UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

HABILITAČNÍ PRÁCE

Pokroky v molekulární patologii diabetu

Komentář a soubor publikací předložených k habilitačnímu řízení
v oboru Genetika, molekulární biologie a virologie

Praha, 2018 **Petr HENEBERG**

© Petr Heneberg 2018
© Bentham Science
© Elsevier B.V.
© John Wiley & Sons
© Macmillan Publishers Limited
© Mary Ann Liebert, Inc.
© S. Karger AG
© TIGIS, spol. s r.o.

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci zpracoval samostatně a potvrzuji tímto úplnost uvedení všech použitých zdrojů. Prohlašuji, že práci jsem nevyužil k získání jiného titulu. Souhlasím s tím, aby práce ve své písemné podobě byla zpřístupněna pro studijní a výzkumné účely. Potvrzuji, že elektronická verze uložená v digitálním repozitáři Univerzity Karlovy je totožná s odevzdanou tištěnou verzí, s výjimkou příloh (článků), které byly z elektronické verze odstraněny z důvodu možného konfliktu s předchozím převodem autorských práv jednotlivým vydavatelům.

……..

Petr Heneberg

Poděkování

Rád bych využil této příležitosti k poděkování všem, kteří mi byli oporou nebo mi v různých fázích mé dosavadní činnosti pomohli, trpělivě snášeli mé různé vrtochy a sami svým životem a prací šli příkladem. V první řadě jsou to mí přímí nadřízení na 3. lékařské fakultě, jmenovitě, v pořadí dle časové souslednosti, Ivo Bárta, Jiří Horák, Jan A. Mejsnar, Michal Anděl a Michal Kršek. Velké poděkování patří pochopitelně i všem mým spoluautorům, bez nichž by jednotlivé práce buďto vůbec nevznikly nebo vznikaly podstatně obtížněji, toto poděkování směřuje všem stovkám mých spoluautorů, níže jsou vyjmenováni v abecedním pořadí jen ti z nich, kteří svým dílem přispěli ke vzniku publikací, které jsou součástí této habilitační práce: Michal Anděl, Marie Čecháková, Marie Černá, Pavlína Daňková, Galia Gat-Yablonski, Andrea Havlová, Josef Klíma, Lucie Kocková, Jan Kovář, Pavel Kraml, Petr Kučera, Tereza Kumštýřová, Yael Lebenthal, Jan Macek, Milena Malá, Václav Mandys, Václav Maťoška, Vlasta Němcová, Viviane Nogaroto, Nela Pavlíková, Jan Polák, Jana Potočková, Zdena Procházková, Pavel Ptáček, Blanka Rypáčková, Radka Straková, Daniela Šimčíková, Toshihiro Tajima, Miroslav Těšínský, Jan Trnka, Jana Urbanová, Kateřina Vackářová, Livia Večeřová a Tohru Yorifuji.

Osobní dík patří všem, kteří nenásledovali Erlangerovo „es gibt Dinge, die an nichts anderem als an sich selbst scheitern“ a snažili se o vytvoření pracovně i lidsky příjemného prostředí na fakultě nebo alespoň jejích částech a mimo ni, zejména kolegům z II. interní kliniky, se kterými jsem měl tu čest koexistovat, zaměstnancům mé laboratoře a studentům současným i minulým, kolegům a kamarádům ze spolupracujících institucí. Zavázán jsem všem, jejichž myšlenky jsem mohl následovat. Svému mentorovi, Benjaminu G. Neelovi a jeho četným kolegům a spolupracovníkům vděčím za to, že mě potenciálně nosné myšlenky učili identifikovat, zpracovávat, tříbit a třídit. Redakcím několika českých časopisů a novin vděčím za neocenitelná decentní upozornění a rady jak psát a jak formulovat sdělení, aby se dala číst alespoň s přimhouřením obou očí. Zvláštní poděkování patří Petru Bürgerovi, který mne před dvěma desítkami let svým negativním příkladem úspěšně odradil od zaměření se na „zelenou“ biologii, Honzovi Černému za jeho nedocenitelnou mimopracovní aktivitu spočívající v propagaci toho dobrého z českých molekulárně biologických laboratoří nám tehdy začínajícím studentům a Petru Dráberovi za nabídku místa podloženou z mé strany jen entuziasmem a pozdější poněkud předčasné osvojení si kompletního managementu experimentální práce umožněním práce na tématech, která nebyla pro jeho laboratoř typická, ale byla s těmi tradičními v synergii. Obdobný model svého fungování ostatně aplikuji i svém současném pracovišti na na 3. lékařské fakultě.

Zvláštní poděkování patří mým nejmilejším domácím mnohobuněčným organismům, které mě GDPR nedovoluje jmenovat, a bez jejichž podpory by tato práce ani její jednotlivé části nemohly vzniknout.

Molekulární patologie diabetu je velmi komplexním tématem, kdy ovlivněním celé řady mechanismů můžeme dojít k téměř nebo zcela identickému klinickému fenotypu. Tuto část habilitace píši v době své přítomnosti na 78th Scientific Sessions Americké diabetologické společnosti, kde dnes byla prezentována práce ukazující razantní zvýšení incidence autoimunitních reakcí proti jednomu z klíčových antigenů beta buněk slinivky břišní, dekarboxyláze kyseliny glutamové, následkem opakované expozice kojenců běžným gastrointestinálním infekcím. Zmíněné pozorování velmi případně ilustruje komplexitu zvoleného tématu, kdy mechanismus vzniku nemoci a jejích následků zdaleka není přímočarý. I když řada drah vedoucích ke vzniku diabetu je dobře známa a do detailů popsána, genotyp i fenotyp pacientů s diabetem je velmi plastický a výzkum molekulární patologie diabetu je přes veškeré intenzivní úsilí tisíců zainteresovaných vědců stále ve svých počátcích. Předkládaná habilitační práce je souborem 12 odborných článků, které sumarizují výsledky, jichž jsem ve spolupráci se svými výše vyjmenovanými kolegy dosáhl v posledních letech na 3. lékařské fakultě Univerzity Karlovy. Většina prezentovaných výsledků byla v letech 2013 až 2018 publikována v relevantních periodicích, jen nejnovější výsledky zahrnuté do této práce, byly teprve nedávno zaslány k posouzení nebo jsou v tisku. Seznam prací zahrnutých v předkládané habilitační práci předkládám níže. Práce jsou řazeny tematicky v pořadí, v jakém jsou uvedeny v příloze předkládané habilitační práce:

1. Anděl, M.; Němcová, V.; Pavlíková, N.; Urbanová, J.; Čecháková, M.; Havlová, A.; Straková, R.; Večeřová, L.; Mandys, V.; Kovář, J.; Heneberg, P.; Trnka, J.; Kraml, P.; Polák, J. (2014):
   Faktory vedoucí k poškození a destrukci beta-buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu.
   Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa 17 (3): 122–128; ISSN 1212-6853.

2. Šimčíková, D.; Kocková, L.; Vackářová, K.; Těšínský, M.; Heneberg, P. (2017):
   Evidence-based tailoring of bioinformatics approaches to optimize methods that predict the effects of nonsynonymous amino acid substitutions in glucokinase.
   Scientific Reports 7 (1): 9499; ISSN 2045-2322.
   IF 2016: 4,259
   rank (2016): multidisciplinary sciences 10/64

3. Šimčíková, D.; Heneberg, P. (subm.):
   Refinement of evolutionary medicine predictions based on clinical evidence for the manifestation of Mendelian diseases.

4. Heneberg, P. (2018):
   Redox regulation of hexokinases.
   Antioxidants & Redox Signaling, on-line first, doi: 10.1089/ars.2017.7255.; ISSN 1523-0864.
   IF 2016: 6,337
   rank (2016): biochemistry & molecular biology 34/290; endocrinology & metabolism 13/138

5. Těšínský, M.; Šimčíková, D.; Heneberg, P. (subm.):
   First evidence of changes in enzyme kinetics and stability of the glucokinase affected by somatic cancer-associated variations.

6. Urbanová, J.; Rypáčková, B.; Heneberg, P.; Anděl, M. (2017):
   Hepatocytární nukleární faktory a diabetes mellitus.
   Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa 20 (3): 120–129; ISSN 1212-6853.

7. 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*$^{-/-}$ model.
   Current Pharmaceutical Design 21 (39): 5736–5748; ISSN 1381-6128.
   IF 2015: 3,052
   rank (2015): pharmacology & pharmacy 73/253

8. Urbanová, J.; Rypáčková, B.; Kučera, P.; Anděl, M.; Heneberg, P. (2013):
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 β-cells in a family of *HNF1A*–MODY subjects.
International Archives of Allergy and Immunology 161 (3): 279–284; ISSN 1018-2438.
IF 2013: 2,433
rank (2013): allergy 13/21; immunology 87/144

9. Urbanová, J.; Rypáčková, B.; Procházková, Z.; Kučera, P.; Černá, M.; Anděl, M.; Heneberg, P. (2014):
Positivity for islet cell autoantibodies in patients with monogenic diabetes is associated with later diabetes onset and higher HbA_{1c} level.
Diabetic Medicine 31 (4): 466–471; ISSN 0742-3071.
IF 2014: 3,115
rank (2014): endocrinology & metabolism 59/128

10. Heneberg, P.; Šimčíková, D.; Čecháková, M.; Rypáčková, B.; Kučera, P.; Anděl, M. (2018):
Autoantibodies against ZnT8 are rare in Central-European LADA patients and absent in MODY patients, including those positive for other autoantibodies.
Journal of Diabetes and its Complications, on-line first, doi: 10.1016/j.jdiacomp.2018.10.004; ISSN 1056–8727.
IF 2017: 2,792
rank (2017): endocrinology & metabolism 85/143

11. Heneberg, P.; Malá, M.; Yorifuji, T.; Gat-Yablonski, G.; Lebenthal, Y.; Tajima, T.; Nogaroto, V.; Rypáčková, B.; Kocková, L.; Urbanová, J.; Anděl, M. (2015):
Low frequencies of autoimmunity-associated *PTPN22* polymorphisms in MODY patients, including those transiently expressing islet cell autoantibodies.
International Archives of Allergy and Immunology 166 (3): 189–198; ISSN 1018-2438.
IF 2015: 2,677
rank (2015): allergy 12/25; immunology 81/151

12. Heneberg, P.; Kocková, L.; Čecháková, M.; Daňková, P.; Černá, M. (2018):
Autoimmunity-associated *PTPN22* polymorphisms in latent autoimmune diabetes of the adult differ from those of type 1 diabetes patients.
International Archives of Allergy and Immunology 177 (1): 57–68; ISSN 1018-2438.
IF 2016: 2,437
rank (2017): allergy 17/27; immunology 103/155

OBSAH

1.	**Abstrakt**	**8**
2.	**Abstract**	**9**
3.	**Úvod**	**10**
3.1	Diabetes	10
3.2	Autoprotilátky jako diagnostický marker diabetu	13
3.3	Molekulární podstata typů monogenních typů diabetu	15
4.	**Cíle**	**18**
4.1	Přehled faktorů vedoucích k poškození a destrukci beta buněk [příloha 1]	18
4.2	Analýza enzymové kinetiky a predikce funkce mutací asociovaných s *GCK*-MODY [příloha 2]	18
4.3	Změna obecného nastavení predikčních algoritmů pro předpověď klinické manifestace fenotypů záměnových mutací [příloha 3]	18
4.4	Přehled stávajících poznatků o redox regulaci hexokináz [příloha 4]	18
4.5	Enzymová kinetika a stabilita somatických s nádory asociovaných záměnových mutací v GCK [příloha 5]	18
4.6	Přehled HNF ve vztahu k diabetes mellitus [příloha 6]	19
4.7	Kinetika derivátů sulfonylurey u pacientů s MODY [příloha 7]	19
4.8	První pozorování autoprotilátek proti antigenům beta buněk u rodiny pacientů s MODY [příloha 8]	19
4.9	Funkční relevance přítomnosti autoprotilátek proti antigenům beta buněk u pacientů s MODY [příloha 9]	19
4.10	Stanovení protilátek proti zinkovému transportéru u pacientů s LADA a MODY [příloha 10]	19
4.11	Stanovení frekvence funkčních polymorfismů v *PTPN22* u pacientů s MODY [příloha 11]	19
4.12	Stanovení frekvence funkčních polymorfismů v *PTPN22* u pacientů s LADA [příloha 12]	20
5.	**Materiál a metodika**	**21**
5.1	Analýza enzymové kinetiky mutací asociovaných s *GCK*-MODY [příloha 2]	21
5.2	Predikce funkce mutací asociovaných s *GCK*-MODY [příloha 2]	21
5.3	Změna obecného nastavení predikčních algoritmů pro předpověď klinické manifestace fenotypů záměnových mutací [příloha 3]	21
5.4	Enzymová kinetika a stabilita somatických s nádory asociovaných záměnových mutací v GCK [příloha 5]	22
5.5	Kinetika derivátů sulfonylurey u pacientů s MODY [příloha 7]	22
5.6	První pozorování autoprotilátek proti antigenům beta buněk u rodiny pacientů s MODY [příloha 8]	23
5.7	Funkční relevance přítomnosti autoprotilátek proti antigenům beta buněk u pacientů s MODY [příloha 9]	24
5.8	Stanovení protilátek proti zinkovému transportéru u pacientů s LADA a MODY [příloha 10]	24

5.9	Stanovení frekvence funkčních polymorfismů v *PTPN22* u pacientů s MODY [příloha 11]	24
5.10	Stanovení frekvence funkčních polymorfismů v *PTPN22* u pacientů s LADA [příloha 12]	25
6.	**Souhrn výsledků**	**27**
6.1	Přehled faktorů vedoucích k poškození a destrukci beta buněk [příloha 1]	27
6.2	Analýza enzymové kinetiky a predikce funkce mutací asociovaných s *GCK*-MODY [příloha 2]	27
6.3	Změna obecného nastavení predikčních algoritmů pro předpověď klinické manifestace fenotypů záměnových mutací [příloha 3]	28
6.4	Přehled stávajících poznatků o redox regulaci hexokináz [příloha 4]	28
6.5	Enzymová kinetika a stabilita somatických s nádory asociovaných záměnových mutací v GCK [příloha 5]	28
6.6	Přehled HNF ve vztahu k diabetes mellitus [příloha 6]	29
6.7	Kinetika derivátů sulfonylurey u pacientů s MODY [příloha 7]	29
6.8	První pozorování autoprotilátek proti antigenům beta buněk u rodiny pacientů s MODY [příloha 8]	29
6.9	Funkční relevance přítomnosti autoprotilátek proti antigenům beta buněk u pacientů s MODY [příloha 9]	30
6.10	Stanovení protilátek proti zinkovému transportéru u pacientů s LADA a MODY [příloha 10]	30
6.11	Stanovení frekvence funkčních polymorfismů v *PTPN22* u pacientů s MODY [příloha 11]	30
6.12	Stanovení frekvence funkčních polymorfismů v *PTPN22* u pacientů s LADA [příloha 12]	30
7.	**Závěry**	**32**
8.	**Literatura**	**34**
9.	**Přílohy**	**37**
9.1	Příloha 1	38
9.2	Příloha 2	46
9.3	Příloha 3	58
9.4	Příloha 4	116
9.5	Příloha 5	145
9.6	Příloha 6	168
9.7	Příloha 7	180
9.8	Příloha 8	226
9.9	Příloha 9	234
9.10	Příloha 10	251
9.11	Příloha 11	283
9.12	Příloha 12	294

1. ABSTRAKT

Předkládaná habilitační práce je příspěvkem k objasnění vybraných molekulárně patologických aspektů vzniku a progrese diabetes mellitus. Práce se zaměřuje na dva hlavní cíle: objasnění biochemické podstaty, predikce efektů mutací a objasnění mechanismů stojících za stávajícími léčebnými přístupy k MODY (z anglického *maturity onset diabetes of the young*) a na využití autoprotilátek proti antigenům beta buněk jako nástroje diferenciální diagnostiky diabetu, včetně analýzy role funkčních polymorfismů v proteinové tyrosinové fosfatáze *PTPN22* (z anglického *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*) při manifestaci autoimunity asociované s diabetem. Práce je souborem 12 odborných článků, které sumarizují výsledky, jichž jsem ve spolupráci se svými kolegy dosáhl v posledních letech na 3. lékařské fakultě Univerzity Karlovy. Z nejvýznamnějších výsledků naplňujících výše uvedené cíle je zřetele hodné zvláště zpřesnění predikcí efektů záměnových mutací v glukokináze (GCK), které jsme následně rozpracovali a generalizovali i pro HNF-4α a dalších 105 proteinů asociovaných s nejrůznějšími mendelistickými onemocněními. Detailně jsme popsali enzymovou kinetiku a vliv na stabilitu proteinu u 16 záměnových mutací v GCK, které jsou asociovány s MODY. V tomto směru výzkumu jsme následně pokračovali se zaměřením na roli změn v aktivitě GCK v nádorovém metabolismu, přičemž jsme zjistili, že nádory skutečně obsahují aktivační a stabilizační mutace v GCK, některé dokonce identické s již známými zárodečnými aktivačními mutacemi asociovanými s hyperinzulinemickou hypoglykemií. Při studiu dalších forem MODY, konkrétně *HNF1A*-MODY a *HNF4A*-MODY (z anglického *hepatocyte nuclear factor* 1A a 4A) jsme se vyvrátili hypotézu založenou na myším modelu *Hnf1a*-MODY, kde potlačení *Hnf1a* vede k razantnímu zvýšení hladin derivátů sulfonylurey v séru. Zjistili jsme, že tento efekt se u člověka neprojevuje vůbec nebo jen v malé míře. Při studiu autoprotilátek jako nástrojů diferenciální diagnostiky diabetu jsme zjistili neočekávaný, zřejmě geograficky fokální, výskyt autoprotilátek proti antigenům beta buněk u čtvrtiny testovaných pacientů s MODY. Pacienti s MODY, kteří byli pozitivní na autoprotilátky, nevykazovali rizikové HLA (z anglického *human leukocyte antigen*) antigeny ani rizikové *PTPN22* genotypy. Zjistili jsme, že všichni testovaní čeští pacienti byli negativní na autoprotilátku proti zinkovému transportéru ZnT8 (ZnTA). Naopak, většina z pozitivních pacientů s MODY vykazovala pozitivitu na protilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové. Expresi ZnTA a rizikové *PTPN22* genotypy jsme zkoumali i u pacientů s LADA (z anglického *latent autoimmune diabetes of adults*), přičemž jsme zjistili, že LADA vykazuje odlišné spektrum těchto znaků oproti diabetes mellitus 1. a 2. typu, což je v protikladu k dříve postulované hypotéze tvrdící, že LADA je pro své sdílené znaky s diabetes mellitus 1. i 2. typu považován za intermediární formu diabetu. Zjištěné výsledky přispívají ke stávajícímu rozmachu tzv. precizní medicíny, kdy se původně monolitický koncept jedné nebo několika málo nemocí definovaných na základě typických klinických příznaků (např. diabetes mellitus 1. typu) rozpadá na řadu specificky definovaných podtypů dané nemoci dle kritérií založených často na genetických či molekulárně biologických analýzách jednotlivých pacientů. Mendelistické nemoci, mezi něž MODY patří, jsou pro tento účel ideálním modelem, ale i u multifaktoriálních typů diabetu lze pozorovat zpřesňování a rozřeďování způsobů klasifikace a diagnostiky. Ačkoliv byl naším cílem především vyhledávací výzkum, významnou skutečností je, že jeden z výsledků předkládané práce se již stihnul promítnout i do nejnovějších Standardů lékařské péče o pacienty s diabetem vydávaných Americkou diabetologickou společností.

