



UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI
WYDZIAŁ LEKARSKI

**PODŁOŻE GENETYCZNE NIEZDEFINIOWANYCH
MONOGENOWYCH FORM CUKRZYCY**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej

mgr Paulina Jakiel

Promotor: prof. dr hab. n.med. Maciej Borowiec

Praca wykonana w Zakładzie Genetyki Klinicznej,
Katedry Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. n. med. Agnieszka Zmysłowska

Łódź, 2023

7. STRESZCZENIE

Wstęp: Cukrzyca to grupa chorób metabolicznych charakteryzujących się hiperglikemią wynikającą z defektów wydzielania bądź działania insuliny. Zgodnie z klasyfikacją zaproponowaną przez Światową Organizację Zdrowia (WHO), jednym z typów cukrzycy jest cukrzyca monogenowa (ang. *monogenic diabetes* - MD), spowodowana mutacjami pojedynczych genów związanych z funkcjonowaniem komórek β trzustki, w tym cukrzyca typu MODY (ang. *maturity-onset diabetes of the young*), cukrzyca noworodkowa (ang. *neonatal diabetes mellitus* - NDM) oraz syndromiczne formy cukrzycy. Szacuje się, że monogenowe formy cukrzycy stanowią około 2,5% do 6% wszystkich przypadków. Cukrzyca typu MODY jest najczęstszą postacią MD. Do tej pory zidentyfikowano 14 różnych genów, które są związane z występowaniem fenotypu MODY. Jednakże liczba potencjalnych genów kandydujących, mających związek z funkcją komórek β i metabolizmem glukozy, mogących odpowiadać za rozwój choroby u pacjentów z podejrzeniem cukrzycy monogenowej wzrasta w miarę publikowania kolejnych badań.

Cel pracy: Celem badania była identyfikacja potencjalnie sprawczych wariantów w wytypowanych genach kandydackich, u pacjentów z klinicznym obrazem cukrzycy monogenowej o niezdefiniowanym podłożu molekularnym.

Material i metody: Grupę badaną stanowiło 994 pacjentów skierowanych w latach 2016-2022 do Poradni Genetyki Klinicznej w Łodzi z 12 Polskich Centrów Diabetologicznych z podejrzeniem cukrzycy monogenowej. Materiałem do badań był DNA wyizolowany z limfocytów krwi obwodowej. W pierwszym etapie u wszystkich pacjentów z grupy badanej przeprowadzono sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) na platformie Illumina NextSeq 550 z wykorzystaniem zestawu odczynników SureSelect QXT (Agilent, SantaClara, USA) i przeanalizowano panel 15 genów, w których obecność patogennych wariantów odpowiada za rozwój cukrzycy monogenowej, w tym *HNF4A*, *GCK*, *HNF1A*, *PAX4*, *HNF1B*, *NEUROD1*, *APPL1*, *KLF11*, *CEL*, *BLK*, *PDX1*, *ABCC8*, *KCNJ11*, *INS* i *WFS1*. Następnie wyniki uzyskane od pacjentów, którzy byli negatywni pod względem obecności patogennych wariantów w 15 badanych genach, poddano ponownej analizie i poszukiwano potencjalnie sprawczych wariantów w dziewięciu genach, wytypowanych jako geny kandydackie, potencjalnie odpowiedzialne za rozwój cukrzycy typu MODY-X: *MTOR*, *TBC1D4*, *CACNA1E*, *MNX1*, *SLC19A2*, *KCNH6*, *RFX6*, *NKX2-2*, *NKX6-1*. Obecność zidentyfikowanych wariantów w genach kandydackich została potwierdzona sekwencjonowaniem metodą Sangera.

Wyniki: Patogenne lub prawdopodobnie patogenne warianty zidentyfikowano u 377 (37,9%) spośród 994 pacjentów z grupy badanej, w 8 znanych genach odpowiedzialnych za rozwój cukrzycy monogenowej.

Reanaliza wyników uzyskanych z sekwencjonowania 617 pacjentów, u których w pierwszym etapie nie wykryto wariantów patogennych w 15 badanych genach, pozwoliła na identyfikację 13 heterozygotycznych, potencjalnie sprawczych wariantów w wytypowanych genach kandydackich. Trzy z nich wykryto w genie *MTOR*, jeden w genie *TBC1D4*, dwa w genie *CACNA1E*, jeden w genie *MNX1*, trzy w genie *RFX6*, dwa w genie *NKX2-2* oraz jeden w genie *NKX6-1*. W genach *SLC19A2* i *KCNH6* nie zidentyfikowano żadnego wariantu, który mógłby być odpowiedzialny za wystąpienie cukrzycy MODY w badanej grupie pacjentów.

