

Jakub Frey¹, Maciej T. Małecki¹, Jan Skupień¹, Leszek Drabik^{1, 2}, Elżbieta Hajto^{1, 2},
Kazimierz Rajda^{1, 2}, Paweł P. Wołkow², Ryszard Korbut², Jacek Sieradzki¹

¹Katedra i Klinika Chorób Metabolicznych, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

²Katedra Farmakologii, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Rola polimorfizmów genu receptora glukagonopodobnego peptydu 1 (GLP-1R) w cukrzycy typu 2

The role of glucagon-like peptide 1-receptor gene in type 2 diabetes

STRESZCZENIE

WSTĘP. Celem badania było poszukiwanie związku między polimorfizmami *Gly168Ser* i *Leu260Phe* genu receptora glukagonopodobnego peptydu-1 z cukrzycą typu 2 w populacji polskiej.

MATERIAŁ I METODY. Analizowano materiał genetyczny 462 chorych na cukrzycę typu 2 i 428 zdrowych ochotników. Genotypowanie polimorfizmów wykonywano, namnażając odpowiednie fragmenty DNA za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy, tnąc namnożone fragmenty enzymami restrykcyjnymi i uwidaczniając produkty cięcia na żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Analiza statystyczna obejmowała test χ^2 dla zbadania zależności genotypów z chorobą i regresję logistyczną dla zbadania zależności haplotypów z chorobą.

WYNIKI. Częstość homozygot *Ser/Ser* była znacznie wyższa w grupie chorych na cukrzycę (15,7%) niż w grupie kontrolnej (9,8%), $p = 0,03$. Iloraz szans rozwoju cukrzycy u tych pacjentów wskazywał na niemal 2-krotnie wyższe ryzyko niż u pacjentów niebędących homozygotami *Ser/Ser*. Polimorfizm w po-

zycji 260 oraz haplotypy utworzone przez dwa badane polimorfizmy nie były związane z występowaniem cukrzycy typu 2.

WNIOSKI. Wyniki badania sugerują, że polimorfizm *Gly168Ser* jest potencjalnym czynnikiem ryzyka cukrzycy typu 2 w populacji polskiej. Obserwacja ta wymaga potwierdzenia w innych grupach etnicznych.

Słowa kluczowe: cukrzyca typu 2, GLP-1R, podłoże genetyczne cukrzycy

ABSTRACT

INTRODUCTION. The aim of the study was to search for the association between *Gly168Ser* and *Leu260Phe* amino acid variants of the glucagon-like peptide 1 receptor gene and type 2 diabetes in a Polish population.

METHODS. 462 patients with type 2 diabetes and 428 healthy volunteers were genotyped by restriction fragments length polymorphism method after amplification of examined genome fragment by polymerase chain reaction technique. The digestion products were separated and visualized by electrophoresis on agarose gel containing ethidium bromide. Statistical analysis involved chi-square test for genotype-phenotype association and logistic regression for association of phenotype with haplotypes. **RESULTS.** *Ser/Ser* homozygotes frequency in diabetic patients group was significantly higher than in control group (15.7% vs. 9.8%, $p = 0,03$). Odds ratio of having type 2 diabetes in *Ser/Ser* carriers group versus other genotype carriers showed almost two

Adres do korespondencji: dr hab. med. Maciej T. Małecki
Katedra i Klinika Chorób Metabolicznych
Collegium Medicum UJ

ul. Kopernika 15, 31-501 Kraków

e-mail: malecki_malecki@yahoo.com

Diabetologia Praktyczna 2006, tom 7, 3, 150-154

Copyright © 2006 Via Medica

Nadesłano: 5.04.2006 Przyjęto do druku: 22.05.2006

Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu Collegium Medicum
— praca statutowa NKL/59.

fold risk increase associated with this genotype. Polymorphism in 260 amino acid position and haplotypes of the analyzed polymorphisms were not associated with type 2 diabetes.

CONCLUSIONS. The results of the study suggest that polymorphism *Gly168Ser* may be potentially a risk factor of the type 2 diabetes in Polish population. This observation should be evaluated in other ethnic groups.

Keywords: type 2 diabetes mellitus, GLP-1R, genetic background of diabetes

Wstęp

Cukrzyca typu 2 jest heterogennym zespołem chorobowym, wywoływanym przez czynniki genetyczne, środowiskowe oraz ich wzajemne interakcje, który charakteryzuje się względnym niedoborem insuliny. Wydaje się, że mechanizm powstawania zaburzeń wydzielania działania insuliny w cukrzycy typu 2 ma złożony charakter [1].