2. ABSTRACT

The present habilitation thesis contributes to the elucidation of selected molecular pathological aspects of the onset and progression of diabetes mellitus. The thesis has two major aims: 1) To elucidate the biochemical properties, make predictions of the effects of variations and uncover the mechanisms behind the existing therapeutic approaches to MODY. 2) To use autoantibodies against beta cell antigens as a tool that allows the differential diagnosis of diabetes, including the analysis of the role of functional polymorphisms in protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (*PTPN22*) in the manifestation of the diabetes-associated autoimmunity. The thesis consists of 12 papers, which summarize the results I have achieved in cooperation with my colleagues during the last several years, which I spent at the Third Faculty of Medicine of the Charles University. The most significant results include the evidence-based refinement of algorithms that allow the prediction of the effects of nonsynonymous variations in glucokinase (GCK), which we later further developed and generalized for HNF-4α and other 105 genes that are associated with various Mendelian diseases. We have described in detail the effects of the 16 mutation mutations in GCK that are associated with MODY on the enzyme kinetics and protein stability. We further extended this research to the role of somatic cancer-associated variations in GCK in tumor metabolism; in fact, we were the first to show that the somatic cancer-associated variations in GCK include activating and stabilizing variations; some of these are even identical to the already known germline activation mutations that are associated with hyperinsulinemic hypoglycemia. When focusing on other forms of MODY, namely, *HNF* (hepatocyte nuclear factor) *1A*-MODY and *HNF4A*-MODY, we refuted a hypothesis that was based on the mouse *Hnf1α*-MODY model, where *Hnf1α* suppression leads to a strong increase in the serum levels of sulphonylurea derivatives. Despite that, we found that this increase is absent in humans or is present only to a small extent. When focusing on autoantibodies as tools that facilitate the differential diagnosis of diabetes, we found an unexpected expression of autoantibodies against beta cell antigens in a quarter of tested Czech patients with MODY. Patients with MODY who were positive for autoantibodies, were not associated with high-risk HLA (human leukocyte antigens) or risky *PTPN22* genotypes. We found that all tested Czech patients were negative for the autoantibodies against the zinc transporter ZnT8 (ZnTA). Conversely, most of the MODY-positive patients showed positivity for the anti-glutamate decarboxylase autoantibodies. We investigated the ZnTA expression and *PTPN22* risk genotypes also in patients with LADA (latent autoimmune diabetes of adults), and we found that LADA is associated with a different spectrum of these markers compared to those of type 1 and type 2 diabetes mellitus. The presence of this different spectrum of markers is in contrast to the previously postulated hypothesis, which stated that LADA is a hybrid intermediate form of diabetes that shares features of both type 1 and type 2 diabetes. The findings described in the present thesis have contributed to the current boom of precision medicine. The precision medicine onset consists of the breakdown of originally monolithic concepts of one or a few diseases that were defined by characteristic clinical symptoms (typically type 1 diabetes mellitus) into a series of specifically defined subtypes of a given disease, which are defined based on criteria related to genetic or molecular biological analyses of individual patients. Mendelian diseases, including MODY, serve as ideal models for this purpose. However, the classification and diagnosis of multifactorial types of diabetes are also subject to refinement and stratification. Although we focused on basic research outcomes, one of the presented results had already been incorporated into the latest Standards of Medical Care in Diabetes issued by the American Diabetes Association.

3. ÚVOD

3.1 Diabetes

Lékařskou veřejností je stále zřetelněji akceptován poznatek, že diabetes mellitus není jednou nebo dvěma diagnózami s jasně definovanými příznaky a způsoby léčby, ale že naopak fenotyp pacientů s diabetem je vysoce komplexní a heterogenní, přičemž i samotná klasifikace diabetu je něčím, co se vyvíjí v závislosti na přenosu poznatků ze základního a (pre)klinického výzkumu do klinické praxe. Jen za několik málo let, po které se molekulární patologii diabetu věnuji, došlo k několika zásadním změnám mezinárodně akceptovaných klasifikací typů, resp. podtypů, diabetu a k výraznému rozšíření a zpřesnění představ o heterogenitě a plasticitě tohoto onemocnění. Americká diabetologická společnost v nejnovějších standardech lékařské péče o pacienty s diabetem (*Standards of Medical Care in Diabetes*) reflektuje a cituje i jeden z našich nálezů, který je přílohou této studie [příloha 9], a který poukazuje právě na heterogenitu fenotypů diabetu i v kritériích, která bývala dlouhá léta dogmaticky považována za neměnná a klíčová pro umožnění samotné diagnostiky pacientů s nově se manifestujícím diabetem (American Diabetes Association 2018). V dnešní době, která akcentuje formalistické „aplikační" výsledky výzkumu na úkor poznatků přinášejících průlomové objevy a nálezy s reálným dopadem na lidskou činnost či zdraví, je výše zmíněný rychlý přenos poznatku do praxe ukázkou scientometricky obtížně hodnotitelného dopadu naší práce, která přitom má již po několika málo letech od publikace přímý vliv na správnost diagnostiky pacientů s diabetes mellitus, tedy jednoho z nejrozšířenějších civilizačních onemocnění.

Společným jmenovatelem všech typů diabetu je hyperglykémie jakožto následek potlačení sekrece inzulínu, inzulínové rezistence anebo kombinace těchto dvou faktorů. Historicky byli pacienti s diabetes mellitus klasifikováni do dvou kategorií, přičemž pacienti s diabetes mellitus 1. typu byli charakterizováni deficientní sekrecí inzulínu, zatímco pacienti s diabetes mellitus 2. typu byli charakterizováni inzulinovou rezistencí, kterou sekrece inzulínu nebyla schopna vykompenzovat.

Diabetes mellitus 1. typu je charakterizován zánětlivými procesy autoimunitní povahy, které vedou k progresivní destrukci beta buněk slinivky břišní a často až k úplnému vymizení sekrece inzulínu. Proto býval diabetes mellitus 1. typu nazýván inzulín-dependentním diabetem. Byl považován za typické onemocnění dětí, dospívajících a mladých dospělých. Nicméně, později se ukázalo, že diabetes mellitus 1. typu se může projevit i ve výrazně pokročilém věku. Navíc, diabetes mellitus 1. typu s nástupem ve středním či vyšším věku je asociován s odlišnou prognózou a přežití těchto pacientů podléhá odlišným dlouhodobým trendům než obecně se lepšící situace s morbiditou a mortalitou pacientů, u kterých se diabetes mellitus 1. typu manifestoval již ve věku dětském či během adolescence (Harjutsalo a kol. 2011).

Roku 1993 byl navržen koncept LADA (z anglického *latent autoimmune diabetes of adults*) (Vandewalle a kol. 1993). Tento termín je užíván pro autoimunitní formu diabetu s polygenní dědičností, která (na rozdíl od klasického diabetu 1. typu) nastupuje až v dospělosti. Jako věkové kritérium diagnózy LADA bývá užíván minimální věk první manifestace onemocnění 30 nebo 35 let. Fenotyp pacientů s LADA diabetem se podobá fenotypu pacientů s diabetes mellitus 2. typu a LADA bývá často jako diabetes 2. typu nesprávně diagnostikován. Výše uvedené se děje typicky u pacientů s rodinnou anamnézou pozitivní na diabetes a u pacientů obézních. Pro své sdílené znaky s diabetes mellitus 1. i 2. typu bývá mnohými autoritami považován za intermediární formu diabetu, a to včetně paralelní asociace s genetickými markery obou zmíněných typů diabetu. Analýze asociace s genetickými markery autoimunity, konkrétně s funkčními polymorfismy ve fosfatáze *PTPN22* (z anglického *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*) se věnuji v jedné z příloh předkládané habilitační práce. Diagnóza LADA je typicky založena na nálezu hyperglykémie doprovázené selháním produkce inzulínu namísto inzulínové rezistence. Detekovatelný je tedy pokles C-peptidu a zvýšené hladiny autoprotilátek proti antigenům beta buněk. Pacienti s LADA bývají nejčastěji pozitivní na protilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové (GADA), která u pacientů s diabetes mellitus 1. typu je typická spíše pro

pacienty dospělé než pediatrické. Ostatní autoprotilátky proti antigenům beta buněk, např. proti buňkám ostrůvků (ICA), či proti inaktivní fosfatáze asociované s insulinomem (IA-2A) se u pacientů s LADA také často exprimují. Nejasná je situace ohledně exprese protilátek proti zinkovému transportéru ZnT8 (ZnTA), jejichž prevalence je udávána v širokém rozmezí od několika jednotek procent až do úrovně téměř poloviční prevalence [příloha 10, tab. S1]. Problematice prevalence ZnTA u českých pacientů s LADA jsme se proto věnovali v jedné z příloh předkládané habilitační práce [příloha 10]. Charakteristickým znakem LADA je, že po několik měsíců od propuknutí nemoci pacienti s LADA nevyžadují inzulín a lze je léčit obdobně jako pacienty s diabetes mellitus 2. typu. Přítomnost této nejméně několik měsíců trvající periody, kdy léčba pacienta nevyžaduje podávání inzulínu, je klíčovým diagnostickým kritériem LADA. Jednotlivé diabetologické školy se ovšem opět neshodnou na minimální délce trvání této periody. Vesměs bývá jako kritérium pro LADA užívána délka trvání této periody po nejméně šest až 12 měsíců [příloha 10, tab. S1]. Užití termínu LADA stále ještě není ustáleno, stejně jako jeho definice. Americký NIH (*National Institutes of Health*) definoval LADA jako diabetes 1. typu, který se rozvíjí u dospělých osob (American Diabetes Association 2007), Expertní komise pro diagnózu a klasifikaci diabetes mellitus (*Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*) termín LADA neuznává vůbec. Americká diabetologická asociace v nejnovějších standardech lékařské péče o pacienty s diabetem (*Standards of Medical Care in Diabetes*) termín LADA rovněž nezmiňuje a dělí diabetes mellitus na 1. typ, 2. typ, gestační diabetes a specifické typy diabetu, do kterých však LADA nespadá (American Diabetes Association 2018). Dříve se soudilo, že u pacientů s LADA dochází k identickým procesům způsobujícím propuknutí nemoci jako u diabetes mellitus 1. typu, s tím, že tyto procesy jsou jen pomalejší. Zároveň platilo dogma, že pacienti s LADA a diabetes mellitus 1. typu jsou asociováni se stejnými HLA (z anglického *human leukocyte antigen*) alelami, spektrem protilátek, nízkou sekrecí inzulínu a vysokou rychlostí progrese k závislosti na inzulínu (Pozzilli & Di Mario 2001). Nicméně, opak se zdá být pravdou. Klinické, farmakologické a genetické charakteristiky pacientů s LADA je odlišují jak od pacientů s diabetes mellitus 1. typu, tak od pacientů s diabetes mellitus 2. typu (Brophy a kol. 2011; Canivell & Gomis 2014; Luo a kol. 2016); na toto téma se zaměřujeme rovněž i v příloze 10. Navzdory problémům s přesnou definicí a klasifikací pacientů s LADA je nezbytné tyto pacienty charakterizovat odděleně od pacientů s diabetes mellitus 1. typu. LADA vykazuje nejvyšší prevalenci mezi autoimunitními typy diabetu s nástupem v dospělosti a prevalence tohoto typu diabetu je pravděpodobně vyšší než prevalence samotného diabetes mellitus 1. typu (Laugesen a kol. 2015). Je tedy zřejmé, že LADA vyžaduje do budoucna výrazně více pozornosti, než bylo tomuto typu diabetu dosud věnováno.

Diabetes mellitus 2. typu zahrnuje 90% až 95% všech diagnostikovaných případů diabetu. Pacienti s diabetes mellitus 2. typu mají většinou jen relativní (ne absolutní) deficienci inzulínu a vykazují periferní inzulinovou rezistenci. Zpočátku, a často celoživotně, nevyžadují léčbu inzulínem. Většina pacientů s diabetes mellitus 2. typu je obézních nebo s nadváhou, přičemž obezita sama o sobě přispívá k inzulinové rezistenci. Pacienti s diabetes mellitus 2. typu, kteří nejsou obézní, ani nevykazují nadváhu dle tradičních kritérií, mají často zvýšené procento tělního tuku v břišních partiích (American Diabetes Association 2018). V předkládané habilitační práci se pacientům s diabetes mellitus 2. typu nevěnuji, s výjimkou jejich užití jako kontrol pro studium pacientů s LADA a MODY (z anglického *maturity onset diabetes of the young*) [přílohy 10 a 12], proto i zde v úvodu nebude diabetes 2. typu dále rozvíjen.

Gestační diabetes je onemocněním diagnostikovaným v druhém nebo třetím trimestru těhotenství, kterému nepředcházela manifestace diabetu před otěhotněním (American Diabetes Association 2018). První pozorování gestačního diabetu se datují již do 19. století, kdy J. Matthews Duncan zaznamenal diabetes objevující se během těhotenství a vytrácející se po jeho ukončení (Duncan 1882). Neléčený gestační diabetes vede ke zvýšení mateřské a perinatální morbidity. Glukóza se snadno dostává přes placentu, a proto zvýšená hladina glukózy u matky vede i k hyperglykémii plodu. Slinivka břišní plodu následně reaguje produkcí a uvolňováním zvýšeného množství inzulínu a takto navozená hyperinzulinémie stojí za většinou komplikací asociovaných s gestačním diabetem; dohromady se tyto příznaky označují jako diabetická fetopatie. Charakteristickou je především makrosomie plodu, přičemž růst plodu je disproporční a zvláště zbytnělá je podkožní tuková tkáň. Makrosomie se projevuje i tvorbou širokých ramen, což predisponuje plod k dystokii ramének, tedy závažné

porodní komplikaci. Po porodu se u dětí matek s gestačním diabetem mohou naopak projevit hypoglykémie. Jsou způsobeny přetrváváním vysokých koncentrací inzulínu v krvi novorozenců během časného novorozeneckého období. Dalšími patologiemi bývají hypokalcémie, hyperbilirubinémie a pletora (Coustan 2013). Během těhotenství se často poprvé manifestuje i glukokinázový (GCK) diabetes, který bude popsán níže; suspektní případy splňující kritéria *GCK*-MODY diabetu jsou proto referovány na genetické testování pro vyloučení zmíněného autozomálně dominantně děděného onemocnění.

Mimo výše uvedené existuje řada minoritních typů diabetu, které vznikají z jiných příčin. Mezi ně se řadí mendelisticky děděné typy diabetu, ať jsou to již autozomálně dominantní podtypy MODY diabetu anebo autozomálně dominantně i recesivně děděné podtypy novorozeneckého diabetu. Dále je mezi minoritní typy diabetu zahrnut diabetes vznikající následkem nemocí exokrinní slinivky břišní, např. cystické fibrózy nebo pankreatitidy. V neposlední řadě do skupiny minoritních typů diabetu patří i chemicky indukovaný diabetes, který lze navodit například užitím glukokortikoidů anebo antiparazitik, typicky při léčbě závažných onemocnění, např. AIDS (z anglického *acquired immunodeficiency syndrome*), nebo po transplantacích orgánů, tedy při příležitostech, kdy je akceptovatelné i užití léků v dávkách majících silné diabetogenní účinky (American Diabetes Association 2018). Chemicky indukovaný diabetes lze navodit i užitím jedů, např. jedem na krysy Vacor (pyrinuron) [příloha 1]. Předkládaná práce se zabývá několika minoritními typy diabetu, především *GCK*-MODY, ale i dalšími dvěma nejčastěji se vyskytujícími formami MODY, které jsou způsobeny autozomálně dominantními mutacemi v genech pro hepatocytární nukleární faktory (HNF), jmenovitě v *HNF1A* (produkt HNF-1α; z anglického *hepatocyte nuclear factor-1 α*) a *HNF4A* (produkt HNF-4α; z anglického *hepatocyte nuclear factor-4 α*), tedy *HNF1A*-MODY a *HNF4A*-MODY.

GCK-MODY je způsobeno autozomálně dominantně působícími mutacemi potlačujícími či zcela inhibujícími aktivitu kinázy GCK. Zatímco průběh *GCK*-MODY je velmi mírný, v případě inaktivace obou alel *GCK* dochází k manifestaci permanentního novorozeneckého diabetu, vzácného, ale závažného onemocnění. Ve stejné molekule může docházet i k aktivačním mutacím, které se manifestují ve formě perzistentní hyperinzulinemické hypoglykémie u dětí. Protože heterozygotně se manifestující inhibice GCK je vesměs spojena jen s mírnou hypoglykémií na lačno, řada pacientů s *GCK*-MODY uniká diagnostice kvůli absenci typických symptomů diabetu. Zdánlivě vyšší prevalence *GCK*-MODY je naopak známa ze zemí, ve kterých se provádí rutinní krevní testy těhotných žen nebo orální glukózové toleranční testy příbuzných diabetiků z rodin s vícegeneračním výskytem diabetu 2. typu (Osbak a kol. 2009). V předkládané práci se zabýváme jednak biochemickou charakterizací s diabetem asociovaných mutací v GCK, *in silico* predikcí jejich fenotypu [obojí příloha 2] a zároveň i přesahem do nádorového metabolismu biochemickou charakterizací s nádory asociovaných somatických mutací v GCK [příloha 5]. Za účelem *in silico* predikcí fenotypu mutací v GCK jsme rovněž vytvořili aktuální soupis veškerých publikovaných mutací v tomto genu [příloha 2, tab. S2].

Spolu s *GCK*-MODY je nejčastějším typem monogenního diabetu *HNF1A*-MODY. Manifestuje se nízkým renálním prahem pro glykosurii a významnou senzitivitou k derivátům sulfonylurey. Pacienti s tímto typem diabetu bývají v dětství normoglykemičtí, ale vykazují progresivní defekt sekrece inzulínu. Diabetes je u pacientů s *HNF1A*-MODY diagnostikován většinou ve druhé až páté dekádě života. Léčba je nutná po zbytek jejich života, časté jsou mikrovaskulární a makrovaskulární komplikace, zejména při neadherenci k léčbě. Nemoc je léčitelná často po velmi dlouhou dobu pomocí derivátů sulfonylurey, u řady pacientů je ale následně nutná léčba inzulínem (Thanabalasingham & Owen 2011), inhibitory dipeptidyl peptidázy-4 (DPP-4), či agonisty peptidu podobného glukagonu 1 (GLP-1). Mezi senzitivitou pacientů s *HNF1A*-MODY k derivátům sulfonylurey panují velké individuální rozdíly a pokud diabetolog následuje standardní dávku, může docházet k těžkým hypoglykémiím (Hattersley & Patel 2017). Senzitivita k derivátům sulfonylurey je vyšší nejen oproti běžné populaci, ale čtyřikrát vyšší i oproti pacientům s diabetes mellitus 2. typu (Pearson a kol. 2003). Při genetické diagnóze *HNF1A*-MODY si je nutno být vědom častého výskytu polymorfismů v *HNF1A*, které jsou mimo jiné asociovány se zvýšeným rizikem diabetes mellitus 2. typu. Nesprávně nastavené rozlišení mezi mutacemi způsobujícími MODY a benigními polymorfismy v genech asociovaných s MODY vedlo v Německu k nesprávné

diagnóze *HNF1A*-MODY u 38% takto diagnostikovaných pacientů (Awa a kol. 2011; Hattersley & Patel 2017). V předkládané práci se věnujeme zejména analýze farmakokinetiky a farmakodynamiky široce rozšířených derivátů sulfonylurey u pacientů s *HNF1A*-MODY, přičemž jsme se soustředili především na stále ještě nejrozšířenější sekretagogum druhé generace z 60. let, glibenklamid, a na gliklazid, který se na českém trhu objevil v polovině osmdesátých let, zprvu pouze pro léčbu diabetu manifestujícího se spolu s retinopatií (Šmahelová 2008) [příloha 7]. U pacientů s *HNF1A*-MODY jsme rovněž sbírali data o expresi autoprotilátek proti antigenům beta buněk [přílohy 8, 9 a 10] a o spektru asociovaných polymorfismů v *PTPN22* [příloha 11].

Třetím typem MODY, který byl mezi námi analyzovanými pacienty početně zastoupen, je *HNF4A*-MODY. Tento typ MODY je několikanásobně méně častý než předchozí dva, tvoří zhruba 5% až 10% diagnostikovaných případů MODY u nás i ve světě. Pacienti s *HNF4A*-MODY mívají (na rozdíl od pacientů s *HNF1A*-MODY) normální renální práh glykosurie a výraznou senzitivitu k derivátům sulfonylurey. Novorozenci se vyznačují neonatální hyperinzulinémií a hypoglykémií s asociovanou makrosomií. Typické jsou též nízké koncentrace lipoproteinů s vysokou hustotou (HDL) a naopak vysoké koncentrace lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL) (Hattersley & Patel 2017). Z pohledu genetických příčin nemoci je zajímavé, že pacienti s *HNF4A*-MODY způsobeným mutací p.114R>W, která je přítomna zhruba u 15% pacientů s *HNF4A*-MODY, mají fenotyp odlišný od ostatních pacientů s *HNF4A*-MODY. Je pro ně typickou snížená senzitivita k léčbě nízkými dávkami sulfonylurey, nemoc u nich má obecně sníženou penetranci a chybí ovlivnění porodní hmotnosti (Laver a kol. 2016; Hattersley & Patel 2017). V předkládané práci se u pacientů s *HNF4A*-MODY věnujeme obdobným tématům jako u pacientů s *HNF1A*-MODY, tedy farmakokinetice a farmakodynamice derivátů sulfonylurey [příloha 7], údajům o expresi autoprotilátek proti antigenům beta buněk [přílohy 9 a 10] a o spektru asociovaných polymorfismů v *PTPN22* [příloha 11].

