



Vzťah polymorfizmov génov *CDKAL1* a *KCNQ1* k veku diagnózy diabetu 2. typu v populácii Slovenska

M. Dobríková¹, M. Javorský¹, V. Habálová², L. Klimčáková², M. Kozárová¹, J. Židzik², J. Halušková², J. Šalagovič², I. Tkáč¹

¹ IV. interná klinika Lekárskej fakulty UPJŠ a Centra excelentnosti pre výskum aterosklerózy a jej komplikácií – srdcového a mozgového infarktu (CEVA) Lekárskej fakulty UPJŠ Košice, Slovenská republika, prednosta prof. MUDr. Ivan Tkáč, PhD.

² Ústav lekárskej biológie Lekárskej fakulty UPJŠ a Centra excelentnosti pre výskum aterosklerózy a jej komplikácií – srdcového a mozgového infarktu (CEVA) Lekárskej fakulty UPJŠ v Košice, Slovenská republika, prednosta prof. RNDr. Ján Šalagovič, PhD.

Súhrn: Úvod/cieľ: Asociácia génov *CDKAL1* a *KCNQ1* s diabetes mellitus 2. typu (DM2T) bola potvrdená viacerými celogénomovými asociačnými štúdiami v kaukazskej aj ázijskej populácii. U oboch génov sa predpokladá vplyv na riziko rozvoja DM2T prostredníctvom poruchy inzulínovej sekrécie. Vychádzali sme z predpokladu, že prítomnosť rizikovej alely môže predisponovať k skoršiemu nástupu DM2T. Cieľom našej štúdie bolo zistiť frekvenciu rizikových alel polymorfizmov rs7756992 génu *CDKAL1* a rs163184 génu *KCNQ1* a analyzovať ich vzťah k veku stanovenia diagnózy DM2T v populácii Slovenska. Metódy: V súbore 538 pacientov s DM2T boli určené genotypy polymorfizmu rs7756992 A/G génu *CDKAL1* a polymorfizmu rs163184 G/T génu *KCNQ1* metódou asymetrickej PCR s následnou analýzou krivky topenia. Antropometrické a laboratórne parametre boli vyšetrené štandardnými metódami. Vzhľadom na analýzu 2 génov bola definovaná požadovaná hladina štatistickej významnosti na hladine $p < 0,025$. Výsledky: Riziková homozygoti (GG) polymorfizmu *KCNQ1* mali v recesívnom modeli o 2 roky vyšší priemerný vek diagnózy DM2T ako nosiči alely T (GT + TT), ale hodnota štatistickej významnosti nedosiahla preddefinovanú úroveň. Pri polymorfizme génu *CDKAL1* nebol pozorovaný signifikantný rozdiel vo veku diagnózy DM2T medzi jednotlivými genotypmi. Záver: V tejto štúdii sme nezistili vzťah medzi sledovanými polymorfizmami génov *CDKAL1* a *KCNQ1* a skorším vekom nástupu DM2T v populácii Slovenska.

Kľúčové slová: diabetes mellitus 2. typu – génové polymorfizmy – *CDKAL1* – *KCNQ1* – vek diagnózy diabetu

Relationship of the *CDKAL1* and *KCNQ1* gene polymorphisms to the age at diagnosis of type 2 diabetes in the Slovakian population