Glukagonopodobny peptyd 1 (GLP-1, *glucagon-like peptide 1*) wraz z glukozozależnym polipeptydem insulinotropowym (GIP, *glucose-dependent insulinotropic peptide*) należą do głównych hormonów jelitowych, odpowiedzialnych za efekt inkretynowy [2]. Efekt ten polega na wzroście produkcji insuliny po przyjęciu posiłku drogą doustną, nie występuje natomiast po dożylnym podaniu glukozy. Uważa się, że efekt inkretynowy odpowiada za 50–70% poposiłkowego wzrostu produkcji insuliny [3]. Oprócz wyrzutu insuliny, GLP-1 stymuluje proliferację komórek trzustkowych β oraz utylizację glukozy w wątrobie i mięśniach szkieletowych, a także zmniejsza apetyt, działając centralnie [4].

U chorych na cukrzycę typu 2 efekt inkretynowy jest upośledzony lub nawet całkowicie zniesiony. Wiąże się to z redukcją wyrzutu GLP-1 w odpowiedzi na posiłek, szczególnie w późnej fazie poposiłkowej [5]. U pacjentów z nieprawidłową tolerancją glukozy poposiłkowy wyrzut GLP-1 jest większy niż w przebiegu cukrzycy, lecz mniejszy niż u osób zdrowych. Dane te sugerowały, że suplementacja GLP-1 może się stać istotnym elementem terapii cukrzycy typu 2, uzupełniającym w stosunku do zastosowanej diety, klasycznych doustnych leków przeciwcukrzycowych oraz insulinoterapii [6].

Ponieważ GLP-1 charakteryzuje się krótkim czasem półtrwania, co wiąże się z szybkim rozkładem enzymatycznym przez dipeptydylopeptydazę-IV, konieczne stało się opracowanie stabilnych analogów

GLP-1. W badaniach stosowano na przykład exenatyd i liraglutyd, podawane we wstrzyknięciach podskórnych, uzyskując obniżenie glikemii poposiłkowej, opóźnienie opróżniania żołądka oraz redukcję podaży pokarmów. Exenatyd jest pierwszym lekiem z grupy analogów GLP-1 zarejestrowanym w Stanach Zjednoczonych w 2005 roku, rejestracja liraglutylu jest spodziewana w 2006 roku [2, 4].

Zarówno endogenne GLP-1, jak i syntetyczne analogi działają, łącząc się ze specyficznym receptorem (GLP-1R). To 463-aminokwasowe białko należy do rodziny receptorów łączących się z białkami G, posiadających 7 domen przezbłonowych. Aktywacja receptora prowadzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego cAMP i aktywacji szlaków zależnych od fosfokinazy A (PKA), powodujących nasilone zamykanie kanałów potasowych ATP-zależnych, depolaryzację komórki, napływ jonów wapnia i zależne od Ca^{2+} wydzielanie insuliny [7]. Poza zwiększeniem sekrecji insuliny dochodzi także do nasilenia ekspresji wielu genów, w tym kodujących insulinę.

Istotną funkcję, jaką receptor ten pełni w utrzymaniu homeostazy węglowodanowej, wykazano w badaniach myszy transgenicznych z nieaktywnym genem dla GLP-1R [8]. U myszy nieposiadających czynnego genu oraz w mniejszym stopniu u myszy posiadających tylko jedną czynną kopię genu stwierdzono upośledzone wydzielanie insuliny w odpowiedzi na obciążenie glukozą w porównaniu z myszami dzikimi. Sugeruje to, że nawet częściowe upośledzenie sygnalizacji przez ten receptor może wywołać dysfunkcję komórek β trzustki.

Gen dla GLP-1R zawiera co najmniej kilka polimorfizmów zmieniających skład aminokwasowy białka. Celem badania autorów jest wykazanie, czy u chorych na cukrzycę typu 2 częstość genotypów lub alleli polimorfizmów *Gly168Ser* lub *Leu260Phe* jest inna niż u osób z grupy kontrolnej.

W pracy dotyczącej chorych na cukrzycę w populacji japońskiej wykryto rzadką mutację, *Thr149Met* w egzonie 5 GLP-1R (w którym leży jeden z badanych przez nas polimorfizmów, *Gly168Ser*), która wiązała się ze zmniejszeniem wydzielania insuliny, insulinowrażliwości i zaburzeniem glikemii poposiłkowej [9].