3.2 Autoprotilátky jako diagnostický marker diabetu

Historie výzkumu autoprotilátek proti antigenům beta buněk začíná objevem existence ICA už roku 1974. Teprve po objevu tohoto typu autoprotilátek, jejichž přesný epitop byl neznámý, následovaly objevy protilátek specifických k jednotlivým proteinům. Konkrétně došlo k objevu specifické s autoimunitními typy diabetu asociované exprese autoprotilátek proti inzulínu (IAA), následně GADA, IA-2A a nakonec i ZnTA (Wenzlau & Hutton 2013). Teprve v nedávné době následovaly objevy autoprotilátek proti desítkám dalších proteinů. I když další protilátky byly u některých pacientů s autoimunitním diabetem přítomny, jejich prevalence byla nízká anebo se dramaticky mezi jednotlivými publikovanými studiemi lišila. Vesměs nedosahovala více než 1% pacientů s diabetes mellitus 1. typu a konzistentně nepřesahovala 10% v žádné z publikovaných studií, s výjimkou recentně publikovaných autoprotilátek proti EEF1A1 (z anglického *elongation factor 1 alpha 1*), UBE2L3 (z anglického *ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3*) a tetraspaninu 7 (Koo a kol. 2014; Walther a kol. 2016), nicméně pro protilátky proti těmto třem antigenům nejsou dosud komerčně dostupné diagnostické eseje, jejich vývojem a testováním se zabýváme mimo jiné v naší laboratoři. Dále existuje celá řada autoprotilátek známých z myších modelů diabetu a prediabetu a proti antigenům s vysokou prevalencí i u člověka, jakou mají například autoprotilátky proti gangliosidům GM2-1 (Dotta a kol. 1998), jejichž diagnostické využití však blokuje častý nespecifický výskyt při autoimunitním, s diabetem nesouvisejícím, postižení jiných tkání. Diagnostika autoimunity asociované s (pre)diabetem tedy stále závisí na pouhých čtyřech autoantigenech, které byly objeveny před více než jednou dekádou [příloha 10].

Rutinní diagnostika autoimunních typů diabetu využívá testů autoprotilátek proti antigenům beta buněk jako průkazu s diabetem asociované autoimunity, přičemž pozitivita na větší počet těchto autoprotilátek je spojena s přesnější diagnózou. Testování vícečetných autoprotilátek proti beta buňkám je dnes rutinou při klinické diagnóze pediatrického diabetu i diabetu s nástupem až v dospělosti. Stále více zemí přechází z testování pouze na jednu nebo dvě autoprotilátky (obvykle GADA a IA2A nebo ICA) na paralelní testy tří nebo více typů autoprotilátek, což je přínosem pro zpřesnění diagnostiky. Průkaznost některých autoprotilátek, konkrétně ZnTA, je však jednoznačná jen u pediatrických pacientů, zatímco u pacientů s nástupem diabetu v dospělosti je sporná [příloha 10, tab. S1]. Zároveň autoprotilátky proti inzulínu, které se u autoimunitního diabetu této

věkové kategorie vyskytují, nelze testovat, jakmile pacientovi začal být podáván inzulín.

V příloze 10 předkládané práce jsme se proto zaměřili na prevalenci ZnTA u českých pacientů s LADA. ZnTA byly objeveny skupinou Johna C. Huttona jako vysoce prevalentní autoprotilátky u skupiny nově diagnostikovaných pacientů s diabetes mellitus 1. typu (prevalence 60%–80%) a u pacientů s dalšími autoimunitními chorobami (Addisonova choroba 9%, celiakie 31%, ale systemický lupus erythematosus 0% a revmatoidní artritida rovněž 0%). U kontrolních osob bez autoimunitních onemocnění se prakticky nevyskytují (<2%) a jsou rovněž málo časté u pacientů s diabetes mellitus 2. typu (<6%) (Wenzlau a kol. 2007). Podobné hodnoty prevalence popsala nedávno Marta Fichna se svými spolupracovníky, kteří zároveň zjistili, že pokud pacienti s Addisonovou chorobou jsou pozitivní na ZnTA, polovina z nich má zároveň diabetes mellitus 1. typu (Fichna a kol. 2016). Pacienti pozitivní na ZnTA se objevují též u Hashimotovy thyroiditidy (20–21% prevalence; zmíněná studie měla ale 6% prevalenci ZnTA i u kontrolních osob) (Masala a kol. 2014). U pacientů s cystickou fibrózou nejsou ZnTA příliš časté, udávána je pouhá 3% prevalence (Bizzarri a kol. 2013). U pacientů s diabetes mellitus 1. typu je pozitivita na ZnTA asociována se zvýšeným rizikem Hashimotovy thyroiditidy (Rogowicz-Frontczak a kol. 2014), vzrůst může rovněž před a po očkování, například proti chřipce (Svensson a kol. 2014). Užití ZnTA pro diferenciální diagnostiku autoimunitního diabetu je komplikováno tím, že v některých regionech je poměrně vysoká prevalence autoprotilátek diabetu neautoimunitního původu. Například z Estonska byla publikována studie tvrdící, že 22% jimi zkoumaných pacientů s diabetes mellitus 2. typu bylo pozitivních na autoprotilátky proti antigenům beta buněk, přičemž 6% bylo pozitivních na ZnTA (Haller-Kikkatalo a kol. 2015). Podobně koncipovaná studie ze Singapuru udává 9% prevalenci autoprotilátek proti antigenům beta buněk u pacientů s diabetes mellitus 2. typu, přičemž 2% byla pozitivních na ZnTA (Ng 2014). V americké ACCORD studii byla pozitivita pacientů s diabetes mellitus 2. typu na ZnTA spojena s těžkými hypoglykémiemi a neschopností dosáhnout glykovaného hemoglobinu (HbA1c) ≥42 mmol/mol (Chow a kol. 2015). Pacientky s gestačním diabetem rovněž mohou být pozitivní na ZnTA, 5% prevalence byla publikována z Austrálie (Rudland a kol. 2015) a 3% prevalence ze Švédska (Dereke a kol. 2016) [příloha 10].

U pacientů s MODY jsme popsali častý výskyt autoprotilátky GADA. Do doby publikace našich výsledků existovala jen jediná obdobná zpráva (Schober a kol. 2009), která ale byla založena na německém registru pacientů s diabetem, u nějž je v poslední době zpochybňována úroveň diagnostiky MODY a pravděpodobně zahrnuje velké množství pacientů, jejichž diabetes byl chybně diagnostikován jako MODY (Awa a kol. 2011; Hattersley & Patel 2017). Tato situace je zvláště kuriózní vzhledem k tomu, že v mnoha často i vyspělých zemích pacienti naopak stále ještě nejsou naopak na genetické potvrzení diagnózy MODY posíláni vůbec nebo jen v malé míře (Kleinberger a Pollin 2015). GADA jsou skupinou autoprotilátek proti 64kDa a 67kDa isoenzymům dekarboxylázy kyseliny glutamové označované GAD65 a GAD67. Isoenzym označovaný jako GAD65 odpovídá 64kDa formě a má vysokou antigenicitu, zatímco GAD67 s ním sdílí jen 65% podobnost aminokyselinové sekvence. Navzdory tomu, že GAD67 je rozpustnější, jeho antigenicita je výrazně nižší než antigenicita GAD65. Popsány byly poprvé ze séra pacienta s diabetes mellitus 1. typu, epilepsií a stiff-person syndromem (Solimena a kol. 1988; Baekkeskov a kol. 1990). Dnes již víme, že tento pacient v sobě spojoval dvě hlavní diagnózy, po které jsou GADA typické – autoimunitní diabetes i stiff-person syndrom. Autoprotilátky proti GADA se vyskytují při nástupu diabetu u 70% až 90% pacientů s diabetes mellitus 1. typu, a u pacientů s diabetes mellitus 1. typu s nástupem v dospělosti se jedná o marker s nejvyšší senzitivitou ze všech dosud klinicky užívaných autoprotilátek (Shoenfeld a kol. 2014). GADA jsou též cenným markerem LADA. Protože mladé nahé myši léčené intravenózní dávkou rekombinantní GAD65 nebo GAD67 jsou chráněny před diabetes mellitus 1. typu navozením tolerance T-buněk (Clemente-Cadares a kol. 2012), obdobný způsob léčby byl klinicky testován i na lidských dobrovolnících. Nicméně jak podání GAD, tak podání deoxyribonukleové kyseliny (DNA) kódující tento enzym nevedla k významnějším terapeutickým úspěchům (Fenalti & Buckle 2010; Larsson & Lernmark 2011; Shoenfeld a kol. 2014).

Poslední autoprotilátkou asociovanou s diabetem, které se v předkládané práci okrajově věnujeme, je IA-2A. Podobně jako v případě GAD se opět jedná o jeden z hlavních autoantigenů asociovaných s diabetes mellitus 1.

typu (Lan a kol. 1994). Antigen sám je inaktivní proteinovou tyrosinovou fosfatázou podílející se svými neenzymatickými aktivitami na regulaci sekrece inzulínu. Objevuje se charakteristicky již během prediabetu (Pietropaolo a kol. 2005), v pozdějších fázích rozvoje nemoci její hladina naopak klesá. U pacientů s nástupem autoimunitního diabetu až v adolescenci a dospělosti je zastoupena výrazně méně než u pacientů pediatrických (Lampasona a kol. 2010; Hawa a kol. 2013; Xiang a kol. 2015).

Genetické riziko exprese autoprotilátek proti antigenům beta buněk i následné manifestace autoimunitního diabetu je vysoké, avšak nedostatečně podchycené. Zatímco u dvojčecích studií je shoda ve výši 40% až 90% pro jednovaječná dvojčata, u dvojvaječných sourozenců již shoda klesá na pouhých 12.9%, 4.5% a 1.8% při sdílení dvou, jedné či žádné rizikové HLA alely (Pociot a kol. 1993; Kyvik a kol. 1995; Shoenfeld a kol. 2014). Nosičství rizikových HLA alel je zřejmě nejvýznamnějším rizikovým faktorem pro vznik autoimunitního diabetu. Pro diabetes mellitus 1. typu jsou charakteristické rizikové haplotypy DR4, DQB*0302 a/nebo DR3, DQB*0201, které sdílí zhruba polovina pacientů s tímto onemocněním (Shoenfeld a kol. 2014). Nicméně přítomnost rizikových HLA-DQ haplotypů má jen malou predikční hodnotu pro expresi či absenci autoprotilátek. U séronegativních pacientů se dvěma rizikovými HLA-DQ alelami je ale po nástupu diabetes mellitus 1. typu rychlejší rozvoj závislosti na inzulínu (Pietropaolo a kol. 2002). Pokud se zaměříme na LADA, oblast hlavního histokompatibilního komplexu (polymorfismus rs9272346) je opět nejvýznamnějším rizikovým faktorem a je následována polymorfismy v *PTPN22* (rs6679677, na který jsme zaměřili v předkládané práci) a *SH2B3* (rs17696736). Všechny zmíněné rizikové polymorfismy jsou sdíleny s diabetes mellitus 1. typu, se kterým je ale jejich asociace výraznější. Pacienti s LADA se ve svých polymorfismech liší i od pacientů s diabetes mellitus 2. typu. Nejvýznamnější z polymorfismů charakteristických pro diabetes mellitus 2. typu, rs7903146-T v genu *TCF7L2* (z anglického *transcription factor 7-like 2*), je u pacientů s LADA zastoupen výrazně méně než u pacientů s diabetes mellitus 2. typu a tedy nehraje zásadnější roli v etiologii LADA. Naopak polymorfismus rs12427353 v *HNF1A* je charakteristický jak pro LADA, tak pro diabetes mellitus 2. typu (Mishra a kol. 2017). Zajímavé je, že jediný dosud známý markerů považovaných za rizikové pro diabetes mellitus 1. i 2. typu, *GLIS3* (z anglického *GLI-similar protein 3*), není považován za rizikový faktor pro LADA (Groop & Pociot 2014).

3.3 Molekulární podstata typů monogenních typů diabetu

Zatímco diabetes mellitus 1. a 2. typu a LADA jsou nemocemi polygenními, s významným podílem vlivů prostředí, u monogenních typů diabetu bývá příčina jasně definovaná a penetrance vysoká, často téměř absolutní. Ze tří monogenních typů diabetu, kterým se věnuji v předkládané práci, je situace nejpřímočařejší u *GCK*-MODY. GCK je jednou z pěti savčích adenosintrifosfát (ATP)-dependentních hexokináz, navzájem blízce příbuzných enzymů fosforylujících glukózu, lišících se navzájem svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Působí jako senzor glukózy v beta buňkách slinivky břišní, reguluje přeměnu glukózy na glykogen v játrech, dále je exprimována i v mozku a endokrinních buňkách střeva (Jetton a kol. 1994). Oproti ostatním hexokinázám vykazuje nižší afinitu ke svému substrátu, tedy reakci katalyzuje pouze tehdy, pokud hladina glukózy dosáhne dostatečné výše, typicky po příjmu potravy (Larion a kol. 2015). Naopak na lačno je GCK málo aktivní. K její senzorické funkci přispívá i specifická enzymová kinetika, která je kooperativní a závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci glukózy není hyperbolická, jak je tomu běžné u většiny enzymů, ale sigmoidní. Přestože se GCK chová kooperativně, jde o monomerní enzym, tento paradox byl vysvětlen teprve před několika lety na základě dynamických procesů probíhajících v milisekundových intervalech v malé katalytické doméně této molekuly (Larion a kol. 2015). Aktivita GCK se většinou udává pomocí relativního indexu aktivity (RAI) a prahu pro glukózou indukované uvolnění inzulínu (GSIR-T). RAI vychází z naměřených hodnot enzymové kinetiky, konkrétně $S_{0.5}$, Hillova koeficientu, k_{cat} a ATP K_M a slouží pro přímé porovnání aktivity GCK nesoucí jednotlivé mutace s divokým typem enzymu; rovnice pro výpočet byla publikována Matschinským (2009). Za využití tzv. minimálního matematického modelu, který reflektuje kinetické charakteristiky divoké formy GCK a mutantních forem GCK při zohlednění koeficientu stability a po adaptaci na koeficient exprese lze predikovat práh beta buněk pro uvolnění inzulínu pomocí proměnné GSIR-T. Výpočet GSIR-T předpokládá naplnění řady konsenzuálně stanovených předpokladů pro to, aby výsledek byl věrohodný (Davis a kol. 1999; Matschinsky &

Magnuson 2000). Následkem kompenzace heterozygotně se manifestujících mutací v *GCK*-MODY prostřednictvím exprese druhé (zdravé) alely v *GCK*-MODY nedochází k dramatickému zvýšení lačné glykémie a i nejzávažnější mutace se manifestují lačnými glykémiemi jen do úrovně lehce přesahující 7 mM glukózu v séru.

Zatímco stanovení příčin diabetu u *GCK*-MODY je u většiny mutací v GCK snadno srozumitelnou záležitostí, opak je pravdou u diabetu způsobeného mutacemi v transkripčních faktorech. Jak popisujeme v námi publikovaném review [příloha 6], HNF jsou skupinou fylogeneticky nepříbuzných transkripčních faktorů. HNF-1α, jemu strukturálně podobný 1β (HNF-1β), HNF-4α, 3α (HNF-3α – FOXA1 (z anglického *forkhead box A1*)), 3β (HNF-3β – FOXA2 (z anglického *forkhead box A2*)) a 3γ (FOXA3 (z anglického *forkhead box A3*)) představují tkáňově specifické, vzájemně kooperující transkripční faktory, které regulují především správný embryonální vývoj a postnatálně se podílejí na zachování metabolické homeostázy. HNF-1α je exprimován zejména v hepatocytech, slinivce břišní (endokrinním i exokrinním parenchymu), proximálních renálních tubulech a gastrointestinálním traktu (tenkém střevě a žaludku). Podobně HNF-4α je exprimován především v játrech, beta buňkách a jiných částech ostrůvků, proximálním renálním tubulu a gastrointestinálním traktu (Yamagata 2003; Gonzalez 2008). Transkripce řízená prostřednictvím HNF se liší nejen v jednotlivých tkáních, ale též v různých fázích ontogeneze (Pearson a kol. 2004; Servitja & Ferrer 2004). HNF-1α je aktivován je v době hepatální, pankreatické, renální a intestinální organogeneze, tedy v poměrně pokročilém stupni buněčné diferenciace (Cereghini 1996). Naopak, HNF-4α hraje klíčovou roli již v brzkém embryonálním vývoji a časné organogenezi (Hayhurst a kol. 2001), kdy zodpovídá za normální funkci viscerálního endodermu a následně za strukturální a funkční diferenciaci hepatocytů (Chen a kol. 1994; Li a kol. 2000) a střevních buněk (Boyd a kol. 2009). V tkáních dospělých jedinců, zejména v játrech, se významně uplatňuje v řízení metabolických pochodů, kde zajišťují transkripci stovek genů zahrnujících enzymy podílející se na glykolýze a glukoneogenezi, metabolismu mastných kyselin, syntéze apolipoproteinů, žlučových kyselin, plasmatických bílkovin, ureagenezi a transportéry a enzymy podílející se na lékovém metabolismu (Stoffel & Duncan 1997; Odom a kol. 2004; Gonzalez 2008; Walesky & Apte 2015). Je považován za ústřední regulátor genové exprese v játrech (Walesky & Apte 2015), přičemž mezi HNF-4α a HNF-1α existuje zpětnovazebná regulační smyčka (Ferrer 2002). Regulace enzymů podílejících se na lékovém metabolismu je důležitá i z pohledu pacientů s MODY, jednou ze skupin genů, jejichž transkripci HNF-4α reguluje, jsou monooxygenázy cytochromového systému P450 (*CYP*), zejména pak *CYP2A6* a *CYP3A4* (Watt a kol. 2003; Kamiyama a kol. 2007; Gonzalez 2008; Hwang-Verslues & Sladek 2010). Následkem regulace exprese monooxygenáz dochází k ovlivnění odbourávání derivátů sulfonylurey. Výše uvedené bylo zjištěno na myším modelu *Hnf1a*-MODY (Boileau a kol. 2002), nicméně nepodařilo se nám následně prokázat přítomnost shodného způsobu regulace u lidských pacientů s *HNF4A*-MODY a *HNF1A*-MODY [příloha 7]. V beta buňkách slinivky břišní jsou oba faktory významné pro transport a intracelulární metabolismus glukózy, sekreci inzulinu a buněčný cyklus (Stoffel & Duncan 1997; Wang a kol. 2000; Fajans a kol. 2001; Wobser a kol. 2002). HNF-1α reguluje apoptózu a proliferaci beta buněk; knock-out, popřípadě exprese dominantně negativní mutace *Hnf1a*, vede ke snížení rychlosti proliferace beta buněk a snižuje rezistenci k apoptóze (Pontoglio a kol. 1998; Hagenfeldt-Johansson a kol. 2001; Wobser a kol. 2002, 2006; Bonner a kol. 2010). V beta buňkách slinivky břišní HNF-1α aktivuje vazbou na promotorové regiony glukózový transportér 2 (*GLUT2*) a pyruvát kinázu typu L (*PKL*), což je enzym limitující rychlost glykolýzy. Reguluje též mitochondriální enzymy a organizaci samotných ostrůvků slinivky břišní prostřednictvím regulace exprese E-cadherinu (Booβ-Bavnbek a kol. 2011). Pro metabolismus glukózy má význam i exprese HNF-1α v ledvinách, kde reguluje expresi sodíko-glukózového transportéru 2 (SGLT2) podílejícího se na reabsorpci glukózy a některých dalších metabolitů (Pontoglio a kol. 2000). Nefunkčnost HNF-1α či HNF-4α není slučitelná se životem (Ellard & Colclough 2006), heterozygotní mutace jsou asociovány se vznikem MODY (jak již bylo uvedeno výše). K diabetu se u heterozygotů přidává často snížení renálního prahu pro glukózu (glykosurie), selektivní aminoacidurie, u některých mutací i jaterní adenomatóza (Bluteau a kol. 2002; Reznik a kol. 2004), u heterozygotů v *HNF4A* se přidává i snížení HDL cholesterolu a apolipoproteinů ApoAII a ApoCIII (Yamagata a kol. 1996; Shih a kol. 2000). HNF působí vesměs ve formě dimérů, u heterozygotů se projevuje jak haploinsuficience, tedy ztráta funkce jedné alely, tak dominantně negativní efekty, tedy narušení funkce paralelně exprimovaného divokého typu proteinu (Yamagata a kol. 1998; Vaxillaire a kol. 1999; Wang a kol. 2000; Ryffel 2001), přičemž haploinsuficience nad

dominantně negativními efekty u většiny dosud testovaných mutací převažuje (Stoffel & Duncan 1997; Shih a kol. 2000). V beta buňkách heterozygotní mutace v *HNF1A* či *HNF4A* zřejmě narušuje zpětnovazebnou regulační smyčku mezi těmito dvěma geny, což následně vede k poklesu aktivity všech čtyř alel těchto dvou genů (Ferrer 2002); v jiných tkáních k výše uvedené deregulaci zpětnovazebné smyčky nedochází a roli *HNF1A* či *HNF4A* (Fajans a kol. 2001) zřejmě přebírají jiné transkripční faktory. Účinek mutací v *HNF1A* či *HNF4A* na pokles syntézy inzulínu beta buňkou je velmi komplexní a zahrnuje snížení přívodu glukózy do bet buňky, poruchu glykolýzy a oxidační fosforylace s následkem nedostatečné produkce ATP a neschopností otevření draslíkových kanálů, pokles obsahu vápníku a tím i sníženou schopnost degranulace inzulínových granulí, sníženou syntézu inzulínu podmíněnou nedostatečnou expresí inzulínového genu, převahu apoptózy nad proliferací a tím postupný úbytek masy beta buněk a snížení adaptivní reakce na hyperglykémii prostřednictvím hyperplázie a hypertrofie (Wang a kol. 2000; Servitja & Ferrer 2004) [příloha 6].

