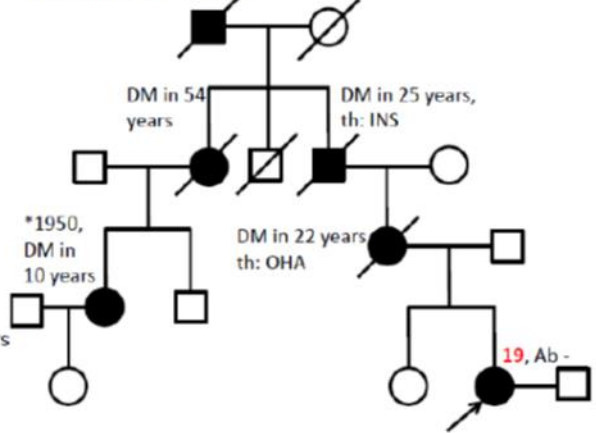
**Family G, P291S**



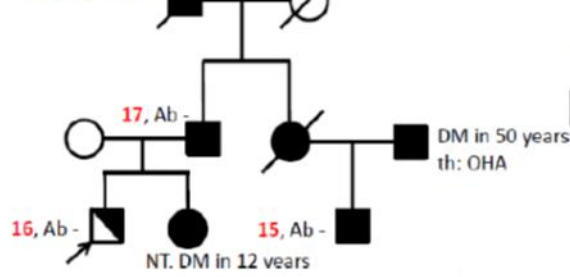
**Family I, N62fsdelT**



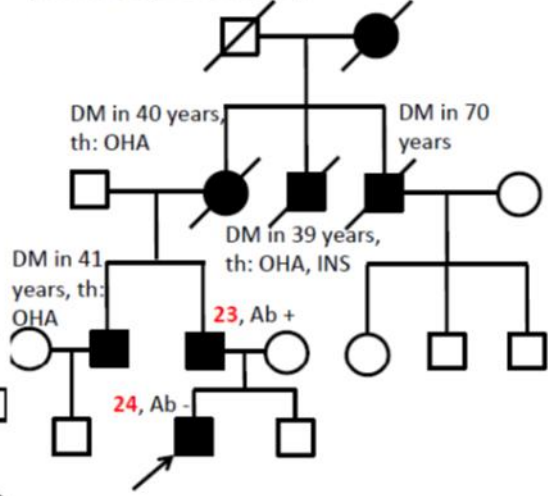
**Family J, P379fsdelCT**



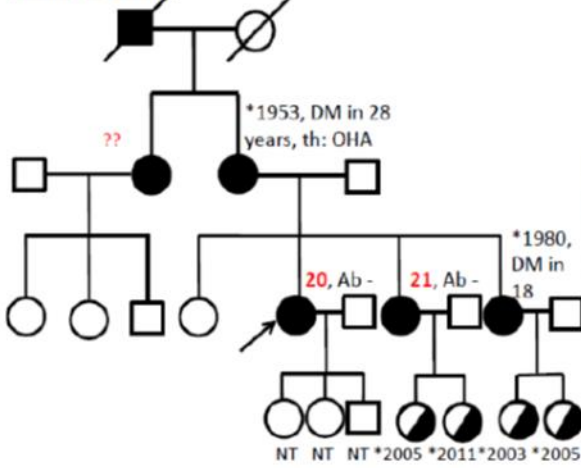
**Family H, R272H**



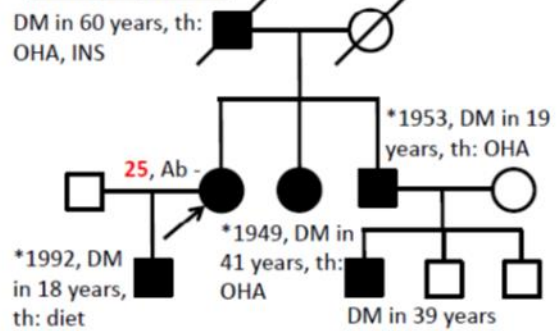
**Family M, V244fsdelG**



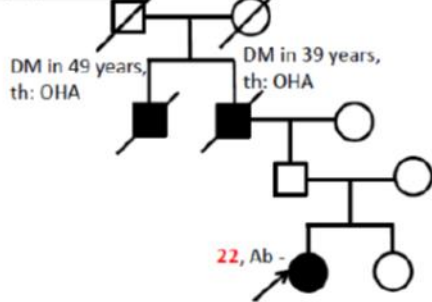
**Family K, A98V**



**Family N, C252Y**

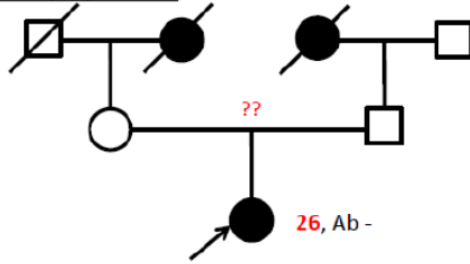


**Family L, L314P**

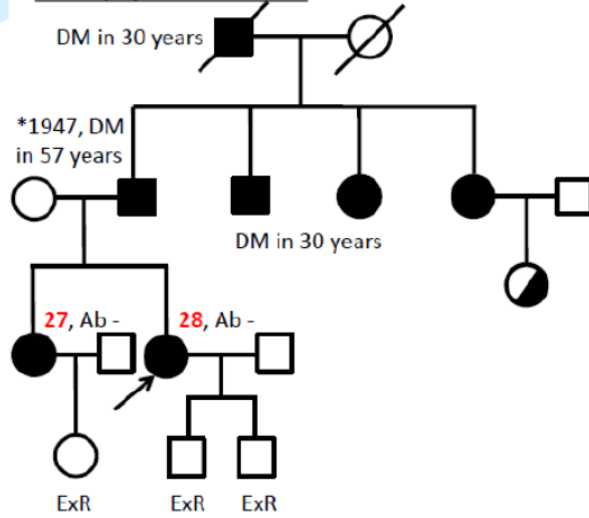