Interesująca wydaje się hipoteza, że polimorfizmy genu dla GLP-1R, zmieniające jego sekwencję kodującą, mogą modyfikować liczne efekty biologiczne, w tym efekt insulinotropowy wywierany przez GLP-1, i w ten sposób wpływać na prawdopodobieństwo wystąpienia cukrzycy typu 2 oraz efektywność terapeutyczną analogów GLP-1.

Materiały i metody

Materiał genetyczny

Analizowano materiał genetyczny pobrany od 462 pacjentów Katedry i Kliniki Chorób Metabolicznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie z rozpoznaniem klinicznym cukrzycy typu 2. Grupę kontrolną stanowiło 428 zdrowych ochotników, u których cukrzycę typu 2 wykluczono na podstawie oznaczenia glikemii na czczo. Rekrutację do grupy kontrolnej prowadzono w taki sposób, aby preferencyjnie włączać do niej osoby z ujemnym wywiadem rodzinnym w kierunku cukrzycy typu 2 wśród krewnych pierwszego stopnia.

Każda z osób wchodzących w skład obu wspomnianych grup wypełniała ankietę dotyczącą między innymi: dla chorych na cukrzycę — wieku rozpoznania choroby, sposobu leczenia, problemu jej przewlekłych powikłań; dla obu grup — wywiadu rodzinnego w kierunku cukrzycy typu 2 i innych zagadnień medycznych. W badaniu wykorzystano aktualne kryteria i definicje Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) dotyczące rozpoznawania zaburzeń tolerancji glukozy. W grupie kontrolnej prawidłowy metabolizm węglowodanów weryfikowano na podstawie prawidłowej glikemii na czczo. Ponadto u części osób z tej grupy wykonano test WHO z 75 g glukozy z oznaczeniem glikemii i insulinemii na czczo i w 120. minucie badania [10].

Materiał genetyczny został zgromadzony przez Klinikę Chorób Metabolicznych w latach 1999–2006 [11, 12].

Genotypowanie

W badanych grupach genotypowano 2 polimorfizmy GLP-1R: 1) G/A, Gly168Ser, w egzonie 5 (dbSNP nr: rs6923761), oraz 2) A/C, Leu260Phe, w egzonie 7 (dbSNP nr rs1042044). Genotypowanie odbywało się w trzech etapach: namnażanie za pomocą PCR fragmentów DNA okalających badane polimorfizmy, cięcia uzyskanego produktu za pomocą specyficznych enzymów restrykcyjnych, rozdzielenia elektroforetycznego ciętych produktów PCR, na 3-procentowym żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny.

Do metody PCR użyto specyficznych primerów: dla polimorfizmu Gly168Ser primera *forward* o sekwencji 5'-TCTCTTCTTGGTCTTGGTATCCCC oraz primera *reverse* o sekwencji 5'-CAACCTCATATTCTACG-GTCAGGGC; dla polimorfizmu Leu260Phe użyto primera *forward* o sekwencji 5'-CAGATAAAGTCCTTAG-CACTAGCCC oraz primera *reverse* o sekwencji 5'-CAAGTACCATGTTAGAAGAGGGGTC. W części reakcji zastosowano samokontrolę w postaci reagentów bez

materiału genetycznego, w celu wykrycia ewentualnej przypadkowej kontaminacji próbek. Podczas procedury użyto termocyklera firmy Biometra oraz odczynników, w tym polimerazy Taq firmy Qiagen.

Warunki reakcji PCR były następujące: początkowa denaturacja w temperaturze 94°C przez 5 minut, a następnie 40 cykli obejmujących denaturację w 94°C, przyłączenie primera w 55°C dla Gly168Ser lub 53°C dla Leu260Phe oraz elongację w 72°C. Denaturacja, przyłączenie primerów i elongacja w trakcie cykli trwały 45 sekund każda. Końcowym etapem po 40 cyklach była 10-minutowa elongacja.

Cięcie produktu PCR przeprowadzono za pomocą enzymów restrykcyjnych Dde I (Gly168Ser) i Bbs I (Leu260Phe) zgodnie z instrukcjami producentów (odpowiednio Q-biotech i Fermentas).