4. CÍLE

Obecným cílem předkládané habilitační práce bylo přispět k objasnění vybraných aspektů molekulární patologie diabetu. Protože předkládaná práce je souborem samostatně publikovaných příspěvků, jednotlivé cíle na sebe navazují spíše volnějším způsobem a týkají se tří tematických oblastí – a) objasnění role mutací v GCK a predikce fenotypu jejich, jakožto i mutací dalších genů, které vedou ke vzniku mendelistických chorob, b) asociační studie prevalence polymorfismů ve fosfatáze *PTPN22* s méně prozkoumanými typy diabetu a některými klinickými charakteristikami pacientů, a c) zpřesnění informací o expresi autoprotilátek proti antigenům beta buněk u pacientů s diabetem, včetně pacientů s jinými než autoimunitními typy diabetu. Cíle jednotlivých samostatně publikovaných příspěvků jsou vypsány níže.

4.1 Přehled faktorů vedoucích k poškození a destrukci beta buněk [příloha 1]

Cíl prvního příspěvku v pořadí byl edukační a spočíval v sestavení přehledné práce, určené českým diabetologům, o faktorech, které potenciálně nebo reálně vedou k dysfunkci a posléze k poškození a buněčné smrti beta buněk slinivky břišní. Stupeň tohoto poznání dává naději na možnosti mnohem širší a současně cílenější prevence diabetu, zejména diabetu 2. typu.

4.2 Analýza enzymové kinetiky a predikce funkce mutací asociovaných s GCK-MODY [příloha 2]

Cílem bylo připravit robustní důkazy umožňující volbu nejlepší z dostupných metod a jejich nastavení založené na důkazech za účelem predikce efektů záměnových nesynonymních mutací v GCK. Jedná se o první studii, která srovnává výstupy predikčních metod s výsledky *in vitro* měření publikovaných v minulosti či v rámci předkládané práce a s klinickou informací o pacientech nesoucích předmětné mutace. Cílem návrhu nastavení metod založeného na důkazech bylo vyřešení problémů s naprosto zanedbatelnou specificitou všech dříve arbitrárně navržených nastavení těchto prediktorů při predikci efektů mutací v GCK. Cílem zároveň bylo umožnění dostatečně specifických a senzitivních predikcí efektů mutací v GCK, které dosud nebyly v klinické praxi zaznamenány a pro něž neexistují ani *in vitro* data.

4.3 Změna obecného nastavení predikčních algoritmů pro předpověď klinické manifestace fenotypů záměnových mutací [příloha 3]

Cílem příspěvku bylo ověření hypotézy tvrdící, že spolehlivost predikčních metod může být zvýšena změnou nastavení z arbitrárního na nastavení založená na důkazech a ověření tohoto konceptu prostřednictvím přípravy a validace modelu tohoto přístupu pro geny asociované s mendelistickými onemocněními (např. *HNF4A*). Zaměřili jsme se na záměnové mutace, které jsou asociovány s mendelistickými onemocněními a porovnali jsme je s mutacemi v identických genech, které však k manifestaci předmětných onemocnění nevedou. Za pomocí tohoto přístupu založeného na důkazech bylo naším cílem nastavit jednotlivé predikční metody tak, aby došlo k významnému zvýšení specificity predikce mutací způsobujících jednotlivá onemocnění u mutací identifikovaných nově v průběhu genomických a proteomických experimentů.

4.4 Přehled stávajících poznatků o redox regulaci hexokináz [příloha 4]

V rámci extenze našeho výzkumu do oblasti redox signalizace bylo v rámci tohoto příspěvku naším cílem připravit přehlednou práci o modulaci a časoprostorové lokalizaci regulace aktivity hexokináz prostřednictvím reaktivních forem kyslíku a dusíku a plynnými signálními molekulami. Význam redox regulace hexokináz je v základním výzkumu i klinické praxi stále ještě nedoceněn. Vzhledem k tomu, že jde o klíčové enzymy zodpovídající za první reakci glykolýzy a zároveň dozírající na řadu dalších buněčných procesů, včetně regulace redox signalizace mitochondrií, jde o téma, které jistě v blízké budoucnosti bude nabývat na významu.

4.5 Enzymová kinetika a stabilita somatických s nádory asociovaných záměnových mutací v GCK [příloha 5]

Před vypracováním této studie nebylo zřejmé, zda somatické s nádory asociované mutace v GCK jsou povahy řídící nebo pasažérské a zda mají roli v nástupu a progresi zhoubného bujení. V extenzi ostatních našich experimentů s GCK jsme postulovali hypotézu tvrdící, že somatické s nádory asociované mutace v GCK zahrnují z části takové, které mají aktivující efekt na enzymovou kinetiku GCK nebo které zvyšují stabilitu GCK. Naším cílem bylo jednak přinést důkazy o případné přítomnosti aktivačních mutací v rámci dosud známých somatických s nádory asociovaných mutací v GCK prostřednictvím analýzy jejich enzymové kinetiky a proteinové stability.

4.6 Přehled HNF ve vztahu k diabetes mellitus [příloha 6]

Cíl šestého příspěvku v pořadí byl edukační a spočíval v sestavení přehledné práce určené českým diabetologům, která se zabývá významem HNF pro porozumění etiologie diabetu a patofyziologie dysfunkce beta buňky u MODY a diabetes mellitus 2. typu. Objev role HNF umožnil individualizovat léčbu pacientů s MODY a zřejmě v budoucnu přispěje i k přesnější klasifikaci podtypů diabetes mellitus 2. typu.

4.7 Kinetika derivátů sulfonylurey u pacientů s MODY [příloha 7]

Před vypracováním tohoto příspěvku nebylo zřejmé, zda pozorované efekty derivátů sulfonylurey u pacientů s MODY jsou způsobeny delším poločasem rozpadu derivátů sulfonylurey u těchto pacientů, jak by tomu nasvědčovaly výsledky z myšího modelu, anebo zda je zmíněná změna farmakokinetiky charakteristickou pouze pro hlodavce či jiná zvířata. Postulovali jsme proto hypotézu tvrdící, že terapeutický potenciál derivátů sulfonylurey u pacientů s *HNF1A*-MODY nebo *HNF4A*-MODY vychází ze snížené clearance léčiva. Za účelem ověření této hypotézy jsme analyzovali farmakokinetiku a farmakodynamiku dvou široce rozšířených derivátů sulfonylurey, glibenklamidu/glyburidu a glipizidu u pacientů s *HNF1A*-MODY nebo *HNF4A*-MODY a kontrolní skupiny osob bez diabetu.

4.8 První pozorování autoprotilátek proti antigenům beta buněk u rodiny pacientů s MODY [příloha 8]

Cílem této kazuistiky byl popis první rodiny pacientů s MODY, u níž jsme zaznamenali vícečetný výskyt autoprotilátek proti antigenům beta buněk.

4.9 Funkční relevance přítomnosti autoprotilátek proti antigenům beta buněk u pacientů s MODY [příloha 9]

V rámci této studie jsme popsali prevalenci autoprotilátek proti antigenům beta buněk u českých pacientů s MODY a následně jsme postulovali a testovali hypotézu tvrdící, že přítomnost protilátek u pacientů s MODY může být asociována s odlišnostmi v nástupu a progresi nemoci.

4.10 Stanovení protilátek proti zinkovému transportéru u pacientů s LADA a MODY [příloha 10]

Cílem studie byla analýza prevalence ZnTA u pacientů s diabetes mellitus s progresí k inzulinoterapii podobným fenotypu LADA, kteří byli pozitivní na autoprotilátky GADA a/nebo IA-2A (pacienti s LADA) anebo negativní na tyto protilátky a s vysokým C-peptidem (pacienti s diabetes mellitus 2. typu závislí na inzulínu). Naším cílem bylo zjistit, zda variabilita v titrech ZnTA je asociována s odlišnostmi v klinickém fenotypu LADA. Postulovali a testovali jsme hypotézu, že ZnTA mohou být prognostickým markerem umožňujícím odlišení autoimunitních typů diabetu od MODY v podmínkách střední a východní Evropy, kde přibližně čtvrtina pacientů s MODY je pozitivní na GADA a/nebo IA-2A [příloha 9]. Postulovali a testovali jsme zároveň hypotézu předpokládající, že prevalence a titry ZnTA jsou regulovány funkčními polymorfismy ve fosfatáze Lyp, jak vyplývá z předchozích analýz u pacientů s diabetes mellitus 1. typu (Capasso a kol. 2013).

4.11 Stanovení frekvence funkčních polymorfismů v PTPN22 u pacientů s MODY [příloha 11]

Cílem studie byla analýza funkčních polymorfismů v *PTPN22*, enzymu s jednou z největších známých variabilit mezi jednotlivými populacemi a etniky. Zmíněné polymorfismy ovlivňují nástup autoimunitních onemocnění, zejména diabetes mellitus 1. typu [příloha 11, tab. 1]. Postulovali a testovali jsme hypotézu tvrdící, že exprese autoprotilátek proti antigenům beta buněk u pacientů s MODY by mohla být asociována s přítomností specifických jednonukleotidových polymorfismů v *PTPN22*, které ovlivňují aktivitu a protein-proteinové interakce fosfatázy Lyp. Za účelem ověření zmíněné hypotézy jsme testovali alelické frekvence polymorfismů v *PTPN22* u pacientů s MODY ze čtyř geografických oblastí, z České republiky, Izraele, Japonska a Brazílie a analyzovali jsme vazby mezi expresí autoprotilátek u pacientů s MODY a rizikovými jednonukleotidovými polymorfismy v *PTPN22*.

4.12 Stanovení frekvence funkčních polymorfismů v PTPN22 u pacientů s LADA [příloha 12]

Před vypracováním tohoto příspěvku nebylo zřejmé, zda a do jaké míry polymorfismy v *PTPN22* přispívají k nástupu a klinickému obrazu LADA. Postulovali a testovali jsme hypotézy tvrdící, že a) LADA se chová jako hybridní forma diabetu s ohledem na jednonukleotidové polymorfismy v *PTPN22* (Grant a kol. 2010; Tuomi a kol. 2014). b) Osoby nesoucí rizikové jednonukleotidové polymorfismy v *PTPN22* manifestují LADA ve srovnání s obecnou populací častěji, což vyplývá z asociace jednonukleotidových polymorfismů v *PTPN22* s mnoha autoimunitními onemocněními [příloha 11, tab. 1]. c) Asociace jednonukleotidových polymorfismů v *PTPN22* s LADA a diabetes mellitus 2. typu s progresí k inzulinoterapii podobnou LADA se u jednotlivých pohlaví liší obdobně, jako bylo dříve publikováno pro pacienty s diabetes mellitus 1. typu (Kahles a kol. 2005; Fedetz a kol. 2006; Nielsen a kol. 2007, ale srov. Cinek a kol. 2007; Blasetti a kol. 2017). d) Rizikové jednonukleotidové polymorfismy v *PTPN22* jsou asociovány se zvýšenými sérovými hladinami autoprotilátek GADA a IA-2A u českých pacientů s LADA a s diabetes mellitus 2. typu s progresí k inzulinoterapii podobnou LADA, tedy podobně jako bylo dříve publikováno pro asociaci c.1858T se sérovými hladinami autoprotilátek proti antigenům beta buněk u pacientů s diabetes mellitus 1. typu (Hermann a kol. 2006; Maziarz a kol. 2010; Andersen a kol. 2012) a s vysokými sérovými titry GADA u pacientů s LADA (Petrone a kol. 2008).

5. MATERIÁL A METODIKA

5.1 Analýza enzymové kinetiky mutací asociovaných s GCK-MODY [příloha 2]

Připravili jsme sérii konstruktů GCK, které nesou dříve publikované (Pruhova a kol. 2003; Pinterova a kol. 2007; Lukášová a kol. 2008; Průhová a kol. 2010; Valentínová a kol. 2012; [příloha 9]) záměnové mutace asociované s fenotypem *GCK*-MODY u pacientů českého původu. Navíc jsme připravili konstrukty nesoucí experimentální záměnové mutace R63S, M251C a F260L. Pro tvorbu konstruktů jsme využili divoký typ lidské GCK izoformy 1, který byl vložen ve vektoru pGEX-5X-2 laskavě poskytnutým M. A. Navas (García-Herrero a kol. 2007). Jednotlivé mutace jsme zavedli pomocí cílené mutageneze.

Aktivitu GCK jsme měřili spektrofotometricky za použití reakce spřažené s glukóza-6-fosfát dehydrogenázou. Rostoucí koncentrace NADPH jsme identifikovali při 340 nm dle standardní metodiky (Davis a kol. 1999). Vyhodnocovali jsme kinetické parametry včetně Hillova koeficientu, k_{cat}, $S_{0,5}$, ATP K_M, stability proteinu, RAI a GSIR-T dle standardní metodiky (Davis a kol. 1995; Matschinsky & Magnuson 2000; Matschinsky a kol. 2009). Pro každou exprimovanou variantu jsme také provedli test kompetitivní inhibice za použití *N*-acetylglukosaminu (GlcNAc) a vypočítali IC_{50} za přítomnosti 5 mM glukózy a 5 mM ATP.

5.2 Predikce funkce mutací asociovaných s GCK-MODY [příloha 2]

Pro predikci funkce záměnových mutací v GCK asociovaných s *GCK*-MODY jsme užili devět predikčních metod. Zvolené metody využívaly jednak informace o evoluci sekvence GCK (SIFT, PhD-SNP), fyzikální a chemické vlastnosti aminokyselin GCK (Align-GVGD), strukturní atributy kombinované s výstupy ze srovnání příbuzných sekvencí (EVmutation, PolyPhen-2, SNAP2 a SNPs&GO) a změnu Gibbsovy volné energie následkem nesynonymních substitucí, tedy metody reflektující změny ve stabilitě proteinu (I-Mutant 3.0 a PoPMuSiC 2.1). Již zmíněný prediktor EVmutation je navíc prvním, který využívá epistáze, tedy modeluje vliv interakcí mezi mutovanou aminokyselinou a aminokyselinami sousedními (Hopf a kol. 2017). Za účelem provedení těchto predikcí jsme připravili aktualizovaný kompletní přehled nesynonymních substitucí dosud u člověka zaznamenaných, včetně všech záměnových mutací asociovaných s *GCK*-MODY, s perzistentní hyperinzulinemickou hypoglykémií a těch, které nejsou spojovány s žádným mendelisticky dědičným onemocněním. Kromě dat z literatury jsme čerpali i z databází Ensembl, dbSNP (z anglického *Database for Single Nucleotide Polymorphisms and Other Classes of Minor Genetic Variation*), UniProtKB (z anglického *The Universal Protein Resource Knowledgebase*) a HGMD (z anglického *The Human Gene Mutation Database*). Dále jsme predikce srovnali s experimentálními daty naměřenými jednak v průběhu této studie (viz kapitola 5.1) a s experimentálními daty ze studií předchozích.

5.3 Změna obecného nastavení predikčních algoritmů pro předpověď klinické manifestace fenotypů záměnových mutací [příloha 3]

Sestavili jsme dvě databáze záměnových mutací v genech kódujících proteiny asociované s mendelistickými onemocněními. Jednu z databází jsme použili pro tvorbu modelu, druhou pro validaci modelu. Při tvorbě modelu jsme rozpoznávali tři kategorie mutací: a) „Mutace asociované s nemocemi“ reprezentovaly ty mutace, pro které byla dostupné důkazy o jejich vztahu s mendelistickými onemocněními. b) „Mutace asociované s částečným fenotypem“ reprezentovaly ty mutace, pro něž jsou dostupné důkazy o asociaci s částečným (nekompletně se manifestujícím) fenotypem týchž nemocí jako v kategorii *a*. c) Za „mutace neasociované s fenotypem“ jsme považovali takové, pro jejichž nosiče byla dostupná evidence nepřítomnosti manifestace nemoci. Efekt mutací jsme predikovali pomocí prediktorů EVmutation (Hopf a kol. 2017), který je založen na epistatickém modelu, SNAP2 (Hecht a kol. 2015), který je založen na spektru biofyzikálních charakteristik proteinu a PoPMuSiC 2.1 (Dehouck a kol. 2011), který predikuje termostabilitu proteinu. Kromě mutací, které byly u lidí zaznamenány, jsme vypočetli a analyzovali predikce pro varianty, které jsme označili jako „teoretické“, tedy takové, které nebyly dosud nikdy v klinické praxi pozorovány, ale jejichž výskyt je

možný. Analyzované mutace jsme setřídili a) podle jejich lokalizace do proteinových domén, popřípadě mimo ně, b) dle přítomnosti a druhu enzymatické aktivity proteinu, c) dle počtu nukleotidových záměn nutných pro dosažení dané mutace a d) dle klasifikačních kritérií *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (Nykamp a kol. 2017). Dále jsme využili přístup zvaný *Grantham variation* (GV), který umožňuje analyzovat srovnání aminokyselinových sekvencí zkoumaných lidských proteinů a jejich savčích ortologů (Mathe a kol. 2006). GV umožňuje kvantifikovat evoluční konzervovanost každé ze zkoumaných aminokyselin v rámci srovnání sekvencí. Srovnání sekvencí jsme sestavili na základě implementace paradigmatu asociovaného s variantami nejasného významu (VUS, z anglického *variants of uncertain significance*), který předpokládá, že předmětná mutace je VUS pokud u ní dochází k záměně aminokyselinového zbytku, který je v korespondujících sekvencích identického proteinu u ostatních druhů savců evolučně konzervován (Richards a kol. 2015). Na příkladu dvou silně evolučně konzervovaných genů, *AR* (z anglického *androgen receptor*) a *PTEN* (z anglického *phosphatase and tensin homolog*), jsme dále testovali, zda přidání evolučně vzdálenějších sekvencí a výsledná variabilita vede ke zlepšení adherence GV skóre s reálnou asociací jednotlivých analyzovaných mutací s jimi způsobovanými nemocemi. Metody maximální pravděpodobnosti (ML, z anglického *maximum likelihood*) jsme využili k odhadu evoluční divergence v aminokyselinových sekvencích proteinů AR a PTEN u vybraných taxonomických skupin.