Summary: Background/aims: The association of *CDKAL1* and *KCNQ1* genes with type 2 diabetes mellitus (DM2T) was confirmed by several genome-wide association studies in both Caucasian and Asian populations. For both genes, it is supposed that the risk of DM2T development is related to impaired insulin secretion. Based on assumption that the presence of risk allele might predispose to an earlier onset of DM2T, the aim of the present study was to assess the frequency of risk alleles of *CDKAL1* rs7756992 and *KCNQ1* rs163184 polymorphisms and to analyze their association with the age at DM2T diagnosis in the Slovakian population. Methods: *CDKAL1* rs7756992 A/G and *KCNQ1* rs163184 G/T polymorphisms were genotyped using asymmetric PCR with subsequent melting curve analysis in a group of 538 patients with DM2T. Anthropometric and laboratory parameters were determined by using standard methods. Since two genes were analysed, the required level for statistical significance was defined as $p < 0.025$. Results: Risk homozygotes (GG) for *KCNQ1* polymorphism had higher mean age of DM2T diagnosis by 2 years when compared to T-allele carriers (GT + TT) in a recessive model, but the difference did not reach the predefined level of statistical significance. No relationship of *CDKAL1* polymorphism to the age at onset of DM2T diagnosis was observed. Conclusions: In the present study, no relationship of *CDKAL1* and *KCNQ1* polymorphisms to the earlier onset of type 2 diabetes was observed.

Key words: type 2 diabetes mellitus – gene polymorphisms – *CDKAL1* – *KCNQ1* – age at diagnosis of diabetes

Úvod

Diabetes mellitus 2. typu (DM2T) je komplexné ochorenie. Na jeho etio-patogenézu sa podieľajú viaceré gény s malým účinkom, medzigénové interakcie, ako aj environmentálne vplyvy. V minulosti sa na zisťovanie genetických faktorov komplexných ochorení používali prístupy identifikácie kandidátskych génov a väzobnej analýzy. Posledné roky sa do popredia dostali celogénomové aso-

ciálne štúdie (genome-wide association studies), ktoré umožnili identifikovať veľké množstvo významných asociácií medzi určitými chromozómovými lokusmi a komplexnými ochoreniami. Prostredníctvom nich boli potvrdené asociácie DM2T s predtým identifikovanými kandidátskymi génmi – *TCF7L2*, *PPARG*, *KCNJ11* a bolo objavených viac ako 20 nových génov, ktorých polymorfizmy sú spojené so zvýšeným rizikom

rozvoja DM2T, medzi nimi aj gény *CDKAL1* a *KCNQ1*.

CDKAL1 kóduje inhibítor cyklín dependentnej kinázy 5 (CDK5). Aktívny komplex p35/CDK5 znižuje inzulínovú expresiu. Inhibícia aktivity tohto komplexu bráni deštrukcii β -buniek počas glukotoxických stavov [1]. Niektorí vedci predpokladajú, že patomechanizmus vedúci k rozvoju DM2T je v prítomnosti rizikových polymorfizmov tohto génu sprostredko-



vaný prostredníctvom porušenej regulácie bunkového cyklu [2]. Viaceré štúdie dokázali vplyv jeho polymorfizmov na zníženie inzulínovej sekrécie [3–6]. Niektoré publikácie poukazujú u určitých variácií tohto génu na porušenie konverziu proinzulínu na inzulín [7,8].

Gén *KCNQ1* kóduje podjednotku napätím regulovaného (voltage-dependent) draslíkového kanála nachádzajúceho sa v pankreatických a myokardiálnych bunkách. Práce Unokiho et al poukazujú na najväčšiu expresiu *KCNQ1* v srdci, pankrease, vo vnútornom uchu a v menšom množstve aj v plúcach, pečeni a obličkách [9]. Tento draslíkový kanál sa nachádza aj v bunkových kultúrach INS-1 produkujúcich inzulín, keďže inhibícia tohto kanála sulfónamidovým analógom spôsobuje zvýšenie inzulínovej sekrécie v prítomnosti tolbutamidu [10]. U laboratórnych zvierat so zníženou funkciou tohto génu sa nepozorovala hyperglykémia ani glukózová intolerancia. Preto sa predpokladá, že za rozvoj DM2T je zodpovedná zvýšená expresia tohto génu v pankreatických β -bunkách.

Polymorfizmy *KCNQ1* boli asociované s DM2T vo východoázijskej aj kaukazskej populácii, pričom vyšší vplyv na riziko DM2T bol dokumentovaný v ázijskej populácii [9,11,12]. V jednej štúdii bola pozorovaná asociácia niektorých polymorfizmov *KCNQ1* so znížením inkretínovej sekrécie [13].