Uzyskane fragmenty restrykcyjne poddano elektroforezie na 3-procentowym żelu agarozowym z uwidocznieniem produktów za pomocą barwienia bromkiem etydyny oraz z zastosowaniem dokumentacji fotograficznej.

Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej użyto programów SAS (wersja 9.1) oraz Haplostats. Projekt analizowano, stosując metodę badania osób niespokrewnionych (*case-control study design*) [np. 8, 9]. Do wykazania związku między pojedynczymi polimorfizmami a cukrzycą typu 2 na poziomie genotypów użyto testu χ^2 (tab. 3 × 2 dla modelu addytywnego oraz tab. 2 × 2 dla modelu dominującego i recesywnego). Do wykazania związku pomiędzy haplotypami utworzonymi przez badane polimorfizmy a cukrzycą typu 2 użyto testu regresji logistycznej. Wartości $p < 0,05$ uznawano za znamienne statystycznie.

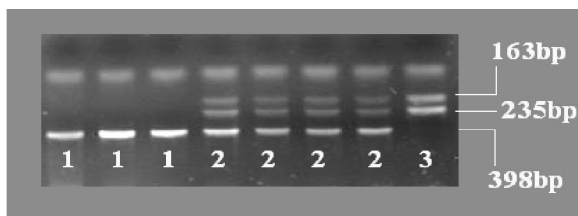
Wyniki

Podstawowe cechy demograficzne i biochemiczne badanych grup przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka kliniczna badanych grup

	Grupa kontrolna	Chorzy na cukrzycę typu 2
Płeć (% kobiet)	64	60
Wiek w chwili badania	53,7	59
BMI [kg/m ²]	30,9	32,4
Cholesterol całkowity [mmol/l]	5,3	5,7
TG [mmol/l]	1,7	2,3

BMI (*body mass index*) — wskaźnik masy ciała; TG — triglicerydy



Rycina 1. Przykładowe rezultaty cięcia i elektroforezy oraz sposób odczytu wyników polimorfizmu Gly168Ser (G/A, egzon 5, Genebank nr rs6923761), nr 1 — homozygota niecięta Gly/Gly 398 bp, nr 2 — heterozygota Gly/Ser 398 bp, 235 bp, 163 bp, nr 3 — homozygota cięta Ser/Ser 235bp, 163bp

W trakcie genotypowania dla polimorfizmu Gly168Ser uzyskano następujący obraz po wybarwieniu żelu bromkiem etydy (ryc. 1): pojedynczy, 398 bp, dla homozygoty Gly/Gly; podwójny, 235 bp i 163 bp dla homozygoty Ser/Ser; potrójny, 398bp, 235bp i 163bp dla heterozygoty Gly/Ser. Natomiast dla polimorfizmu Leu260Phe: pojedynczy, 395 bp, dla homozygoty Leu/Leu; podwójny, 266 bp i 129 bp dla homozygoty Phe/Phe; potrójny, 395bp, 266bp i 129bp dla heterozygoty Leu/Phe.

Analiza danych wykazała, że rozkład genotypów badanych polimorfizmów: G/A, Gly168Ser (egzon 5, rs6923761) oraz A/C, Leu260Phe (egzon 7, rs1042044) nie odbiega od równowagi Hardy'ego-Weinberga.

Analiza pojedynczych polimorfizmów wykazała, że wariant Gly168Ser jest granicznie związany z wystąpieniem cukrzycy typu 2 w ogólnym teście dla genotypów ($p = 0,085$) oraz w teście Cochran-Armitage dla trendu wpływu genotypów ($p = 0,053$).

Natomiast w przeprowadzonym teście dla genotypów w modelu recesywnym, w którym genotypowi Ser/Ser przeciwstawiono dwa pozostałe genotypy (Gly/Ser i Gly/Gly), wykazano, że istnieje związek

pomiędzy częstością badanego polimorfizmu a występowaniem cukrzycy typu 2 (odpowiednio $p = 0,03$).

Iloraz szans dla wystąpienia cukrzycy typu 2 u osób posiadających dwie seryny w pozycji 168 wynosi 1,72 (95-procentowy przedział ufności 1,05–2,82).

Częstość występowania genotypu Ser/Ser w grupie osób z rozpoznaniem klinicznym cukrzycy typu 2 w porównaniu z grupą kontrolną: 15,7% vs. 9,8%, $p = 0,03$.