5.4 Enzymová kinetika a stabilita somatických s nádory asociovaných záměnových mutací v GCK [příloha 5]

V této části habilitační práce jsme využili zkušeností nově nabytých při práci na metodikách v kapitolách 5.1 až 5.3 a aplikovali jsme je na somatické, s nádory asociované, záměnové mutace v GCK dle databáze somatických s nádory asociovaných mutací (COSMIC, z anglického *Catalogue of somatic mutations in cancer*). V době vypracovávání této části práce, 5. června 2017, se v databázi COSMIC v81 nacházelo 106 případů s 88 neredundantními nesynonymními záměnovými mutacemi v GCK. Na tyto mutace jsme aplikovali predikce jejich funkce pomocí metod EVmutation (Hopf a kol. 2017) a SNAP2 (Hecht a kol. 2015), s parametry nastavenými dle našich recentních výzkumů (viz kapitol 5.2). Skóre dle prediktoru EVmutation byla nedostupná pro čtyři z předmětných 88 mutací, proto jsme je z dalších analýz vyřadili. Pro testování enzymové kinetiky jsme vybrali takové mutace, které vykazovali EVmutation skóre > 2.39 a SNAP skóre <-50. Předpokládali jsme, že tato skóre umožní vysoce specifickou selekci mutací asociovaných s aktivujícími nebo alespoň neutrálními fenotypy. Za užití tohoto přístupu jsme vybrali 11 mutací (p.24Q>H, p.27E>K, p.104K>E, p.138Q>H, p.156H>Q, p.157E>K, p.312E>K, p.338V>L, p.345R>H, p.358R>P a p.433S>N). Tyto jsme doplnili šesti somatickými s nádory asociovanými mutacemi, které jsou přítomny ve spojovací smyčce I, která participuje ve vazbě alosterických aktivátorů a zahrnuje aminokyselinové zbytky 64 až 72 (Matschinsky a kol. 2006; Martinez a kol. 2014; Whittington a kol. 2015). Šlo konkrétně o mutace p.63R>C, p.63R>H, p.64S>F, p.65T>I, p.66P>S a p.68G>S. Kromě výše uvedených jsme ještě analyzovali somatickou s nádory asociovanou mutací p.106Q>H. Každou z výše uvedených mutací jsme pomocí cílené mutageneze vložili do vektoru nesoucího divokou formu GCK a analyzovali enzymovou kinetiku identicky s postupem popsaným v kapitole 5.1. Dále jsme měřili termostabilitu těchto mutací při 30 °C, 37 °C, 42 °C a 45 °C během 100 minut trvající inkubace při indikovaných teplotách a při ředění 100 μg mL^{-1}, za přítomnosti 50 mM glukózy a 5 mM ATP.

5.5 Kinetika derivátů sulfonylurey u pacientů s MODY [příloha 7]

Za účelem stanovení kinetiky derivátů sulfonylurey, glipizidu a glibenklamidu, jsme rekrutovali 13 pacientů a kontrolních osob ve věku 15 až 61 let. Šest pacientů mělo diagnostikován *HNF1A*-MODY, jeden pacient *HNF4A*-MODY a skupinu tvořilo zároveň šest kontrolních osob bez zárodečných mutací v *HNF1A* a *HNF4A*. Ze studie byly vyloučeny osoby, které netolerují deriváty sulfonylurey nebo jsou na ně alergické, s historií těžkých hypoglykémií, poruchami funkce jater či ledvin, gastrointestinálními onemocněními a aktivními či vyléčenými nádorovými onemocněními. Vyloučeny též byly osoby, které užívají léky, které by potenciálně mohly interferovat s předpokládanými metabolickými dráhami degradace derivátů sulfonylurey, a které by

nemohly být dočasně vysazeny, dále pak pacienti s historií opakovaných mírných hypoglykémií.

U pacientů zahrnutých do studie byly deriváty sulfonylurey vysazeny 48 hodin před zahájením administrace glipizidu a glibenklamidu, bazální inzulín byl vysazen 29 hodin před administrací glipizidu a glibenclamidu, bolusové dávky nebyly během pokusu podávány. U dvou pacientů byl rovněž vysazen levothyroxin 48 hodin před podáním derivátů sulfonylurey pro možnou interakci s *CYP2C9*. Studie zahrnovala sekvenční podávání glipizidu a glibenklamidu s minimálním intervalem mezi jejich podáním v délce sedmi dnů (pro vymytí předchozí dávky). Glipizid (3 mg tablety) nebo glibenklamid (5 mg tablety) byly podány ústně v 7 hodin ráno, tedy po nejméně osmi hodinách po které byli pacienti (přes noc) na lačno. Každé pokusné osobě bylo podáno 250 mL pitné vody pro usnadnění polknutí tablety; následně se pacienti stravovali a pili dle standardizovaného plánu [příloha 7, tab. S2].

Plasmatické koncentrace glipizidu a glibenklamidu jsme hodnotili sekvenčně v čase t = 0, 1, 2, 3, 5, 8, 12 a 24 h po aplikaci léčiva. V indikovaných časech jsme odebrali 8 mL periferní žilní krve pomocí kanyly Vasofix do zkumavky s Li-heparinem. Zkumavku jsme během 30 minut po odebrání stočili 12 minut 2000 ×*g* při pokojové teplotě, plasmu převedli do dvou sterilních zkumavek a zamrazili do analýzy. Analýzu obsahu glipizidu a glibenklamidu jsme provedli pomocí tandemové HPLC-MS (z anglického *high performance liquid chromatography – mass spectrometry*) validované dle standardních operačních postupů a dle mezinárodních kritérií správné laboratorní praxe [příloha 7, Appendix 1]. Detekční limit metody byl 20–2000 (4,89–2990) ng mL^{-1} pro glipizid a 5–750 (1,25–764) ng mL^{-1} pro glibenklamid. Detekce byla prováděna externími spolupracovníky; laboratoř byla certifikována SÚKL. Přesnost detekce byla ±15%. Během analýz jsme stanovili čas do maximální koncentrace v plasmě (t_{max}), maximální plasmatickou koncentraci (c_{max}), poločas ($t_{1/2}$), plochu pod křivkou (AUC_{0-t}) a celkovou extrapolovanou oblast pod křivkou (AUC0-oo). C_{max} a t_{max} jsme přímo odvodili z naměřených dat, ostatní hodnoty jsme vypočetli, clearance plasmy jsme vypočetli jako podanou dávku AUC_{0-oo}^{-1}. Protože ústní aplikace léčiva vylučuje kalkulaci absorbované dávky, vydělili jsme vypočtené hodnoty clearance frakcí absorbované dávky.

Pro vyhodnocení farmakodynamických parametrů jsme měřili glykémii, plasmatický C-peptid a plasmatický inzulín. Tato měření jsme prováděli sekvenčně v šedesátiminutových intervalech od t = 0 h do t = 12 h a následně 24 h po podání léčiva. V indikovaných časech jsme odebrali 8 mL periferní žilní krve za použití kanyly Vasofix, plasmatickou glykémii jsme stanovili pomocí spřažené enzymatické reakce glukóza oxidázy (fotometrická detekce) a peroxidázy (elektrometrická detekce). Za normální rozmezí jsme považovali 3,6–5,59 mmol/L (Kirchheiner a kol. 2005), práh detekce 0,11–41,6 mmol/L. Sérový C-peptid a inzulín jsme měřili pomocí chemiluminiscence za použití ADVIA Centaur XP systému. Za normální rozmezí jsme považovali 268–1274 pmol/L a 3–25 mIU/L, přičemž hodnoty prahu detekce byly 16,55–9930 pmol/L a 0,5–300 mIU/L.

Pro vyhodnocení farmakogenetických parametrů jsme vyhodnocovali polymorfismy v genu *CYP2C9*. Konkrétně se nám jednalo o ty, které způsobují aminokyselinové záměny p.144R>C (*2) a p.359I>L (*3), které způsobují sníženou enzymatickou aktivitu *CYP2C9*. Přítomnost genotypu *CYP2C9*3* (*CYP2C9*3/*3* nebo *2/*3) je považována za rizikový faktor silné hypoglykémie po podání derivátů sulfonylurey. U heterozygotů klesá clearance derivátů sulfonylurey (tolbutamid, glibenklamid, glimepirid, či glipizid) na 50 až 80%, u homozygotů pak až na 20% ve srovnání s jedinci nesoucími divoký typ *CYP2C9*1/*1* (Kirchheiner a kol. 2005). Testy jsme provedli pomocí polymerázové řetězcové reakce (PCR) spřažené s HRM (z anglického *high resolution melting*) analýzou. Osoby zahrnuté do studie jsme dělili na osoby s rychlým (genotyp *CYP2C9*1/*1*), intermediárním (*CYP2C9*1/*2* a **1/*3*) a pomalým (*CYP2C9*2/*2*, *CYP2C9*2/*3* a *CYP2C9*3/*3*) metabolismem derivátů sulfonylurey (Kirchheiner a kol. 2002a, 2002b). Výsledná farmakokinetická a farmakodynamická data jsme následně korigovali na efekt *CYP2C9* genotypu.

5.6 První pozorování autoprotilátek proti antigenům beta buněk u rodiny pacientů s MODY [příloha 8]

Pacienty pro tuto studii jsme rekrutovali na základě následujících kritérií: rodinná anamnéza diabetu v nejméně dvou předcházejících generacích, nástup diabetu v adolescenci nebo v dospělosti, absence obezity v době diagnózy diabetu, absence ketoacidózy a zachovalá produkce inzulínu. Izolaci DNA, PCR a Sangerovo sekvenování protein-kódujících exonů a sousedních částí intronů genu *HNF1A* jsme provedli dle dříve publikovaného postupu (Bazalová a kol. 2010), sérum jsme připravili rovněž dle dříve publikovaného postupu (McDonald a kol. 2011). Expresi protilátek proti antigenům beta buněk (GADA a IA-2A) jsme detekovali v primárním séru neošetřeném $CaCl_2$ ani trombinem pomocí imunoeseje Medipan (Dahlewitz, Německo) kalibrované k referenčnímu materiálu NIBSC 97/550. Analytická senzitivita byla 0,8 IU mL^{-1} (GADA) a 0,5 IU mL^{-1} (IA-2A). Arbitrárně stanovený limit pro koncentraci považovanou za pozitivní byl 5 IU mL^{-1} (GADA) a 10 IU mL^{-1} (IA-2A). Analýzu ROC křivky (z anglického *receiver operating characteristic*) jsme použili k potvrzení senzitivity a specificity imunoesejí použitých na dvou kohortách kontrolních osob (negativní kontroly bez diabetu a pozitivní kontroly s diabetes mellitus 1. typu nebo LADA, s lačným C-peptidem <300 pmol L^{-1}, obě skupiny osob byly českého původu). Oblast pod křivkou jsme stanovili v programu JLABROC4 v 1.0.1.

5.7 Funkční relevance přítomnosti autoprotilátek proti antigenům beta buněk u pacientů s MODY [příloha 9]

Studii z kapitoly 5.6 jsme dále rozvedli za využití kohorty 28 geneticky potvrzených českých pacientů s *GCK*-, *HNF1A*- a *HNF4A*-MODY. Pacientům jsme opět stanovili hladiny protilátek GADA a IA-2A v séru, a to opakovaně v letech 2004–2013 a provedli jsme detailní anamnézu pacientů zahrnutých do studie. K datu stanovení protilátek jsme vždy zaznamenali BMI, lačný C-peptid, HbA1c (stanoveno externě na bázi HPLC) a zaznamenali způsob léčby. U všech pacientů jsme genotypizovali *HLA-DRB1* a *DQB1* dle dříve publikovaného postupu (Černá a kol. 2003).

5.8 Stanovení protilátek proti zinkovému transportéru u pacientů s LADA a MODY [příloha 10]

Za účelem stanovení ZnTA jsme rekrutovali tři kohorty pacientů a jednu kohortu kontrolní. Konkrétně šlo o 59 osob s LADA diabetem definovaným jako diabetes s nástupem po 35. roku věku, léčbou po šest nebo více měsíců od nástupu nemoci bez nutnosti aplikace inzulínu, C-peptidem na lačno >200 pmol/L nebo pozitivitou na nejméně jednu z protilátek GADA či IA-2A. Druhá kohorta se sestávala z 18 pacientů s diabetes mellitus 2. typu s progresí k inzulinoterapii podobnou průběhu LADA diabetu, rovněž s nástupem diabetu po 35. roce věku, s léčbou po šest nebo více měsíců od nástupu nemoci bez nutnosti aplikace inzulinu, ale s pozdější progresí k inzulinoterapii, C-peptidem na lačno >200 pmol/L a negativitou na GADA a IA-2A. Třetí kohorta se sestávala z 63 pacientů s MODY diabetem, z toho 14 *HNF4A*-MODY, 18 *GCK*-MODY a 31 *HNF1A*-MODY, léčbou diabetu po šest nebo více měsíců bez nutnosti aplikace inzulínu (často byl u této kohorty inzulín vysazen až po genetické diagnóze MODY) a třígenerační rodinné anamnéze diabetu. Čtvrtá kohorta se sestávala ze 70 kontrol bez manifestace diabetu a bez manifestace jiných autoimunitních endokrinních onemocnění. Všichni pacienti a kontroly byli české národnosti. ZnTA jsme stanovili pomocí ZnTA ELISA kitu ZnT8/96 (RSR, Cardiff, UK) dle instrukcí výrobce. Na každé destičce jsme stanovili kalibrační křivku na základě ZnTA-negativních vzorků a vzorků s 10, 20, 75, 500 a 2000 U mL^{-1} ZnTA (dodáno výrobcem). Vzorky jsme měřili v duplikátech na vlnových délkách 405 nm a 450 nm. Dolní limit detekce byl 1,2 U mL^{-1}, arbirtární práh pozitivity na ZnTA byl výrobcem stanovem na 15 U mL^{-1}. Senzitivita eseje byla 72–76%, specificita eseje byla 97–99% dle studií IASP 2012, 2013 a 2015 (Anonymus 2016); variabilitu v rámci eseje jsme následně stanovili na základě našich vlastních měření. Dříve publikované prahové hodnoty byly stanoveny na základě výzkumu pacientů s diabetes mellitus 1. typu. Z tohoto důvodu jsme proto vypočetli ROC křivky na základě nově testovaných pacientů s LADA nebo MODY a srovnali je s kontrolami bez diabetu. Protilátky GADA a IA-2A jsme stanovili jako v kapitole 5.6. U pacientů jsme zaznamenávali lačný C-peptid, HbA1c, výšku a hmotnost, vypočítali jsme BMI (z anglického *body mass index*) a zaznamenali způsob léčby. U pacientů, u kterých jsme dříve stanovili polymorfismy v *PTPN22*, konkrétně rs2476601 (exon 14, c.1858C>T), rs2488457 (promotor, c.-1123G>C), rs33996649 (exon 10, c.788G>A) a rs1310182 (intron 16, c.1970-852T>C), jsme testovali, zda jejich výskyt vykazuje koincidenci s pozitivitou na ZnTA.

5.9 Stanovení frekvence funkčních polymorfismů v PTPN22 u pacientů s MODY [příloha 11]

Za účelem stanovení frekvence funkčních polymorfismů v *PTPN22* jsme rekrutovali 212 českých pacientů s MODY, u kterých byla diagnóza geneticky potvrzena poté, co byli referováni na základě vícegenerační historie diabetes mellitus, nástupu diabetu u neobézních adolescentů nebo v dospělosti, absence ketoacidózy a zachovalé produkce inzulínu nebo, v případě suspektního *GCK*-MODY, setrvalé mírné hyperglykemie s jen mírnými vzestupy při OGTT. Z těchto pacientů mělo 17 *HNF4A*-MODY, 18 *GCK*-MODY, 35 *HNF1A*-MODY a zbývajících 142 pacientů bylo považováno za MODYx pacienty, tedy pacienty negativní na mutace asociované s MODY a přítomné v exonech a sousedních intronických regionech tří výše zmíněných MODY genů. Dále jsme do studie zahrnuli kohortu 14 pacientů s MODY izraelského původu, z nichž jeden měl *GCK*-MODY a 13 mělo *HNF1A*-MODY. Třetí kohortu tvořilo 43 pacientů s MODY japonského původu, přičemž tři z nich měli *HNF4A*-MODY, 21 mělo *GCK*-MODY, 11 mělo *HNF1A*-MODY, sedm mělo *HNF1B*-MODY a jeden měl *PAX4*-MODY. Všichni japonští pacienti kromě jednoho byli testováni jako negativní na autoprotilátky proti antigenům beta buněk. Čtvrtá kohorta se sestávala ze sedmi pacientů s MODYx brazilského původu. Izolovanou DNA jsme testovali na čtyři jednonukleotidové polymorfismy v *PTPN22*, u kterých byla dříve zjištěna asociace s autoimunitními onemocněními u populací evropského či východoasijského původu. Konkrétně se jednalo o rs2476601 (exon 14, c.1858C>T), rs2488457 (promoter, c.-1123G>C), rs33996649 (exon 10, c.788G>A) a rs1310182 (intron 16, c.1970-852T>C). Polymorfismus c.1858C>T je typický pro populace evropského původu. Tento polymorfismus narušuje interakci C-koncového polyprolinového regionu fosfatázy Lyp s SH3 (z anglického *Src homology 3 domain*) doménou kinázy CSK (z anglického *C-terminal Src kinase*; Bottini a kol. 2004) a zkracuje její poločas rozpadu. Nicméně pokud je exprimován v alternativním dominantně negativním transkriptu zvaném *PTPN22.6*, způsobuje hyperaktivaci T-buněk (Chang a kol. 2012). Polymorfismus c.-1123G>C se typicky početněji vyskytuje u asijských populací. Nachází se uprostřed vazebného místa pro AP-4 (z anglického *activating protein-4*) a pravděpodobně ovlivňuje transkripci tohoto genu (Jüliger a kol. 2003; Zheng a kol. 2012). Polymorfismus c.788G>A snižuje fosfatázovou aktivitu Lyp a v T-buňkách se chová jako varianta se ztrátou funkce (Liu a kol. 2012b), pravděpodobně má protektivní roli proti autoimunitním onemocněním (Orrú a kol. 2009). V Evropě se vyskytuje zhruba u dvou až tří procent osob, u zdravých osob asijského původu se nevyskytuje vůbec. Polymorfismus c.1970-852T>C je málo prozkoumán, byly u něj provedeny jen asociační studie s některými autoimunitními onemocněními, přičemž je asociován i s diabetes mellitus 1. typu (Carlton a kol. 2005; Kawasaki a kol. 2006; Viken a kol. 2007; Taniyama a kol. 2010; Brzoza a kol. 2012; Huang a kol. 2012). Všechny čtyři polymorfismy jsme testovali pomocí PCR následované analýzou RFLP (z anglického *restriction fragment length polymorphism*), přičemž výsledky dosažené pomocí RFLP jsme namátkově ověřili pomocí Sangerova sekvencování výsledných PCR produktů. Pacientům jsme opět stanovili hladiny protilátek GADA a IA-2A v séru.

5.10 Stanovení frekvence funkčních polymorfismů v PTPN22 u pacientů s LADA [příloha 12]

Za účelem stanovení frekvence funkčních polymorfismů v *PTPN22* jsme rekrutovali tři skupiny českých pacientů s diabetem. Konkrétně se jednalo o 156 pacientů s LADA diabetem definovaným jako diabetes s nástupem po 35. roku věku, léčbou po šest nebo více měsíců od nástupu nemoci bez nutnosti aplikace inzulínu, C-peptidem na lačno >200 pmol/L nebo pozitivitou na nejméně jednu z protilátek GADA či IA-2A. Druhá kohorta se sestávala ze 194 pacientů s diabetes mellitus 2. typu s progresí k inzulinoterapii podobnou průběhu LADA diabetu, rovněž s nástupem diabetu po 35. roce věku, s léčbou po šest nebo více měsíců od nástupu nemoci bez nutnosti aplikace inzulinu, ale s pozdější progresí k inzulinoterapii, C-peptidem na lačno >200 pmol/L a negativitou na GADA a IA-2A. Třetí kohorta se sestávala z 324 pacientů s diabetes mellitus 1. typu, z toho 220 pediatrických a 104 dospělých pacientů. Selekčními kritérii byly lačný C-peptid <200 pmol/L a pozitivita na GADA a/nebo IA-2A. Izolovanou DNA jsme testovali na čtyři jednonukleotidové polymorfismy v *PTPN22*, u kterých byla dříve zjištěna asociace s autoimunitními onemocněními u populací evropského či východoasijského původu. Způsob testování a vyhodnocení byl identický s kapitolou 5.9. Všechny čtyři polymorfismy jsme testovali pomocí PCR následované analýzou RFLP

(z anglického *restriction fragment length polymorphism*), přičemž výsledky dosažené pomocí RFLP jsme namátkově ověřili pomocí Sangerova sekvencování výsledných PCR produktů. Před provedením této studie byl u pacientů s LADA testován pouze c.1858C>T na estonské populaci, kde nevykázal žádnou významnější asociaci (poměr pravděpodobností (OR) = 0,9) (Kisand & Uibo 2012) a c.-1123G>C na čínských (OR 2,0) a japonských (OR 1,0) pacientech (Kawasaki a kol. 2006; Liu a kol. 2012a). Pacientům jsme opět stanovili hladiny GADA a IA-2A v séru. U pacientů jsme zaznamenávali lačný C-peptid, HbA1c, výšku a hmotnost, vypočítali jsme BMI a zaznamenali způsob léčby.