Pri géne *TCF7L2*, ktorý je tesne asociovaný s DM2T, bolo zistené, že nosiči rizikových alel majú skorší vek nástupu diabetu [14–16]. Vo vzťahu ku génom *CDKAL1* a *KCNQ1* nám štúdie analyzujúce vzťah genotypu ku veku diagnózy diabetu nie sú známe. Cieľom našej štúdie bolo zistiť frekvenciu rizikových polymorfizmov a analyzovať vzťah polymorfizmu rs7756992 génu *CDKAL1* a polymorfizmu rs163184 génu *KCNQ1* na vek nástupu DM2T v populácii Slovenska.

Tab. 1. Klinická charakteristika pacientov s DM2T.

Počet	538
ženy (%)	53
vek (roky)	62 (55–70)
vek nástupu T2DM (roky)	54 (48–62)
váha (kg)	84 (75–96)
výška (cm)	168 (161–173)
BMI (kg/m ²)	30,1 (27,3–33,3)
obvod pásu (cm)	103 (96–113)
obvod bokov (cm)	111 (105–120)
WHR	0,90 (0,86–0,97)
systolický tlak (mm Hg)	140 (130–160)
diastolický tlak (mm Hg)	80 (80–90)
glykémia nalačno (mmol/l)	7,5 (6,3–9,4)
HbA _{1c} (%)*	5,2 (4,5–6,3)
celkový cholesterol (mmol/l)	4,6 (4,0–5,5)
LDL-cholesterol (mmol/l)	2,6 (2,1–3,1)
triacylglyceroly (mmol/l)	1,6 (1,2–2,1)
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,2 (1,0–1,4)
liečba DM2T	
• diétno-režimové opatrenia (%)	16
• perorálne antidiabetiká (%)	66
• inzulín (%)	18

Údaje sú uvedené ako medián (25.–75. percentil) alebo v %.

*HbA_{1c} – podľa štandardu IFCC: horná hranica normy 4,2 % (zodpovedá 6,0 % podľa štandardu DCCT).

Metódy Pacienti

Do štúdie bolo zaradených 538 pacientov s DM2T dispenzarizovaných v 3 ambulanciách východného Slovenska (Košice, Prešov). Diagnóza bola založená na diagnostických kritériách Americkéj diabetologickej spoločnosti [17]. Do štúdie neboli zaradení diabetici s dokázanou autoimunitnou etiológiou alebo špecifickými typmi diabetu.

Anamnestické údaje boli získané zo zdravotnej dokumentácie a antropometrické vyšetrenie (výška, váha, obvod pásu, bokov, systolický a diastolický krvný tlak) bolo doplnené v rámci bežnej diabetologickej kontroly. Ďalej bol odobratý materiál na zistenie laboratórnych údajov (glykémia nalačno, glykovaný hemoglobín, lipidový profil) a materiál na stanovenie DNA. Klinická charakteristika subjektov štúdie je uvedená v tab. 1. Účastníci vyjadrili informovaný súhlas s účasťou v štúdii a štúdia bola schválená etickou komisiou Fakultnej nemocnice L. Pasteura v Košiciach.

Genotypizácia

Genomická DNA bola izolovaná z periférnych leukocytov použitím súpravy Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA).

Genotypizácia pri polymorfizme rs7756992 *CDKAL1* bola realizovaná pomocou PCR-RFLP za použitia primerov: forward-primer: 5'-CACTTCAGCCTCCCTAGTATCTA-3'; reverse-primer: 5'-TTTAACACACAA-GAATCCATAATCC-3'. Produkt PCR sa štiepil reštrikčnými endonukleázami Bgl II (New England BioLabs). Produkty štiepenia boli separované na 2% agarózovom géli, G alela bola detekovaná ako fragment dĺžky 599 bp, A alela v podobe fragmentov 463 bp a 136 bp.