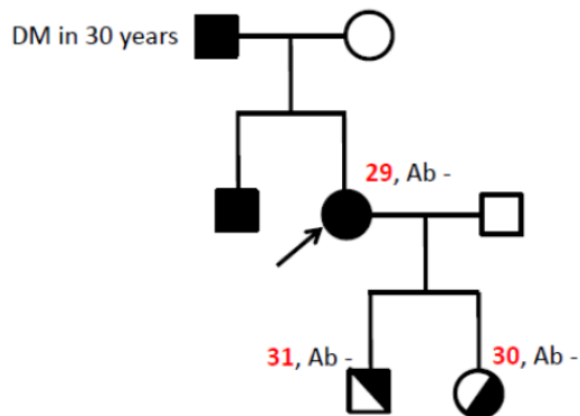
**Family O, G318R**



**Family P, IVS1ds+3A>G**

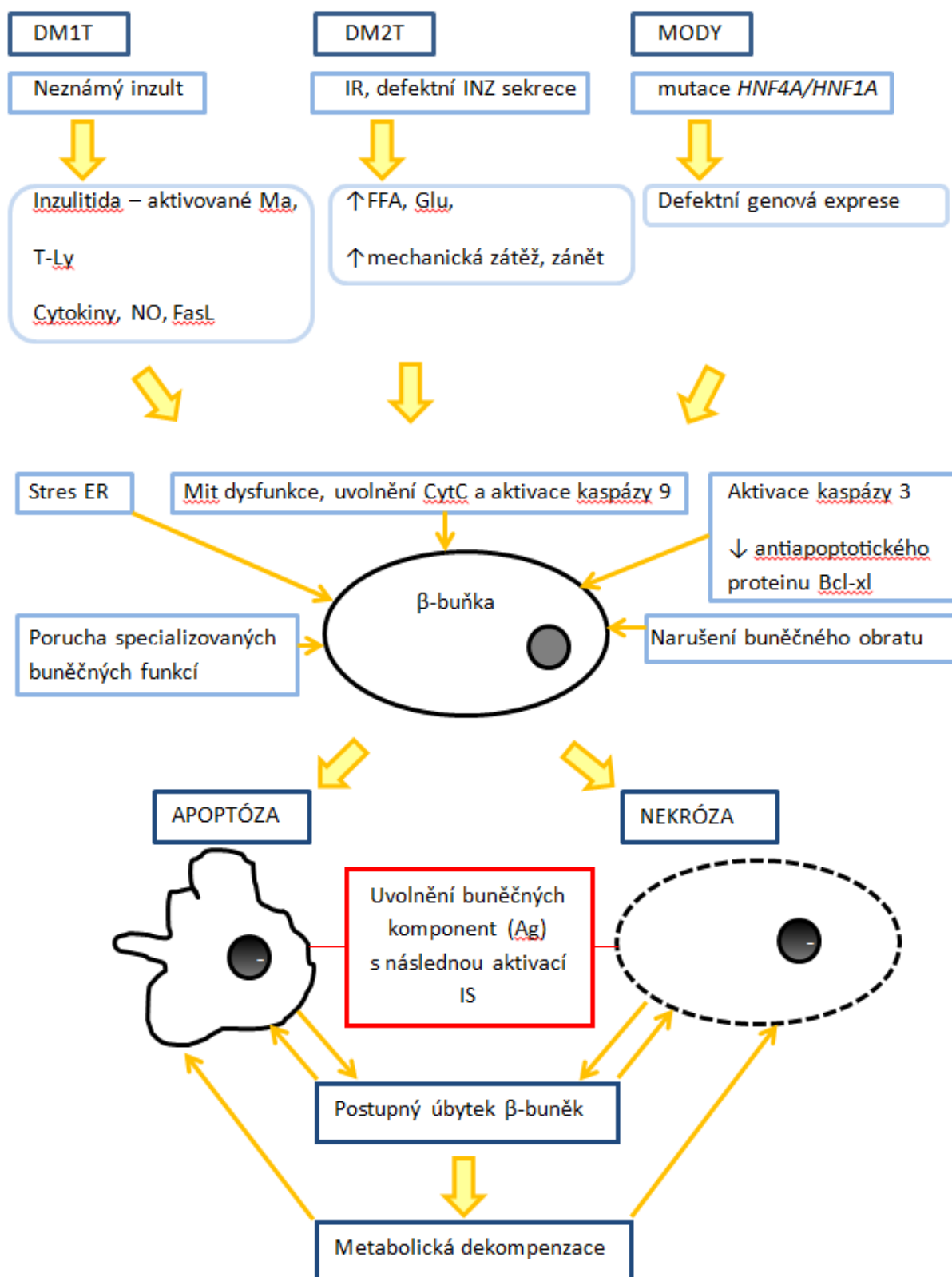


**Family Q, E40K**



DM – diabetes mellitus th – terapie, INS – inzulin, OHA – perorální antidiabetika, GADA – autooprotilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové, Ab<sup>+</sup> – pozitivní specifické ostrůvkové autooprotilátky, Ab<sup>-</sup> – negativní specifické ostrůvkové autooprotilátky

**Příloha 2** Hypotéza exprese autoprotiláték u diabetes mellitus



DM1T – diabetes mellitus 1. typu; DM2T – diabetes mellitus 2. typu; MODY – maturity onset diabetes of the young; IR – inzulinová rezistence; INZ – inzulín; HNF4A – gen pro hepatální nukleární faktor HNF-4 $\alpha$ ; HNF1A –

gen pro hepatální nukleární faktor HNF-1 $\alpha$ , Ma – makrofágy; T-Ly – T-lymfocyty, NO – oxid dusíku, FasL – Fas ligand, FFA – (fatty free acids) volné mastné kyseliny; Glu – glukóza; ER – endoplasmatické retikulum; Mit – mitochondriální; CytC – cytochrom C; IS – imunitní systém

**Příloha 3, 4** Vědecké články, které jsou podkladem k disertaci