6. SOUHRN VÝSLEDKŮ

6.1 Přehled faktorů vedoucích k poškození a destrukci beta buněk [příloha 1]

V tomto přehledném edukativním článku jsme sestavili přehled faktorů vedoucích ke vzniku diabetu. U pacientů, u kterých se manifestoval diabetes mellitus, dochází po měsících až desetiletích trvání choroby k vyhasnutí sekrece inzulinu, což indikuje úbytek beta buněk Langerhansových ostrůvků. U souboru pacientů, kteří byli diagnostikováni jako pacienti s diabetes mellitus 2. typu, měla polovina z nich po 30 letech trvání choroby zachovanou nebo zvýšenou sekreci inzulinu, druhá polovina pak sekreci výrazně sníženou nebo vyhaslou. Faktory, které postihují beta buňky a vedou k jejich destrukci, můžeme shrnout do následujících skupin: a) Faktory chemické, zahrnující aa) faktory metabolické: hyperglykemie a glukotoxicita, lipotoxicita, hypoxie, volné kyslíkové radikály, ab) faktory farmakologické: antimikrobiální prostředek pentamidin, antidepresiva na bázi selektivní inhibice zpětného vychytávání serotoninu, ac) faktory spojené s poruchou sekrece inzulinu: MODY typy diabetu, a ad) toxické látky ze zevního prostředí: jed na krysy Vacor, streptozotocin, polychlorované či polybromované uhlovodíky. b) Onemocnění zevně sekretorické části slinivky břišní: nádorová infiltrace, vazivová infiltrace, chronická pankreatitida. c) Infekce, zánět a autoimunita, zahrnující faktory ca) virové: Coxsackie viry, virus chřipky H1N1, enteroviry, dále pak cb) záněty a cc) autoimunní faktory představující patogenetický faktor diabetu 1. typu.

6.2 Analýza enzymové kinetiky a predikce funkce mutací asociovaných s GCK-MODY [příloha 2]

Sestavili jsme databázi ověřených klinických fenotypů způsobených záměnovými mutacemi v GCK; celkem se jednalo o 515 mutací GCK z 1596 rodin pacientů s diabetem, 16 mutací GCK způsobujících hyperinsulinemickou hyperglykemií a 16 mutací GCK zmíněné nemoci nezpůsobujících. Zmíněnou databázi klinicky pozorovaných případů jsme doplnili o predikce 8835 záměnových mutací v GCK, které teoreticky mohou nastat. Databázi jsme následně použili k testování a zlepšení spolehlivosti a klinické použitelnosti algoritmů EVmutation, SNAP2 a PoPMuSiC 2.1. Specificita použitých nejmodernějších predikčních algoritmů je při využití pro předvídání klinických fenotypů způsobených záměnovými mutacemi v GCK velmi nízká. Nedostatečná specificita ostře kontrastuje s téměř absolutní citlivostí použitých algoritmů pro záchyt nemoci. Pro vyřešení tohoto problému jsme zavedli na důkazech založené přizpůsobení výchozího nastavení predikčních algoritmů. Toto přizpůsobení vedlo k podstatnému zlepšení specificity výsledků predikci při zachování citlivosti; specificitu predikcí se podařilo zvýšit až na 75%. Kromě výše uvedeného vedlo srovnání klinicky pozorovaných a teoretických záměnových mutací k identifikaci rozsáhlých dosud nepopsaných skupin mutací, které jsou z populace během evoluce vyřeďovány vlivem negativní selekce. Nově navrhovaný přístup založený na důkazech je první, který umožňuje vysoce specifickou identifikaci záměnových mutací v GCK, které nejsou spojeny s žádným klinickým fenotypem.

Dále jsme analyzovali enzymovou kinetiku 16 nesynonymních záměnových mutací v GCK známých z českých pacientů s MODY a enzymovou kinetiku experimentálních záměnových mutací p.63R>S, p.251M>C a p.260F>L. Pět mutací, z toho čtyři asociované s MODY (p.81G>D, p.251M>I, p.295G>D a p.385G>W) a jedna experimentální (p.251M>C), nezpůsobovaly žádné změny aktivity GCK při koncentracích glukózy až do 150 mM. Další mutace, jmenovitě p.251M>V, p.314L>P, p.316F>V, p.318G>R a p.419F>L snižovaly afinitu GCK ke glukóze, což se manifestovalo zvýšením $S_{0,5}$ při 5 mM ATP. Když jsme ale měřili identický set mutací při suboptimálních koncentracích ATP, tedy při 500 µM ATP, zvýšené $S_{0,5}$ indukovaly jen mutace, které při 5 mM ATP nevykazovaly změny aktivity; změny při 500 µM ATP jsme zaznamenali u p.150F>L, p.251M>V a p.454A>E. Hillův koeficient se u GCK nesoucí jednotlivé mutace vzájemně lišil, ale rozdíly nebyly signifikantní, když jsme jej srovnávali s divokým typem GCK. Vysoké ATP K_M jsme pozorovali u p.150F>L, kde dosahovalo čtyřnásobku hodnot naměřených u divokého typu GCK; zvýšené ATP K_M jsme pozorovali rovněž u p.454A>E a p.33V>A. Jen dvě mutace, p.33V>A a p.316F>V, neměly vliv na k_{cat}, všechny ostatní k_{cat} snižovaly. Teplotní stabilita se při 30 °C vlivem mutací neměnila. Některé mutace měly výrazný vliv na IC_{50} GlcNAc; jmenovitě p.150F>L vedla k více

než šestinásobnému zvýšení IC_{50} a p.454A>E vedla ke dvojnásobnému zvýšení hodnot IC_{50}. Některé mutace asociované s MODY nezpůsobovaly zásadnější změny v RAI; tyto zahrnovaly p.250R>C (RAI 0,94), p.434C>Y (RAI 0,71) a p.318G>R (RAI 0,67). Nevýznamné změny v RAI se promítly i do jen kosmetických změn v GSIR-T, které se u těchto mutací pohybovalo od 5,0 do 5,3 mM glukózy. U ostatních mutací se RAI pohybovalo od 5,7 do 7,1 mM glukózy, což už je pro fenotyp *GCK*-MODY charakteristické. Co se týče experimentálních variant, p.63R>S byla asociována s RAI 4,17 a GSIR-T 2,9 mM, přičemž k poklesu došlo jak u $S_{0,5}$, tak i u ATP K_M, zatímco IC_{50} GlcNAc se zvýšila. Další z experimentálních variant, p.260F>L, demonstrovala neutrální fenotyp. Varianta p.251M>C byla silně inhibiční variantou s téměř nedetekovatelnou aktivitou GCK i při vysokých koncentracích glukózy.

6.3 Změna obecného nastavení predikčních algoritmů pro předpověď klinické manifestace fenotypů záměnových mutací [příloha 3]

Sestavili jsme dvě rozsáhlé vzájemně se nepřekrývající databáze klinických fenotypů způsobených záměnovými mutacemi ve 44 a 63 genech asociovaných s mendelistickými onemocněními a použili jsme tyto databáze pro tvorbu a validaci modelu umožňujícího zlepšení kvality predikcí pomocí EVmutation, SNAP2 a PoPMuSiC 2.1. Predikce klinických efektů trpí absencí specificity, což je společným neduhem všech v současnosti používaných predikčních metod, a to přesto, že jejich výstupy jsou asociovány s téměř absolutní senzitivitou. Zavedli jsme úpravu základního nastavení prediktorů založenou na důkazech. Tato úprava výstupy zmíněných prediktorů významně vylepšila. Nadto srovnání distribuce klinicky pozorovaných a teoretických mutací vedlo k identifikaci rozsáhlých dosud neznámých skupin mutací, které jsou pod vlivem negativní selekce během molekulární evoluce. Postup popsaný v této práci je prvním, který umožnil vysoce specifickou identifikaci záměnových mutací, které pravděpodobně vedou ke vzniku onemocnění, ale dosud nebyly s žádným klinickým fenotypem asociovány.

6.4 Přehled stávajících poznatků o redox regulaci hexokináz [příloha 4]

V tomto přehledném článku jsme se zaměřili na modulaci a časoprostorovou lokalizaci regulace aktivity hexokináz prostřednictvím reaktivních forem kyslíku a dusíku a plynnými signálními molekulami. Redox modifikace thiolů slouží jako molekulární kód, který umožňuje precizní a komplexní regulaci hexokináz. Tento způsob regulace hexokináz je využíván například celou řadou parazitů způsobujících široce rozšířená a závažná onemocnění, včetně malárie, Chagasovy a spavé nemoci. Molekuly s redoxní aktivitou se ovlivňují navzájem a vzniká zde i zpětnovazebná smyčka spočívající v atypických aktivitách hexokinázy ovlivňujících redox status buňky (pozn.: v angličtině se pro tento způsob vedlejších atypických aktivit užívá běžně termín *moonlighting*, jeho českým překladem by bylo *melouchaření*, což je sice trefná analogie, avšak do vědeckého textu mi nepřijde příliš vhodná k užití, zažitý český výraz tedy chybí), tato zpětnovazebná smyčka je často zneužita při maligní transformaci buněk. Existuje řada látek, které jsou schopny ovlivnit redox status hexokináz *in vivo*. Patří mezi ně dehydroaskorbová kyselina (oxidizovaná forma vitamínu C), antikoncepční prostředek pyrrolidine-1-carbodithioát, produkt metabolismu ethanolu peroxynitrit, analog glukózy alloxan a isobenzothiazolinon ebselen. Informace o tom, které aminokyseliny podléhají redox regulaci jsou velmi kusé. Důkazy o redox regulaci v rámci jednotlivých s hexokinázami asociovaných patologií, s výjimkou MODY, chybí.

6.5 Enzymová kinetika a stabilita somatických s nádory asociovaných záměnových mutací v GCK [příloha 5]

Aktivační a/nebo stabilizující mutace byly mezi analyzovanými somatickými s nádory asociovanými mutacemi v GCK časté, což ostře kontrastuje s jejich nízkou frekvencí mezi zárodečnými mutacemi téže molekuly. Aktivující a stabilizující mutace byly v molekule GCK distribuovány fokálně s ohledem na její terciární strukturu a byly přítomny v okolí heterotropického alosterického aktivátorového místa, zejména pak ve spojovací smyčce I a v oblasti aktivního místa, která podléhá rozsáhlým strukturním změnám po navázání glukózy. Značnou změnu v enzymové kinetice a celkově aktivační efekt vykazovaly právě mutace nacházející se ve

smyčce interagující s alosterickými aktivátory (p.64S>F, p.65T>I, p.68G>S). Efekt byl způsoben zvýšenou afinitou ke glukóze a sníženou mírou kooperativity enzymu, přičemž u mutace p.64S>F jsme zjistili dvacetinásobný nárůst aktivity enzymu. Zároveň u mutací v aktivační smyčce docházelo ke snížení kompetitivní inhibice. Zbývajících 15 mutací bylo ve vztahu k enzymatické aktivitě neutrálních. Avšak u poloviny z nich jsme pozorovali značné ovlivnění teplotní stability. Významnější ztrátu aktivity oproti divokému typu GCK vykazovaly při 45 °C po 100 minutách inkubace mutace p.358R>P, p.312E>K, p.338V>L, zatímco mutace p.24Q>H, p.345R>H, p.104K>E, p.433S>N významně zvyšovaly stabilitu enzymu. Předkládaná studie prezentuje první data dokládající vliv somatických somatických nádorových mutací v GCK na kinetiku a stabilitu tohoto enzymu.

6.6 Přehled HNF ve vztahu k diabetes mellitus [příloha 6]

V tomto přehledném edukativním článku jsme sestavili přehled účinků HNF, tedy transkripčních faktorů na vznik a progresi diabetu. Jde o specifické transkripční faktory řídící transkripci širokého spektra genů, jejichž produkty se v embryonálním období podílejí na vývoji organismu a postnatálně na udržení metabolické homeostázy. Jejich dysfunkce je asociována se vznikem diabetes mellitus a pravděpodobně i s rozvojem pozdních diabetických komplikací. Heterozygotní mutace v genech *HNF1A*, *HNF4A* a *HNF1B* vedou ke vzniku MODY. Navíc, polymorfismy v *HNF1A* a *HNF4A* predisponují k diabetes mellitus 2. typu a metabolickému syndromu. Pokles transkripční aktivity HNF-4α je spojován také s diabetickou nefropatií, renotubulárním syndromem a se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních příhod a mortality, zejména ve vazbě na zvýšenou plazmatickou koncentraci asymetrického dimethylargininu, jenž je v současnosti diskutován jako nový marker endotelové dysfunkce. Objasnění rolí HNF významně přispělo k porozumění genetické etiologie diabetes mellitus a umožnilo individualizaci léčby pacientů s MODY. Do budoucna nesou HNF příslib využití jako cíle pro terapeutické ovlivnění diabetes mellitus 2. typu.

6.7 Kinetika derivátů sulfonylurey u pacientů s MODY [příloha 7]

V tomto příspěvku jsme předložili první data o farmakokinetice a farmakodynamice derivátů sulfonylurey u pacientů s MODY. Poločas glipizidu nevykazoval oproti kontrolním osobám bez diabetu změnu a dosahoval 3,8±0,7 h u pacientů s MODY a 3,7±1,8 h u kontrolních osob bez diabetu. Poločas glibenklamidu se zvýšil jen u některých jednotlivců s MODY, čímž zkoumaný soubor pacientů s MODY vykazoval vysokou variabilitu. Poločas glibenklamidu dosahoval 9,5±6,7 h u pacientů s MODY a 5,0±1,4 h u kontrolních osob bez diabetu. Významným zjištěním bylo, že u jednotlivých osob zahrnutých do studie úzce navzájem korelovala úroveň odpovědi na podání glipizidu a glibenklamidu. Co se týče farmakodynamiky, u pacientů s MODY se odpověď na dvě podávaná léčiva od sebe nelišila, zatímco u osob zdravých byla farmakodynamika glipizidu a glibenklamidu navzájem odlišná.

6.8 První pozorování autoprotilátek proti antigenům beta buněk u rodiny pacientů s MODY [příloha 8]

V rámci tohoto příspěvku jsme diagnostikovali rodinu pacientů s *HNF1A*-MODY, konkrétně tři osoby ve věku 14 až 35 let nesoucí mutaci p.159R>Q. Všichni tři pacienti měli detekovatelné (ale v průběhu několika analyzovaných let variabilní) hladiny autoprotilátek GADA nebo IA-2A, přičemž jiné diagnostické znaky diabetes mellitus 1. typu jsme u nich nezaznamenali. Vykazovali dlouhodobě středně vysoké hladiny lačného C-peptidu, do ketoacidózy se nedostávali ani v případě spontánního vysazení předepsané dávky inzulínu a na externě podávaném inzulínu nebyli plně závislí, i když docházelo k lepší kontrole glykémie při podávání inzulínu než při jeho vysazení. Průběh nemoci byl podobný pacientům s *HNF1A*-MODY, kteří autoprotilátky proti antigenům beta buněk neexprimují. Popsaná případová studie zpochybňuje selektivitu autoprotilátek proti antigenům beta buněk jako markeru diabetes mellitus 1. typu nebo LADA oproti MODY a klade otázku zda užití autoprotilátek proti antigenům beta buněk může i nadále sloužit jako univerzální negativní marker pro MODY, který je široce užíván za účelem snížení nákladů na péči o diabetiky. Pokud se obdobná pozorování potvrdí u více pacientů s MODY, jde o závažný diagnostický problém, který může vést k opakovanému stanovení

nesprávných diagnóz a tedy i k nesprávné léčbě.

6.9 Funkční relevance přítomnosti autoprotilátek proti antigenům beta buněk u pacientů s MODY [příloha 9]

Navazujíc na předchozí kazuistiku [příloha 8], autoprotilátky proti antigenům beta buněk jsme stanovili u všech pacientů s MODY, kteří v době studie byli na klinice diagnostikováni a dali příslušný informovaný souhlas. Čtvrtina z těchto pacientů s MODY (7 z 28) byla na GADA a/nebo IA-2A pozitivní. GADA pozitivita byla častější (přítomny u všech pacientů pozitivních na autoprotilátky), zatímco IA-2A jsme zaznamenali jen u jednoho pacienta. Incidence autoprotilátek nekorelovala s jejich HLA alelami. Pacienti pozitivní na autoprotilátky manifestovali diabetes později než ti, kteří byli na autoprotilátky proti antigenům beta buněk testováni s negativním výsledkem. Naopak, pacienti pozitivní na autoprotilátky měli obecně horší glykemickou kontrolu, tedy zvýšené hodnoty HbA1c. Exprese autoprotilátek proti antigenům beta buněk obecně klesala s tím, jak se zlepšovala kompenzace diabetu u jednotlivých studovaných pacientů. Jen jeden z pacientů ze studovaného souboru neodpovídal zcela výše popsaným charakteristikám a manifestoval znaky charakteristické jak pro MODY, tak pro diabetes mellitus 1. typu. Exprese autoprotilátek proti antigenům beta buněk je tedy u pacientů s MODY tranzientním, ale poměrně častým jevem přinejmenším v podmínkách České republiky, asociovaným typicky s periodami zhoršené kontroly glykémie jednotlivých pacientů.

6.10 Stanovení protilátek proti zinkovému transportéru u pacientů s LADA a MODY [příloha 10]

Zjistili jsme, že většina českých pacientů s LADA byla v okamžiku testování (nevztahuje se k nástupu nemoci) negativní na ZnTA a senzitivita eseje dosáhla pouze 18% až 20% pro pacienty s progresí k inzulinoterapii dle definic LADA ve srovnání se zdravými kontrolami. U pacientů s LADA nedocházelo k asociaci mezi ZnTA a rizikovými genotypy *PTPN22*. Pacienti s LADA, kteří bylo pozitivní na ZnTA, měli nižší BMI než ti, kteří byli pozitivní jen na jiné autoprotilátky proti antigenům beta buněk. Významné je, že paralelně testovaní pacienti s MODY byli na ZnTA všichni negativní a sérové titry ZnTA u pacientů s MODY byly podobné titrům u kontrolních osob bez diabetu. Kvantifikace ZnTA tedy nezpřesňuje diagnózu LADA. Nicméně, pozitivita na ZnTA může být využívána jako negativní pre-diagnostické kritérium před referováním pacientů na genetické testování MODY v regionu střední a východní Evropy, kde jsou jiné autoprotilátky proti antigenům beta buněk, zejména GADA, u pacientů s MODY časté.

6.11 Stanovení frekvence funkčních polymorfismů v PTPN22 u pacientů s MODY [příloha 11]

Zjistili jsme, že frekvence rizikových funkčních polymorfismů v *PTPN22* je u pacientů s MODY podobná jako u geograficky odpovídajících kohort kontrolních osob kromě c.788G>A. Minoritní alela tohoto polymorfismu se vyskytovala výrazně častěji u českých pacientů s *HNF1A*-MODY (OR 4,8, 95% CI 2,2–10,7) a u brazilských pacientů s MODY (OR 8,4, 95% CI 1,8–39,1). Signifikantně více byla tato alela zastoupena také u českých pacientů s MODY, kteří byli pozitivně testováni na přítomnost autoprotilátek proti antigenům beta buněk. Nicméně, tato alela by se měla chovat jako mutace potlačující funkci Lyp v T-buňkách a tedy by proti autoimunitním onemocněním měla chránit. Protože absence rizikových alel *PTPN22* byla prokázána i u pacientů s LADA, je možné, že pomalá kinetika nástupu produkce autoprotilátek je regulována jinými mechanismy než rychle se manifestující autoprotilátky, které jsou typické pro diabetes mellitus 1. typu a některé jiné autoimunitní choroby.