Nie wykazano natomiast związku między polimorfizmem Leu260Phe a wystąpieniem cukrzycy typu 2 w każdym z badanych modeli, tj. w ogólnym teście dla genotypów ($p = 0,57$) w teście dla alleli ($p = 0,43$) oraz w teście dla genotypów w modelu recesywnym ($p = 0,28$).

Analiza haplotypów nie wnosi więcej informacji ponad uzyskane w analizie pojedynczych polimorfizmów (Haplostats, Global Score Statistics $p = 0,07$). Obecność allelu C (egzon 7) w haplocie numer 1 (G-C) zmniejsza ryzyko cukrzycy typu 2, a w haplocie numer 4 (A-C) — zwiększa, $p < 0,05$. Dla allelu G (egzon 7) wartości p są nieznaczące. Zmiany te wydają się ukierunkowane przez wpływ alleli polimorfizmu z egzonu 5 (tab. 2).

Dyskusja

Celem badania było stwierdzenie, czy dwa znane uprzednio polimorfizmy zmieniające sekwencję kodującą w genie dla receptora glukagonopodobnego peptydu 1 są związane z cukrzycą typu 2 w populacji południowo-wschodniej Polski. Wykazano, że obecność genotypu Ser/Ser w pozycji 168, w egzonie 5 receptora dla glukagonopodobnego peptydu 1, zwiększa niemal 2-krotnie ryzyko cukrzycy typu 2 w porównaniu z grupą kontrolną. Genotyp Ser/Ser występował znacznie częściej u chorych na cukrzycę typu 2 (15,7%) niż u osób z grupy kontrolnej (9,8%), $p = 0,03$.

Drugi badany polimorfizm, Leu260Phe, zlokalizowany w egzonie 7 GLP-1R, nie wykazał związku

Tabela 2. Rozkład haplotypów utworzonych z badanych polimorfizmów

Numer haplotypu	Allel		Wartość p	Częstość haplotypu (%)		
	Allel polimorfizmu egzonu 5 Gly168Ser	Allel polimorfizmu egzonu 7 Leu260Pro		Wszystkie badane osoby	Grupa kontrolna	Chorzy na cukrzycę typu 2
1	G	C	0,049*	25,5	27,7	22,3
2	G	G	0,63	42	42,1	40,8
3	A	G	0,97	1,8	1,9	1,7
4	A	C	0,02*	31	28,3	35,2

Test regresji logistycznej; * oznaczono $p < 0,05$; badana populacja = grupa kontrolna + chorzy na cukrzycę typu 2

z cukrzycą typu 2 w żadnym z badanych modeli. Również analiza haplotypów utworzonych przez dwa badane polimorfizmy pokazuje, że jedynie polimorfizm Gly168Ser odpowiada za związek z cukrzycą typu 2, gdyż haplotypy nie wykazują silniejszego związku (*association*) z cukrzycą.

Głównym ograniczeniem naszego badania jest fakt, że nie wykazuje ono jednoznacznie, czy między polimorfizmem Gly168Ser a cukrzycą typu 2 istnieje związek przyczynowo-skutkowy. Możliwe jest, że ryzyko rozwoju tej choroby zwiększa inny polimorfizm, będący w nierównowadze sprzężeń (*linkage disequilibrium*) z badanym przez nas polimorfizmem [13]. Aby wyjaśnić tę kwestię, konieczne jest zbadanie innych polimorfizmów występujących w tym genie. Możliwe jest to poprzez systematyczne sekwencjonowanie genu u kilkudziesięciu pacjentów i określanie związku każdego ze znalezionych polimorfizmów z cukrzycą typu 2. Alternatywnie możliwe są badania związku tak zwanych polimorfizmów etykietujących (*tagging SNPs*) wybranych na podstawie danych uzyskanych z projektu HapMap. Ostatecznie może się okazać konieczne wykonanie badań czynnościowych, na przykład badań *in vitro* liczby wtórnych przekaźników, produkowanych w wyniku stymulacji receptorów o różnym genotypie.

Gen GLP-1R nie wydaje się szczególnie konserwatywny u ludzi. W przywoływanym wcześniej badaniu obejmującym populację japońską [9] wykryto przynajmniej 5 polimorfizmów zmieniających sekwencję aminokwasową białka. Większość z nich występowała bardzo rzadko. Polimorfizm Tre149Met, który występował u pacjenta z zaburzeniami wydzielania insuliny i z insulinoopornością, był zlokalizowany w drugiej domenie przezbłonowej. Sugeruje to, że domena ta jest szczególnie ważna dla prawidłowego funkcjonowania białka.