Genotypizácia polymorfizmu rs163184 génu *KCNQ1* bola realizovaná na prístroji LightCycler 1.5 (Roche Applied Science, Nemecko) asymetrickou polymerázovou reťazovou reakciou s neznačenou sondou v prítomnosti farbiva LC Green Plus, s následnou analýzou krivky topenia.

Tab. 2. Frekvencie genotypov a rizikových alel pri polymorfizmoch génov *CDKAL1* a *KCNQ1* u pacientov s DM2T.

Gén polymorfizmus	Genotyp	RAF (G)	HWE (p)
<i>CDKAL1</i> rs7756992 A/G	n AA AG GG		
	486 222 (46 %) 222 (46 %) 42 (8 %)	0,31	0,19
<i>KCNQ1</i> rs163184 G/T	n GG GT TT		
	538 146 (27 %) 261 (49 %) 131 (24 %)	0,51	0,50

Podčiarknutá alela je riziková v asociácii s DM2T, RAF – frekvencia rizikovej alely, HWE – Hardy-Weinbergova rovnováha

Boli použité primery: forward-5'-CTT-TGCTCTGTAAACGGACTGGACCA-3'; reverse-5'-TCTGTGGAAAGGGGTT-GCCATGC-3'. V reakcii bola aj neznáčená sonda blokována na 3' konci fosfátom prekrývajúca polymorfne miesto: 5'-TATGGAGTTTGGAG-TAAAGAGAGA[Phos]3'. Heterozygoti boli rozpoznávaní na základe odlišného tvaru krivky topenia a rôzne typy homozygotov na základe odlišnej teploty topenia (T_m), pričom genotyp GG mal nižšiu teplotu topenia ako genotyp TT.

Štatistická analýza

Pri analýze štatistickej sily štúdie sme vychádzali z očakávaného rozdielu

3 rokov vo veku diagnózy diabetu medzi nosičmi rizikových alel sledovaných génov. Na dosiahnutie štatistickej sily nad 80% pri tomto rozdiel bolo potrebné zaradenie 500 pacientov do štúdie. Vzhľadom na fakt, že sme vykonali analýzu 2 génov, sme po Bonferroniho korekcii definovali požadovanú štatistickú významnosť na hladine $p < 0,025$. Hardyho-Weinbergovu rovnováhu sme testovali pomocou χ^2 -testu. Porovnanie priemerného veku nástupu diabetu pri jednotlivých polymorfizmoch bolo vykonané za použitia analýzy rozptylu (ANOVA) alebo nepárového t-testu. Na výpočty boli použité programy SPSS v.15 (SPSS, Chicago, IL, USA) a SNPstats [18].

Tab. 3. Vek diagnózy DM2T v jednotlivých genotypových skupinách sledovaných polymorfizmov.

Gén polymorfizmus	Genetický model	Počet pacientov	Porovná- vané geno- typy	Vek diagnózy DM2T	p
<i>CDKAL1</i> rs7756992 A/G	dominantný	222	AA	54,6 ± 10,4	0,84
		264	AG+GG	54,8 ± 10,0	
	aditívny	222	AA	54,6 ± 10,4	0,88
		42	GG	55,3 ± 11,0	
	recesívny	444	AA+AG	54,6 ± 10,1	0,62
		42	GG	55,4 ± 11,0	
<i>KCNQ1</i> rs163184 G/T	dominantný	397	GG+GT	55,9 ± 10,1	0,65
		131	TT	54,5 ± 10,5	
	aditívny	146	GG	56,3 ± 10,7	0,13
		261	GT	54,2 ± 9,7	
	recesívny	131	TT	54,5 ± 10,4	0,05
		392	GT+TT	54,3 ± 10,0	
		146	GG	56,3 ± 10,7	

Podčiarknutá alela je riziková. Údaje sú uvedené ako priemer ± štandardná odchýlka.

Výsledky

Frekvencie jednotlivých genotypov sledovaných polymorfizmov génov *CDKAL1* a *KCNQ1* boli v Hardy-Weinbergovej rovnováhe. Frekvencia rizikovej alely G polymorfizmu rs7756992 *CDKAL1* bola 31%, kým pri polymorfizme rs163184 *KCNQ1* bola frekvencia rizikovej alely G 51% (tab. 2).