6.12 Stanovení frekvence funkčních polymorfismů v PTPN22 u pacientů s LADA [příloha 12]

Zjistili jsme, že prevalence rizikové alely *PTPN22* c.1858T neodpovídá paradigmatu tvrdícímu, že jde o rizikovou alelu pro vznik LADA, a to přesto, že jsme potvrdili její rizikový status u geograficky odpovídající kohorty pacientů s diabetes mellitus 1. typu. Ostatní zkoumané alely (c.-1123C, c.788A a c.1970-852C) naopak

vykazovaly významné odchylky ve své prevalenci u pacientů s LADA oproti kontrolám bez diabetu. Potvrdili jsme, že vliv některých polymorfismů v *PTPN22* je u českých pacientů s LADA závislý na pohlaví, což však neplatilo pro nejznámnější c.1858C>T. Jednotlivé alely a genotypy *PTPN22* byly asociovány se specifickými klinickými charakteristikami zkoumaných pacientů, včetně exprese autoprotilátek proti antigenům beta buněk, HbA1c a věku při diagnóze diabetu. Variabilita haplotypů *PTPN22* ukazuje, že LADA nelze geneticky charakterizovat jako hybridní formu mezi diabetes mellitus 1. a 2. typu, ale že jde o onemocnění s profilem haplotypů *PTPN22* odlišným jak od diabetes mellitus 1. typu, tak i od diabetes mellitus 2. typu.

7. ZÁVĚRY

V rámci studia vybraných molekulárně patologických aspektů vzniku a progrese diabetes mellitus se nám podařilo výrazným způsobem zpřesnit predikce efektů záměnových mutací v GCK a tím rozlišit mutace asociované s MODY, popřípadě novorozeneckým diabetem od těch, které nezpůsobují žádný klinicky se manifestující fenotyp nebo způsobují hyperinzulinemickou hypoglykemii. Navzdory tomu, že prediktory jsou široce používány nejen specialisty v oboru, ale i nespecialisty, například diabetology reálně provádějícími diagnostiku geneticky podmíněných nemocí a následně své výsledky tlumočí periferním ambulancím, tak tyto prediktory dosud měly velmi zásadní omezení v podobě generování falešně pozitivních výsledků. Že jde o záležitost aktuální dokládá mimo jiné i to, že například na Diabetologických dnech v Luhačovicích jsou pravidelně přednášeny prezentace, ve kterých si prezentující ověřují své výsledky, nálezy nových mutací, právě pomocí prediktorů a takto získaným výsledkům důvěřují. V této habilitační práci ukazujeme nejen to, že tyto predikce jsou vysoce nespolehlivé, ale zároveň ukazujeme i cestu, jakou se lze řádově vyšší spolehlivosti dobrat přinejmenším v případě genů asociovaných s mendelistickými onemocněními. Naši studii zahájenou původně na GCK jsme následně rozpracovali a generalizovali i pro HNF-4α a dalších 105 genů asociovaných s nejrůznějšími mendelistickými onemocněními. Výsledné nastavení algoritmů jsme již využili i v jedné z navazujících studií, která je součástí této habilitační práce a také pro enzymologické experimenty s hexokinázami, které provádíme v současné době.

Podařilo se nám objasnit enzymovou kinetiku několika desítek mutací v GCK, z nichž část byla původně diagnostikována u českých pacientů (a jde tedy o první experimentální potvrzení správnosti klasifikace jejich diabetu jako *GCK*-MODY) a další část byla popsána ve formě somatických mutací z pacientů se zhoubným bujením (a jde o první experimentální studii zkoumající somatické mutace v GCK). Ukázali jsme, že u obou skupin mutací je spektrum jejich účinků velice pestré a nelze jej zjednodušit např. jen na efekty na RAI či GSIR-T. Zvláště u mutací asociovaných s nádory bylo častým jevem zvýšení stability enzymu, které může vést k násobnému navýšení hladiny GCK v nádorové buňce a tím podpoření průběhu první reakce glykolýzy bez inhibice výsledným produktem. Zbývá analyzovat efekty posttranslačních modifikací, zejména pak prostřednictvím reaktivních forem dusíku, kterým jsme se věnovali v jednom z přiložených přehledných článků. Nejasný zůstává též vliv GCK na buněčnou proliferaci a apoptózu u nádorově transformovaných buněk s vnesenými aktivujícími či stabilizujícími mutacemi v GCK *in vivo*.

Velmi nečekané výsledky jsme obdrželi při analýze farmakokinetiky a farmakodynamiky derivátů sulfonylurey u pacientů s *HNF1A*-MODY a *HNF4A*-MODY. Předpokládali jsme, že potvrdíme data známá již delší dobu z myšího modelu *Hnf1a*-MODY. Opak byl však pravdou a zjistili jsme, že u pacientů s *HNF1A*-MODY a *HNF4A*-MODY dochází jen k nevýznamnému nebo dokonce žádnému navýšení hladin derivátů sulfonylurey, přičemž jednotliví pacienti ale vykazují při svém vzájemném porovnání značnou variabilitu. Tuto variabilitu nelze vysvětlit na základě polymorfismů v *CYP2C9*. Zmíněné variabilitě mezi skupinami pacientů s *HNF1A*-MODY a *HNF4A*-MODY jsme se chtěli v letech následujících po publikaci studie věnovat, ale nepodařilo se zabezpečit dostatečně velké kohorty, navazující pokusy jsme proto odložili. Zajímavé je, že mezitím vyšla studie poukazující na sníženou senzitivitu k derivátům sulfonylurey u některých pacientů s *HNF4A*-MODY (Laver a kol. 2016), což je v souladu s našimi nálezy o vysoké variabilitě odpovědí na podání derivátů sulfonylurey u pacientů s *HNF1A*-MODY a *HNF4A*-MODY.

V práci jsme se rovněž věnovali problematice autoprotilátek proti antigenům beta buněk u minoritních typů diabetu. Série studií vyústila v závěr, že zhruba čtvrtina českých pacientů s MODY diabetem exprimuje protilátky GADA, méně časté jsou IA-2A a patrně zcela chybí ZnTA. Zmíněné pozorování je nutno zasadit do souvislosti s tím, že MODY v žádném případě nelze na základě stávajících poznatků považovat za diabetes autoimunitního původu. Domníváme se, že by mohlo jít o sekundární vznik autoimunity – následkem manifestace diabetu dochází k destrukci beta buněk slinivky břišní a při jejich buněčné smrti, zvlášť pokud k ní nedochází prostřednictvím apoptózy, ale nekrózy, se uvolňují cytoplasmatické antigeny, které u senzitivních

jedinců stimulují imunitní systém. V dnešní době, kdy je prevalence autoimunitních chorob vysoká a stále rostoucí, zvláště ve městech, je možné, že se antigeny uvolněné při nástupu a progresi MODY u vnímavých osob stimulují vznik protilátek proti nim. Pozorované vzestupy hladin autoprotilátek u pacientů s MODY byly dočasné a dobře patrná byla koincidence se zhoršenou kompenzací nemoci. Pacienti s MODY, kteří byli na autoprotilátky pozitivní, nevykazovali rizikové *HLA* ani *PTPN22* genotypy. Expresi ZnTA a rizikové *PTPN22* genotypy jsme zkoumali i u pacientů s LADA (z anglického *latent autoimmune diabetes of adults*), přičemž jsme zjistili, že LADA vykazuje odlišné spektrum těchto znaků oproti diabetes mellitus 1. a 2. typu, což je v protikladu k dříve postulované hypotéze tvrdící, že LADA je své sdílené znaky s diabetes mellitus 1. i 2. typu považován za intermediární formu diabetu.

Zjištěné výsledky přispívají ke stávajícímu rozmachu tzv. precizní medicíny, kdy se původně monolitický koncept jedné nebo několika málo nemocí definovaných na základě typických klinických příznaků (typicky diabetes mellitus 1. typu) rozpadá na řadu specificky definovaných podtypů dané nemoci dle kritérií založených často na genetických či molekulárně biologických analýzách jednotlivých pacientů. Mendelistické nemoci, mezi něž MODY patří, jsou pro tento účel ideálním modelem, ale i u multifaktoriálních typů diabetu lze pozorovat zpřesňování a rozřeďování způsobů klasifikace a diagnostiky. Ačkoliv byl naším cílem především vyhledávací výzkum, významnou skutečností je, že jeden z výsledků předkládané práce se již stihnul promítnout i do nejnovějších Standardů lékařské péče o pacienty s diabetem vydávaných Americkou diabetologickou společností.

8. LITERATURA

American Diabetes Association, Diabetes Care. 2007;30:S42-7.

American Diabetes Association, Diabetes Care. 2018;41:S13-27.

Andersen MK a kol., Eur J Endocrinol. 2012;167:27-33.

Anonymus, Zinc Transporter 8 (ZnT8) Autoantibody ELISA Kit - Instructions for use. RSR/38 Rev 12, 16. 7. 2015 a RSR technical information Zinc transporter 8 (ZnT8) autoantibody ELISA kit ElisaRSR™ ZnT8 Ab™. RSR, Cardiff, 2016.

Awa WL a kol., Eur J Endocrinol. 2011;164:513-20.

Baekkeskov S a kol., Nature. 1990;348:151-6.

Bazalová Z a kol., Diabetes Res Clin Pract. 2010;88:132-8.

Bizzarri C a kol., J Cyst Fibros. 2013;12:803-5.

Blasetti A a kol., Pharmacogenom J. 2017;17:186-91.

Bluteau O a kol., Nat Genet. 2002;32:312-5.

Boileau P a kol., Diabetes. 2002;51:343-8.

Bonner C a kol., Diabetes. 2010;59:2799-808.

Booβ-Bavnbek B a kol., BetaSys: systems biology of regulated exocytosis in pancreatic beta-cells. Springer, New York, 2011.

Bottini N a kol., Nat Genet. 2004;36:337-8.

Boyd M a kol., BMC Gastroenterol. 2009;9:68.

Brophy S a kol., Cochrane Database Syst Rev. 2011;9:CD006165.

Brzoza Z a kol., Dermatology. 2012;224:340-5.

Canivell S & Gomis R, Autoimmun Rev. 2014;13:403-7.

Capasso F a kol., Pediatr Diabetes. 2013;14:304-10.

Carlton VE a kol., Am J Hum Genet. 2005;77:567-81.

Cereghini S, FASEB J. 1996;10:267-82.

Cinek O a kol., Diabet Res Clin Pract. 2007;76:297-303.

Clemente-Casares X a kol., Cold Spring Harb Perspect Med. 2012;2:a007773.

Coustan DR, Clin Chem. 2013;59:1310-21.

Černá M a kol., Eur J Immunogenet. 2003;30:401-7.

Davis EA a kol., Diabetologia. 1999;42:1175-86.

Dehouck Y a kol., BMC Bioinformatics. 2011;12:151.

Dereke J a kol., Endocrine. 2016;53:740-6.

Dotta F, Endocrinology. 1998;139:316-9.

Duncan JM, Trans Obstet Soc Lond. 1882;24:256-85.

Ellard S & Colclough K, Mutat Res. 2006;27:854-69.

Fajans SS a kol., N Engl J Med. 2001;345:971-80.

Fedetz M a kol., Tissue Antigens. 2006;67:430-3.

Fenalti G & Buckle AM, Autoimmun Rev. 2010;9:148-52.

Ferrer JA, Diabetes. 2002;51:2355-62.

Fichna M a kol., Endocrine. 2016;53:249-57.

García-Herrero CM a kol., Diabetologia. 2007;50:325-33.

Gonzalez FJ, Drug Metab Pharmacokinet. 2008;23:2-7.

Grant SF a kol., Endocr Rev. 2010;31:183-93.

Groop L & Pociot F, Mol Cell Endocrinol. 2014;382:726-39.

Hagenfeldt-Johansson KA a kol., Endocrinology. 2001;142:5311-20.

Haller-Kikkatalo K a kol., Eur J Clin Invest. 2015;45:255-62.

Harjutsalo V a kol., BMJ. 2011;343:d5364.

Hattersley AT & Patel KA, Diabetologia. 2017;60:769-77.

Hawa MI a kol., Diabetes Care. 2013;36:908-13.
Hayhurst GP a kol., Mol Cell Biol. 2001;21:1393-403.
Hecht M a kol., BMC Genomics. 2015;16:S1.
Hermann R a kol., Diabetologia. 2006;49:1198-208.
Hopf TA a kol., Nat Biotechnol. 2017;35:128-35.
Huang J-J a kol., Rheum Int. 2012;32:767-71.
Hwang-Verslues WW & Sladek FM, Curr Opin Pharmacol. 2010;10:698-705
Chang HH a kol., PLoS ONE. 2012;7:e33067.
Chen WS a kol., Genes Dev. 1994;8:2466-77.
Chow LS a kol., Diabetologia. 2015;58:1160-6.
Jeffrey W a kol., Curr Diab Rep. 2015;15:110.
Jetton TL a kol., J Biol Chem. 1994;269:3641-54.
Jüliger S a kol., Immunogenetics. 2003;54:675-80.
Kahles H a kol., Eur J Endocrinol. 2005;153:895-9.
Kamiyama Y a kol., Drug Metab Pharmacokinet. 2007;22:287-98.
Kawasaki E a kol., Am J Med Gen. 2006;140A:586-93.
Kirchheiner J a kol., Clin Pharmacol Ther. 2002a;71:286-96.
Kirchheiner J a kol., Pharmacogenetics. 2002b;12:101-9.
Kirchheiner J a kol., Clin Pharmacokinet. 2005;44:1209-25.
Kisand K & Uibo R, Gene. 2012;497:285-91.
Koo BK a kol., Diabetes. 2014;63:3022-32.
Kyvik KO a kol., BMJ. 1995;311:913-7.
Lampasone V a kol., Diabetes Care. 2010;33:104-8.
Lan MS a kol., DNA Cell Biol. 1994;13:505-14.
Larion M a kol., Angew Chem Int Ed Engl. 2015;54:8129-32.
Larsson HE & Lernmark A, Hum Vaccin 2011;7:45-9.
Laugesen E a kol., Diabet Med. 2015;32:843-52.
Laver TW a kol., Diabetes. 2016;65:3212-17.
Li J a kol., Genes Dev. 2000;14:464-74.
Liu F a kol., Cell Biochem Biophys. 2012a;62:273-9.
Liu J a kol., PLoS ONE. 2012b;7:e43631.
Lukášová P a kol., Physiol Res. 2008;57:S99-108.
Luo SM a kol., J Clin Endocrinol Metab. 2016;101:1693-700.
Martinez JA a kol., Protein Sci. 2014;23:915-22.
Masala S a kol., PLoS ONE. 2014;9:e97621.
Mathe E a kol., Nucl Acids Res. 2006;34:1317-25.
Matschinsky FM, Nat Rev Drug Discov. 2009;8:399-416.
Matschinsky FM & Magnuson MA, Molecular pathogenesis of MODYs. Karger, Basel, 2000.
Matschinsky FM a kol., Diabetes. 2006;55:1-12.
Maziarz M a kol., Genes Immun. 2010;11:406-15.
McDonald TJ a kol., Diabet Med. 2011;28:1028-33.
Mishra R a kol., BMC Med. 2017;15:88.
Ng ML, Diab Res Clin Pract. 2014;106:S36-7.
Nielsen C a kol., Int J Immunogenet. 2007;34:469-73.
Nykamp K a kol., Genet Med. 2017;19:1105-17.
Odom DT a kol., Science. 2004;303:1378-81.
Orrú V a kol., Hum Mol Genet. 2009;18:569-79.
Osbak KK a kol., Hum Mutat. 2009;30:1512-26.
Pearson ER a kol., Lancet. 2003;362:1275-81.
Pearson ER a kol., Diabetes Care. 2004;27:1102-7.

Petrone A a kol., Diabetes Care. 2008;31:534-8.
Pietropaolo M a kol., Diabetologia. 2002;45:66-76.
Pietropaolo M a kol., Pediatr Diabetes. 2005;6:184-92.
Pinterova D a kol., Clin Genet. 2007;71:95-6.
Pociot F a kol., Diabetologia. 1993;36:870-5.
Pontoglio M a kol., J Clin Investig. 1998;101:2215-22.
Pontoglio M a kol., EMBO Rep. 2000;1:359-65.
Pozzilli P & Di Mario U, Diabetes Care. 2001;24:1460-7.
Pruhova S a kol., Diabetologia. 2003;46:291-5.
Průhová S a kol., Pediatr Diabetes. 2010;11:529-35.
Reznik Y a kol., J Clin Endocrinol Metab. 2004;89:1476-80.
Richards S a kol., Genet Med. 2015;17:405-24.
Rogowicz-Frontczak A a kol., Eur J Endocrinol. 2014;170:651-8.
Rudland VL a kol., Diabet Med. 2015;32:359-66.
Ryffel GU, J Mol Endocrinol. 2001;27:11-29.
Servitja JM & Ferrer J, Diabetologia. 2004;47:597-613.
Shih DQ a kol., Diabetes. 2000;49:832-7.
Shoenfeld Y a kol., Autoantibodies, 3rd edition. Elsevier, Waltham, 2014.
Schober E a kol., Diabet Med. 2009;26:466-73.
Solimena M a kol., N Engl J Med 1988;318:1012-20.
Stoffel M & Duncan SA, Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94:13209-14.
Svensson M a kol., Scand J Immunol. 2014;79:137-48.
Šmahelová A, Remedia. 2008;18:S56-60.
Taniyama M a kol., Hum Immunol. 2010;71:795-8.
Thanabalasingham G & Owen KR, BMJ. 2011;343:837-42.
Tuomi T a kol., Lancet. 2014;383:1084-94.
Valentínová L a kol., PLoS ONE. 2012;7:e34541.
Vandewalle CL a kol., Diabetologia. 1993;36:1155-62.
Vaxillaire M a kol., J Biol Chem. 1999;274:35639-46.
Viken MK a kol., Tissue Antigens. 2007;70:190-7.
Walesky C & Apte U, Gene Expr. 2015;16:101-8.
Walther D a kol., Diabetologia. 2016;59:1973-6.
Wang H a kol., J Biol Chem. 2000;275:35953-9.
Watt AJ a kol., Hepatology. 2003;37:1249-53
Wenzlau JM a kol., Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104:17040-5.
Wenzlau JM & Hutton JC, Curr Diab Rep. 2013;13:608-15.
Whittington AC a kol., Proc Natl Acad Sci USA. 2015;112:11553-8.
Wobser H a kol., J Biol Chem. 2002;277:6413-21.
Wobser H a kol., Diabetologia. 2006;49:519-26.
Xiang Y a kol., Acta Diabetol. 2015;52:1121-7.
Yamagata K a kol., Nature. 1996;384:458-60.
Yamagata K a kol., Diabetes. 1998;47:1231-5.
Yamagata K, Endocr J. 2003;50:491-9.
Zheng K a kol., Thorac Cancer. 2012;3:307-12.

9. PŘÍLOHY

Tato kapitola obsahuje plnotextové verze článků, popřípadě rukopisů u prací, které jsou v době sepsání habilitační práce v recenzním řízení. Pokud jsou pro porozumění textu důležité, jsou přiloženy i relevantní suplementární materiály jednotlivých prací. Následující část habilitační práce je dostupná pouze v tištěné podobě, v elektronické verzi (v repozitáři) není z důvodu možných konfliktů s předchozím převodem autorských práv na jednotlivé vydavatele přiložena.

1.

Anděl, M.; Němcová, V.; Pavlíková, N.; Urbanová, J.; Čecháková, M.; Havlová, A.; Straková, R.; Večeřová, L.; Mandys, V.; Kovář, J.; Heneberg, P.; Trnka, J.; Kraml, P.; Polák, J. (2014):

Faktory vedoucí k poškození a destrukci beta-buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu.

Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa 17 (3): 122-128; ISSN 1212-6853.

Abstrakt: U pacientů, u kterých se manifestoval diabetes mellitus, dochází po měsících až desetiletích trvání choroby k vyhasnutí sekrece inzulinu, což je téměř jistým znamením úbytku beta-buněk Langerhansových ostrůvků. U našeho sledovaného souboru 30 pacientů, kteří manifestovali chorobu mezi 30–45 roky a kteří byli diagnostikováni jako diabetici 2. typu, má po 30 letech trvání choroby polovina zachovanou nebo vyšší sekreci inzulinu, druhá polovina pak sekreci výrazně sníženou nebo vyhaslou. Faktory, které postihují beta-buňky a vedou k jejich destrukci, můžeme shrnout do následujících skupin:

1. Faktory chemické:

– faktory metabolické: hyperglykemie a glukotoxicita, lipotoxicita, hypoxie, volné kyslíkové radikály,

– faktory farmakologické: antimikrobiální prostředek pentamidin, antidepresiva typu SSRI,

– faktory spojené s poruchou sekrece inzulinu: MODY typy diabetu

– toxické látky ze zevního prostředí: jed na krysy Vacor, streptozotocin, polychlorované či polybromované uhlovodíky.