Wnioski: W niniejszym badaniu wykazano wysoką częstość występowania cukrzycy monogenowej, spowodowanej obecnością patogennych wariantów w zdefiniowanych genach związanych z cukrzycą MODY. Wykonanie wielogenowego badania panelowego przy użyciu metody NGS pozwoliło na zidentyfikowanie trzynastu heterozygotycznych, potencjalnie sprawczych wariantów w genach kandydackich *MTOR*, *TBC1D4*, *CACNA1E*, *MNX1*, *RFX6*, *NKX2-2* oraz *NKX6-1*. Ostateczne potwierdzenie wpływu wybranych genów kandydackich na wystąpienie fenotypu cukrzycy MODY wymaga przeprowadzenia badań na większej grupie nosicieli wariantów oraz wykonania analizy segregacji w rodzinach bądź badań funkcjonalnych.

8. ABSRTRACT

Introduction: Diabetes mellitus is a group of metabolic diseases characterised by hyperglycaemia resulting from defects in insulin secretion or action. According to the classification proposed by the World Health Organisation (WHO), one type of diabetes is monogenic diabetes (MD) caused by mutation of single genes related to pancreatic β -cell function, including maturity-onset diabetes of the young (MODY), neonatal diabetes mellitus (NDM) and syndromic forms of diabetes. It is estimated that monogenic forms of diabetes account for approximately 2.5% to 6% of all cases. MODY diabetes is the most common form of MD. To date, 14 different genes have been identified that are associated with the MODY phenotype. However, the number of potential candidate genes implicated in beta-cell function and glucose metabolism that may be responsible for the development of the disease in patients with suspected monogenic diabetes is increasing as more studies are published.

Aims of study: The aim of this study was to identify potentially causative variants in selected candidate genes, in patients with a clinical presentation of monogenic diabetes with an undefined molecular background.

Material and methods: The study group consisted of 994 patients, referred between 2016 and 2022 to the Centre for Rare Diseases in Lodz from 12 Polish Diabetes Centres with suspected monogenic diabetes. The study material was DNA isolated from peripheral blood lymphocytes. In the first stage, next-generation sequencing (NGS) was performed on an Illumina NextSeq 550 platform using SureSelect QXT reagent kit (Agilent, Santa Clara, USA) for all patients in the study group and, a 15-gene panel for MD including *HNF4A*, *GCK*, *HNF1A*, *PAX4*, *HNF1B*, *NEUROD1*, *APPL1*, *KLF11*, *CEL*, *BLK*, *PDX1*, *ABCC8*, *KCNJ11*, *INS* and *WFS1* was analyzed. In the next step, the sequencing data of patients with no pathogenic variants in the 15 studied genes were reanalyzed for the presence of causative variants in nine candidate genes, potentially responsible for the development of MODY-X diabetes: *MTOR*, *TBC1D4*, *CACNA1E*, *MNX1*, *SLC19A2*, *KCNH6*, *RFX6*, *NKX2-2*, *NKX6-1*. The presence of identified variants in candidate genes was confirmed by Sanger sequencing.

Results: Pathogenic or likely pathogenic variants were identified in 377 (37.9%) of the 994 patients in the study group in the 8 known genes responsible for the development of monogenic diabetes.

Re-analysis of the results obtained from the sequencing of 617 patients in whom no pathogenic variants were detected in the 15 genes analysed in the first step allowed the identification of 13 heterozygous, potentially causative variants in selected candidate genes. Three of these were identified in the *MTOR* gene, one in the *TBC1D4* gene, two in the *CACNA1E* gene, one in the *MNX1* gene, three in the *RFX6* gene, two in the *NKX2-2* gene and one in the *NKX6-1* gene. No variant was identified in the *SLC19A2* and *KCNH6* genes that could be responsible for the onset of MODY diabetes in the group of patients studied.

Conclusions: This study demonstrated a high prevalence of monogenic diabetes due to the presence of pathogenic variants in defined genes associated with MODY diabetes. A multigene panel study using the NGS method identified thirteen heterozygous, potentially causative variants in the candidate genes *MTOR*, *TBC1D4*, *CACNA1E*, *MNX1*, *RFX6*, *NKX2-2* and *NKX6-1*. Definitive confirmation of the impact of selected candidate genes, on the occurrence of the MODY diabetes phenotype, requires studies on a larger group of variant carriers and the performance of segregation analysis in families or functional studies.