Pri oboch polymorfizmoch nebol zistený vplyv rizikovej alely na včasnnejší vek diagnózy DM2T v žiadnom z testovaných genetických modelov – aditívnom, dominantnom ani recesívnom.

Pri polymorfizme rs163184 génu *KCNQ1* bol v recesívnom modeli u rizikových homozygotov (GG) pozorovaný v rozpore s predpokladom o 2 roky vyšší priemerný vek nástupu DM2T ako u nosičov alely T (GT + TT), ale tento rozdiel nedosiahol preddefinovanú hladinu štatistickej významnosti. Podobne aj pri polymorfizme génu *CDKAL1* nedosahovali rozdiely v priemernom veku nástupu DM2T medzi jednotlivými genotypovými skupinami štatistickú významnosť v žiadnom z testovaných genetických modelov (tab. 3).

Diskusia

V tejto štúdii sme nezistili signifikantnú asociáciu rizikových alel polymorfizmov génov *KCNQ1* a *CDKAL1* s včasnnejším vekom diagnózy DM2T v populácii Slovenska.

Polymorfizmus rs163184 génu *KCNQ1* bol podľa dostupnej literatúry sledovaný len v japonskej populácii, v ktorej bola frekvencia rizikovej alely 58%, čo bolo spojené so zvýšením rizika rozvoja DM2T o 33% [11]. Frekvencia rizikovej alely v našej vzorke pacientov s DM2T (51%) bola o trochu nižšia ako frekvencia v japonskej populácii.

Riziková alela polymorfizmu rs756992 génu *CDKAL1* bola asociovaná so zvýšeným rizikom rozvoja DM2T v kaukazskej populácii o 20% [6], kým v ázijskej populácii o 25–38% [3,4]. V kaukazskej populácii bola táto alela zastúpená v 25% a v ázijskej populácii

cii dosahovala jej frekvencia 42–50 % [3,4,6]. Zastúpenie rizikovej alely polymorfizmu rs756992 v našej populácii (31 %) je podobné frekvencii rizikovej alely referovanej v kaukazskej populácii.

Z doteraz identifikovaných génov bol v predchádzajúcich štúdiách pozorovaný signifikantný efekt génu *TCF7L2* na nižší vek nástupu DM2T [14–16]. Vo francúzskej populácii mali rizikovní homozygoti TT v priemere o 2,4 roka skorší nástup DM2T v porovnaní s nerizikovými homozygotmi CC [14]. Podobne v štúdii GoDARTs, vykonanej na škótskej populácii, bol zistený signifikantný rozdiel medzi homozygotmi TT a CC génu *TCF7L2* vo veku diagnózy DM2T, ktorý predstavoval v priemere 1,4 roka [16].

Vysvetlenie chýbania efektu sledovaných polymorfizmov na včasnejší vek nástupu DM2T môže súvisieť so slabšou asociáciou týchto génov s DM2T ako pri géne *TCF7L2*, ktorý má zo všetkých doteraz identifikovaných kandidátskych génov najtesnejšiu asociáciu s DM2T, keď riziko per alellam pri polymorfizme rs7901346 bolo v celogenómových asociačných štúdiách zvýšené skoro o 40 % [19].

Obmedzením tejto štúdie môže byť jej nedostatočná štatistická sila vyplývajúca z faktu, že pozorované rozdiely v priemerných hodnotách veku diagnózy DM2T boli nižšie ako očakávané rozdiely. Keďže gény *CDKAL1* a *KCNQ1* majú výraznejší vplyv na rozvoj DM2T v ázijskej populácii ako v kaukazskej (vyššia frekvencia rizikovej alely, vyššie riziko per alellam), na dôkaz asociácií v našej populácii môžu byť potrebné vyššie počty sledovaných subjektov. Ďalšiu limitáciu by mohla predstavovať skutočnosť, že vek diagnózy DM2T sa nemusel vždy zhodovať s vekom nástupu ochorenia. Vplyv tejto chyby však bol pravdepodobne rovnaký vo všetkých genotypových skupinách.