2. Onemocnění zevně sekretorické části pankreatu: nádorová infiltrace, vazivová infiltrace, chronická pankreatitis.

3. Infekce, zánět a autoimunita:

– faktory virové: Coxsackie viry, virus chřipky H1N1, enteroviry. Záněty.

Autoimunní faktory představující patogenetický faktor diabetu 1. typu. V současné době pracujeme jak na specifikaci dalších faktorů vedoucích k poškození beta-buněk, tak na studiu poznání jejich účinku na buněčnou apoptózu, respektive nekrózu, a konečně na definici ochranných faktorů, které by účinky působení těchto faktorů snížily. S nárůstem vědomostí o mechanismech poškození a destrukce beta-buněk se rýsují návrhy některých opatření, která by je mohla chránit. V našem přehledu podáváme zestručnělý a s ohledem na rozsah článku také notně zjednodušený přehled některých znalostí, které se poškození a destrukce beta-buněk týkají.

2.

Šimčíková, D.; Kocková, L.; Vackářová, K.; Těšínský, M.; Heneberg, P. (2017):

Evidence-based tailoring of bioinformatics approaches to optimize methods that predict the effects of nonsynonymous amino acid substitutions in glucokinase.

Scientific Reports 7 (1): 9499; ISSN 2045-2322.

IF 2016: 4,259

rank (2016): multidisciplinary sciences 10/64

Abstrakt: Computational methods that allow predicting the effects of nonsynonymous substitutions are an integral part of exome studies. Here, we validated and improved their specificity by performing a comprehensive bioinformatics analysis combined with experimental and clinical data on a model of glucokinase (GCK): 8835 putative variations, including 515 disease-associated variations from 1596 families with diagnoses of monogenic diabetes (*GCK*-MODY) or persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy (PHHI), and 126 variations with available or newly reported (19 variations) data on enzyme kinetics. We also proved that high frequency of disease-associated variations found in patients is closely related to their evolutionary conservation. The default set prediction methods predicted correctly the effects of only a part of the *GCK*-MODY-associated variations and completely failed to predict the normoglycemic or PHHI-associated variations. Therefore, we calculated evidence-based thresholds that improved significantly the specificity of predictions (≤75%). The combined prediction analysis even allowed to distinguish activating from inactivating variations and identified a group of putatively highly pathogenic variations (EVmutation score <−7.5 and SNAP2 score >70), which were surprisingly underrepresented among MODY patients and thus under negative selection during molecular evolution. We suggested and validated the first robust evidence-based thresholds, which allow improved, highly specific predictions of disease-associated GCK variations.

3.

Šimčíková, D.; Heneberg, P. (subm.):

Refinement of evolutionary medicine predictions based on clinical evidence for the manifestation of Mendelian diseases.

Abstrakt: Prediction methods became an integral part of biomedical and biotechnological research despite their clinical interpretations being largely based on biochemical or molecular, not clinical, data. Here, we focus on improving the reliability and clinical applicability of prediction algorithms. We assembled and curated two non-overlapping large databases of clinical phenotypes caused by missense variations in 44 and 63 genes associated with Mendelian diseases and used these databases to establish and validate the model allowing to improve the predictions by EVmutation, SNAP2 and PoPMuSiC 2.1. The predictions of clinical effects suffer from a lack of specificity, which seems to be the common constraint of all recently used prediction methods, although their predictions are associated with nearly absolute sensitivity. We introduced evidence-based tailoring of the default settings of the prediction methods; this tailoring substantially improved the prediction outcomes. Additionally, the comparisons of the clinically observed and theoretical variations led to the identification of large previously unreported pools of variations that are under negative selection during molecular evolution. The evolutionary variation analysis approach described here is the first to enable the highly specific identification of likely disease-causing missense variations that have not yet been associated with any clinical phenotype.

4.

<u>Heneberg, P.</u> (2018):

Redox regulation of hexokinases.

Antioxidants & Redox Signaling, on-line first, doi: 10.1089/ars.2017.7255.; ISSN 1523-0864.

IF 2016: 6,337

rank (2016): biochemistry & molecular biology 34/290; endocrinology & metabolism 13/138

Abstrakt:

Significance

Hexokinases are key enzymes that are responsible for the first reaction of glycolysis, but they also moonlight other cellular processes, including mitochondrial redox signaling regulation. Modulation of hexokinase activity and spatiotemporal location by reactive oxygen and nitrogen species as well as other gasotransmitters serves as the basis for a unique, underexplored method of tight and flexible regulation of these fundamental enzymes.

Recent advances

Redox modifications of thiols serve as a molecular code that enables the precise and complex regulation of hexokinases. These reactions are also used by multiple parasites to cause widespread and severe diseases, including malaria, Chagas disease, and sleeping sickness. Redox-active molecules affect each other, and the moonlighting activity of hexokinases provides another feedback loop that affects the cellular redox status and is hijacked in malignantly transformed cells.

Critical issues

Several compounds affect the redox status of hexokinases *in vivo*. These include the dehydroascorbic acid (oxidized form of vitamin C), contraceptive pyrrolidinium pyrrolidine-1-carbodithioate, ethanol metabolism-generated peroxynitrite, alloxan (a glucose analog), and isobenzothiazolinone ebselen. However, very limited information is available regarding which amino acid residues in hexokinases are affected by redox signaling. Except in cases of monogenic diabetes, direct evidence is absent for disease phenotypes that are associated with variations within motifs that are susceptible to redox signaling.

Future directions

Further studies should address the propensity of hexokinases and their disease-associated variants to participate in redox regulation. Robust and straightforward proteomic methods are needed to understand the context and consequences of hexokinase-mediated redox regulation in health and disease.

5.

Těšínský, M.; Šimčíková, D.; Heneberg, P. (subm.):

First evidence of changes in enzyme kinetics and stability of the glucokinase affected by somatic cancer-associated variations.

Abstrakt: Recent investigation of somatic variations of allosterically regulated proteins in cancer genomes suggested that variations in glucokinase (GCK) might play a role in tumorigenesis. We hypothesized that somatic cancer-associated GCK variations include in part those with activating and/or stabilizing effects. We analyzed the enzyme kinetics and thermostability of recombinant proteins possessing the likely activating variations and the variations present in the connecting loop I and provided the first experimental evidence of the effects of somatic cancer-associated GCK variations. Activating and/or stabilizing variations were common among the analyzed cancer-associated variations, which was in strong contrast to their low frequency among germinal variations. The activating and stabilizing variations displayed focal distribution with respect to the tertiary structure, and were present in the surroundings of the heterotropic allosteric activator site, including but not limited to the connecting loop I and in the active site region subject to extensive rearrangements upon glucose binding. Activating somatic cancer-associated variations induced a reduction of GCK's cooperativity and a decrease in the glucose $S_{0.5}$ values. The hotspot-associated variations, which decreased cooperativity, also increased the half-maximal inhibitory concentrations of the competitive GCK inhibitor, *N*-acetylglucosamine. Concluded, we have provided the first convincing biochemical evidence establishing GCK as a previously unrecognized enzyme that contributes to the reprogramming of energy metabolism in cancer cells. Activating GCK variations substantially increase affinity of GCK to glucose, disrupt the otherwise characteristic sigmoidal response to glucose and/or prolong the enzyme half-life. This, combined, facilitates glucose phosphorylation, thus supporting the glycolysis and associated pathways.

6.

Urbanová, J.; Rypáčková, B.; Heneberg, P.; Anděl, M. (2017):

Hepatocytární nukleární faktory a diabetes mellitus.

Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa 20 (3): 120-129; ISSN 1212-6853.

Abstrakt: Transkripční faktory (TF) představuji klíčové proteiny nezbytné pro iniciaci a regulaci genové exprese. Hepatocytární nukleární faktory (HNF) jsou specifické TF řídící transkripci širokého spektra genů, jejichž produkty se v embryonálním období podílejí na vývoji organismu a postnatálně na udržení metabolické homeostázy. Jejich dysfunkce je asociována se vznikem diabetes mellitus a pravděpodobně i s rozvojem pozdních diabetických komplikaci. Heterozygotní mutace v genech *HNF1A*, *HNF4A* a *HNF1B* vedou ke vzniku monogenního diabetu typu MODY (z anglického maturity onset diabetes of the young). Polymorfismy v *HNF1A* a *HNF4A* predisponuji k diabetes mellitus 2. typu a metabolickému syndromu. Pokles transkripční aktivity HNF-4α je spojován také s diabetickou nefropatii, renotubulárním syndromem a se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních příhod a mortality (ve vazbě na zvýšenou plazmatickou koncentraci asymetrického dimethylargininu, jenž je v současnosti diskutován jako novy marker endotelové dysfunkce). Objasněni roli HNF významně přispělo k porozuměni genetické etiologie diabetes mellitus a umožnilo individualizaci léčby pacientů s MODY. Do budoucna nesou HNF přislib nového terapeutického ovlivnění diabetu 2. typu.

7.

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 *Hnf1α*$^{-/-}$ model.

Current Pharmaceutical Design 21 (39): 5736-5748; ISSN 1381-6128.

IF 2015: 3,052

rank (2015): pharmacology & pharmacy 73/253

Abstrakt:

Objectives: Sulfonylurea derivatives are widely used for clinical treatment of human subjects with Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) caused by mutations in HNF-1α or HNF-4α despite the mechanism leading to their hypersensitivity is incompletely understood. In *Hnf1α*$^{-/-}$ mice, serum concentrations and half-life of sulfonylurea derivatives are strongly increased. We thus hypothesized that reduced sulfonylurea derivatives clearance stands behind their therapeutic potential in human *HNF1A*/*HNF4A* MODY subjects.

Design and Methods: Single doses of 3 mg glipizide and 5 mg glibenclamide/glyburide were administered sequentially to seven *HNF1A*/*HNF4A* MODY subjects and six control individuals matched for their age, BMI and *CYP2C9* genotype. Pharmacokinetic (plasma concentration levels, Cmax, tmax, t1/2, AUC) and pharmacodynamic parameters (glycemia, C-peptide and insulin plasma levels) were followed for 24 hours after drug administration.

Results: We provide the first evidence on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of sulfonylurea derivatives in human MODY subjects. The half-life of glipizide did not change, and reached 3.8±0.7 and 3.7±1.8 h in the MODY and control subjects, respectively. The half-life of glibenclamide was increased only in some MODY subjects (t1/2 9.5±6.7 and 5.0±1.4 h, respectively). Importantly, the intra-individual responses of MODY (but control) subjects to glipizide and glibenclamide treatment were highly correlated. With regards to pharmacodynamics, we observed a differential response of control but not MODY subjects to the doses of glipizide and glibenclamide applied.

Conclusions: We rejected the hypothesis that all human MODY-associated mutations in *HNF1A* / *HNF4A* induce changes in the pharmacokinetics of sulfonylureas in humans analogically to the *Hnf1α*-/- mouse model.

8.

Urbanová, J.; Rypáčková, B.; Kučera, P.; Anděl, M.; Heneberg, P. (2013):

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 β-cells in a family of *HNF1A*–MODY subjects.

International Archives of Allergy and Immunology 161 (3): 279-284; ISSN 1018-2438.

IF 2013: 2,433

rank (2013): allergy 13/21; immunology 87/144

Abstrakt: It was recently suggested that routine islet cell autoantibody testing should be performed to discriminate maturity-onset diabetes of the young (MODY) from type 1 diabetes mellitus (T1DM). This is the first report ever to describe the familial manifestation of T1DM autoimmunity in nonobese *HNF1A*-MODY subjects and the presence of islet antigen-2 (IA-2) antibodies in MODY subjects. Three nonobese subjects in an age range of 14–35 years were diagnosed with *HNF1A*-MODY (p. Arg159Gln mutation). All the tested subjects had detectable (but varying) levels of islet cell autoantibodies (i.e., antibodies against glutamate decarboxylase or IA-2) in the absence of other T1DM characteristics. They displayed long-term expression of intermediate fasting C-peptide levels, ketoacidosis was absent even in periods of spontaneous insulin withdrawal, and full dependence on externally administered insulin was not detected in any of them although better glycemic control was achieved when insulin was supplemented. The course of the disease was similar to that of the autoantibody-negative *HNF1A*-MODY subjects. The case questions the selectivity of autoantibodies as a marker of T1DM or late-onset autoimmune diabetes of adulthood (LADA) over MODY and challenges the use of autoantibodies as a universal negative marker of MODY in an effort to decrease the cost of health care, as it may eventually lead to the wrong diagnosis and thus to the incorrect treatment. Further research should involve examination of the autoantibody titers and prevalence in large and geographically diverse cohorts of MODY subjects selected for genetic testing (regardless of their autoantibody titers) as well as determination of the islet cell autoantibody kinetics in the course of MODY onset and progression.

9.

Urbanová, J.; Rypáčková, B.; Procházková, Z.; Kučera, P.; Černá, M.; Anděl, M.; Heneberg, P. (2014):

Positivity for islet cell autoantibodies in patients with monogenic diabetes is associated with later diabetes onset and higher HbA_{1c} level.

Diabetic Medicine 31 (4): 466-471; ISSN 0742-3071.

IF 2014: 3,115

rank (2014): endocrinology & metabolism 59/128

Abstrakt:

Aims Islet cell autoantibodies are associated with autoimmune insulitis 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 and analyse their functional relevance in terms of diabetes onset and control.

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

Results One quarter of patients with maturity-onset diabetes of the young examined (7/28; 25%) was positive for GAD or IA-2 autoantibodies. GAD autoantibodies were more prevalent (7/7) than IA-2 autoantibodies (1/7). The incidence of autoantibodies did not correlate with human leukocyte antigen status. The patients who were positive for the autoantibodies developed diabetes later than those who were autoantibody-negative, but had worse glycaemic control (increased HbA1c). 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 maturity-onset diabetes of the young and Type 1 diabetes.

Conclusions The data suggest transient but highly prevalent islet cell autoantibody expression in Czech patients with maturity-onset diabetes of the young. 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 b-cell destruction induced by causes other than autoimmune ones.

10.

Heneberg, P.; Šimčíková, D.; Čecháková, M.; Rypáčková, B.; Kučera, P.; Anděl, M. (2018):

Autoantibodies against ZnT8 are rare in Central-European LADA patients and absent in MODY patients, including those positive for other autoantibodies.

Journal of Diabetes and its Complications, on-line first, doi: 10.1016/j.jdiacomp.2018.10.004; ISSN 1056-8727.

IF 2017: 2,792

rank (2017): endocrinology & metabolism 85/143

Abstrakt: Background: Testing for autoantibodies against the zinc transporter ZnT8 (ZnTA) is becoming routine in pediatric diabetes. However, available data are inconclusive when focusing on adult-onset diabetes, including autoimmune diabetes, which does not require insulin at diagnosis (LADA).

Basic procedures: We examined the ZnTA prevalence and titers and matched them with the clinical phenotype and PTPN22 genotypes of Czech LADA patients who were positive for GADA and/or IA2A and had a fasting C-peptide level >200 pmol/L at diagnosis as well as HNF4A-, GCK- or HNF1A-MODY patients and healthy controls.

Main findings: Most LADA patients were negative for ZnTA, and the sensitivity of the assay was only 18-20% for patients with LADA-like progression to insulinotherapy compared to healthy controls. In LADA patients, there was no association between the ZnTA and PTPN22 risk genotypes. LADA patients positive for ZnTA had a lower BMI than those positive for other autoantibodies alone. Importantly, MODY patients were completely negative for ZnTA, and the levels of ZnTA in MODY patients were similar to those in healthy controls.

Conclusions: ZnTA quantification did not improve LADA diagnosis. However, positivity for ZnTA can be used as a negative MODY pre-diagnostic criterion even in the region of Central and East Europe, where other islet cell autoantibodies are common in MODY patients.

11.

Heneberg, P.; Malá, M.; Yorifuji, T.; Gat-Yablonski, G.; Lebenthal, Y.; Tajima, T.; Nogaroto, V.; Rypáčková, B.; Kocková, L.; Urbanová, J.; Anděl, M. (2015):

Low frequencies of autoimmunity-associated *PTPN22* polymorphisms in MODY patients, including those transiently expressing islet cell autoantibodies.

International Archives of Allergy and Immunology 166 (3): 189-198; ISSN 1018-2438.

IF 2015: 2,677

rank (2015): allergy 12/25; immunology 81/151

Abstrakt: ***Background:*** The protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 22 *(PTPN22)* gene encodes lymphoid tyrosine phosphatase (LYP), which is expressed primarily in lymphoid tissues. The functional but geographically highly variable *PTPN22* single-nucleotide polymorphisms (SNPs), particularly c.1858C>T, contribute to the onset and progression of autoimmunity-associated diseases and facilitate the expression of disease-associated autoantibodies. In Central Europe, 17–25% of patients with monogenic diabetes (maturity-onset diabetes of the young, MODY) transiently express islet cell autoantibodies. ***Methods:*** We addressed the links between the functional and geographically variable *PTPN22* SNPs with MODY manifestation and the expression of islet cell autoantibodies in 276 MODY patients who originated from four regions (the Czech Republic, Israel, Japan and Brazil). ***Results:*** The frequency of *PTPN22* polymorphisms in the MODY patients was similar to those in geographically matched healthy populations, with the exception of c.788G>A, the minor allele frequency of which was significantly elevated in the Czech hepatocyte nuclear factor 1-α *(HNF1A)* MODY patients [odds ratio (OR) 4.8, 95% confidence interval (CI) 2.2–10.7] and the Brazilian MODY patients (OR 8.4, 95% CI 1.8–39.1). A barely significant increase in the c.788G>A minor allele was also detected in the islet cell autoantibody-positive Czech MODY patients. However, c.788A behaves as a loss-of-function mutant in T cells, and thus protects against autoimmunity. ***Conclusions:*** MODY patients (including islet cell autoantibody-positive cases) do not display any increase in autoimmunity-associated *PTPN22* alleles. The absence of autoimmunity-associated *PTPN22* alleles was also demonstrated in latent autoimmune diabetes in adults, which suggests that the slow kinetics of the onset of autoantibodies is subject to a regulation that is different from that experienced in type 1 diabetes and other autoimmune disorders.

12.

Heneberg, P.; Kocková, L.; Čecháková, M.; Daňková, P.; Černá, M. (2018):

Autoimmunity-associated *PTPN22* polymorphisms in latent autoimmune diabetes of the adult differ from those of type 1 diabetes patients.

International Archives of Allergy and Immunology, 177 (1): 57–68; ISSN 1018-2438.

IF 2017: 2,437

rank (2017): allergy 17/27; immunology 103/155

Abstrakt: ***Background:*** A portion of adults with humoral immune changes have clinical diabetes that is initially not insulin-requiring (latent autoimmune diabetes of the adult, LADA). One of the genes strongly associated with autoimmune diabetes is *PTPN22*. We hypothesized that the manifestation and clinical features of LADA are linked to functional variants of *PTPN22*. ***Methods:*** We genotyped allelic frequencies of 1 protective and 3 risk-associated *PTPN22* variants in 156 Czech LADA patients, 194 type 2 diabetes mellitus patients with LADA-like progression to insulinotherapy and 324 type 1 diabetes mellitus patients, and subsequently examined the associations of *PTPN22* variants with the expression of autoantibodies and other clinical features of LADA. ***Results:*** We challenged the paradigm that stated that the *PTPN22* c.1858T allele serves as a risk allele for LADA, although we confirmed its risk status in the geographically matched T1DM cohort. In contrast, the frequencies of other *PTPN22* alleles (c.–1123C, c.788A and c.1970-852C) differed significantly from the healthy controls. We confirmed gender-related differences in the frequency of some *PTPN22* polymorphisms (but not c.1858C>T) in LADA. The particular *PTPN22* alleles and genotypes were associated with specific clinical features of the examined patients (autoantibodies, HbA_{1c} and age at diagnosis of diabetes). ***Conclusions:*** The variability in *PTPN22* haplotypes suggests that the genetic signature of LADA is independent and should not be considered a hybrid form of T1DM and T2DM. Further studies should elucidate the associations with clinical characteristics of the LADA patients and focus on the newly emerging types of diabetes with the disease onset in early to mid-adulthood.