Co ciekawe, badane przez nas polimorfizmy Gly 168 Ser i Leu260Phe sąsiadują bezpośrednio z fragmentami kodującymi domeny przezbłonowej GLP-1R. Domena przezbłonowa I obejmuje aminokwasy 145-167, a domena III — aminokwasy 237-259. Obecność polimorfizmów w bezpośrednim sąsiedztwie domen przezbłonowych może wpływać na zdolność białka do łączenia się z endogennym ligandem lub jego analogami bądź na zdolność ligandów do stymulacji powstawania wtórnych przekaźników. Wyniki naszych badań sugerują, że istotnie polimorfizm przylegający do pierwszej domeny przezbłonowej modyfikuje ryzyko wystąpienia cukrzycy typu 2.

Wyniki uzyskane w niniejszym badaniu poszerzają wiedzę na temat genetycznych czynników ryzyka cukrzycy typu 2. Konieczne są dalsze badania

w innych populacjach i grupach etnicznych. Analiza polimorfizmów GLP-1R może się okazać w przyszłości przydatna dla farmakogenetycznej analizy zastosowania analogów GLP-1 u chorych na cukrzycę typu 2. Przyszłe badania wykażą, czy podstawą decyzji o rozpoczęciu terapii za pomocą analogów oraz indywidualizacji dawki u pacjentów będą mogły być wyniki badania polimorfizmów genetycznych.

Informacje dodatkowe

Leszek Drabik, Elżbieta Hajto i Kazimierz Rajda uczestniczyli w projekcie w ramach prac Studenckiego Koła Naukowego przy Klinice Chorób Metabolicznych CMUJ oraz Studenckiego Koła Naukowego przy Katedrze Farmakologii CMUJ.

PIŚMIENNICTWO

1. Malecki M.T.: Genetics of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2005; 68 (supl. 1): S10–S21.
2. Kluz J., Adamiec R.: Nowe perspektywy terapii chorych na cukrzycę typu 2 oparte na glukagonopodobnym peptydzie 1 (GLP-1) i żołądkowym peptydzie hamującym (GIP). *Postępy Hig. Med. Dośw. (on-line)*. 2006; 60: 15–23.
3. Zander Z., Madsbad S., Madsen J.L., Holst J.J.: Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet* 2002; 359: 824–830.
4. Holst J.J.: Glucagon-like peptide-1: from extract to agent. The Claude Bernard Lecture, 2005. *Diabetologia* 2006; 49: 253–260.
5. Nauck M., Stockmann F., Ebert R., Creutzfeldt W.: Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1986; 29: 46–52.
6. Madsbad S., Schmitz O., Ransam J., Jakobsen G., Matthews D.R., NN2211-1310 International Study Group: Improved glycaemic control with no weight increase in patients with type 2 diabetes after once daily treatment with the long-acting glucagon-like peptide 1 analog liraglutide (NN2211): a 12-week, double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Care* 2004; 27: 1335–1342.
7. Kashima, Y., Miki, T., Shibasaki, T. i wsp.: Critical role of cAMP-GEFII-Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 2001; 276, 46046–46053.
8. Scrocchi L.A., Brown T.J., MacLusky N. i wsp.: Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene. *Nat. Med.* 1996; 2: 1254–1258.
9. Tokuyama Y., Matsui K., Egashira T., Nozaki O., Ishizuka T., Kanatsuka A.: Five missense mutations in glucagon-like peptide 1 receptor gene in Japanese population. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2004; 66: 63–69.
10. Report of a WHO Consultation: Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Genewa 1999.
11. Malecki M.T., Klupa T., Wanic K., Cyganek K., Frey J., Sieradzki J.: Vitamin D binding protein gene and genetic susceptibility to type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2002; 57: 99–104.
12. Malecki M.T., Moczulski D.K., Klupa T., Wanic K., Cyganek K., Frey J., Sieradzki J.: Homozygous combination of calpain 10 gene haplotypes is associated with Type 2 Diabetes mellitus in a Polish population. *Eur. J. Endocrinol.* 2002; 146: 695–699.
13. Altshuler D., Kruglyak L., Lander E.: Genetic polymorphisms and disease. *N. Engl. J. Med.* 1998; 338: 1626.