Záver

V súhrne možno konštatovať, že v prezentovanej štúdii nebol pozorovaný vzťah medzi polymorfizmami génov *CDKAL1* a *KCNQ1* a skorším vekom nástupu DM2T v populácii Slovenska.

Táto publikácia bola vytvorená za podpory grantu VEGA 1/0380/10 (50 %) a realizáciou projektu „Centrum excelentnosti pre výskum aterosklerózy a jej komplikácií – srdcového a mozgového infarktu (CEVA)“ na základe Operačného programu výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja (50 %).

Literatúra

1. Ubeda M, Rukstalis JM, Habener JF. Inhibition of cyclin-dependent kinase 5 activity protects pancreatic beta cells from glucotoxicity. *J Biol Chem* 2006; 281: 28858–28864.
2. Ridderstråle M, Groop L. Genetic dissection of type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 297: 10–17.
3. Tabara Y, Osawa H, Kawamoto R et al. Replication study of candidate genes associated with type 2 diabetes based on genome-wide screening. *Diabetes* 2009; 58: 493–498.
4. Wu Y, Li H, Loos RJ et al. Common variants in *CDKAL1*, *CDKN2A/B*, *IGF2BP2*, *SLC30A8*, and *HHEX/IDE* genes are associated with type 2 diabetes and impaired fasting glucose in a Chinese Han population. *Diabetes* 2008; 57: 2834–2842.
5. Horikoshi M, Hara K, Ito C et al. Variations in the *HHEX* gene are associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia* 2007; 50: 2461–2466.
6. Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Reynisdottir I et al. A variant in *CDKAL1* influences insulin response and risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2007; 39: 770–775.
7. Kirchhoff K, Machicao F, Haupt A et al. Polymorphisms in *TCF7L2*, *CDKAL1* and *SLC30A8* genes are associated with impaired proinsulin conversion. *Diabetologia* 2008; 51: 597–601.
8. Stančáková A, Kuulasmaa T, Paananen J et al. Association of 18 confirmed susceptibility loci for type 2 diabetes with indices of insulin release, proinsulin conversion, and insulin sensitivity in 5327 non-diabetic Finnish men. *Diabetes* 2009; 58: 2129–2136.
9. Unoki H, Takahashi A, Kawaguchi T et al. SNPs in *KCNQ1* are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian

and European populations. *Nat Genet* 2008; 40: 1098–1102.

10. Ullrich S, Su J, Ranta F et al. Effects of I(Ks) channels inhibitors in insulin-secreting INS-1 cells. *Pflugers Arch* 2005; 451: 428–436.

11. Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y et al. Variants in *KCNQ1* are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 2008; 40: 1092–1097.

12. Lee Y, Kang ES, Kim SH et al. Association between polymorphisms in *SLC30A8*, *HHEX*, *CDKN2A/B*, *IGF2BP2*, *FTO*, *WFS1*, *CDKAL1*, *KCNQ1* and type 2 diabetes in the Korean population. *J Hum Genet* 2008; 53: 991–998.

13. Müssig K, Staiger H, Machicao F et al. Association of type 2 diabetes candidate polymorphisms in *KCNQ1* with incretin and insulin secretion. *Diabetes* 2009; 58: 1715–1720.

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

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

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

17. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20: 1183–1197.

18. Solé X, Guinó E, Valls J et al. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006; 22: 1928–1929.

19. Tong Y, Lin Y, Zhang Y et al. Association between *TCF7L2* gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis. *BMC Med Genet* 2009; 10: 15.

prof. MUDr. Ivan Tkáč, PhD.
www.fnlp.sk
e-mail: ivantkac@lf.upjs.sk

Doručeno do redakcie: 15. 4. 2010
Prijato po recenzi: 23. 11. 2010