
Kartläggningen av en typ 2-diabetesgen associerad med nedsatt insulinsekretion

Är NIDDM2 och MODY3 alleler av samma gen?

Elisabeth Widén och Markku Lehto

Typ 2-diabetes som är den vanligaste formen av diabetes drabbar över 100 miljoner människor runtom i världen. Det har länge varit känt att sjukdomen har en betydande genetisk komponent. Trots detta har inte en enda gen som förorsakar den vanliga formen av typ 2-diabetes kunnat isoleras. Hittills har endast två typ 2-diabetesgener lokaliserats – bägge under de senaste månaderna. Den första genen kartlades av en nordamerikansk forskargrupp som undersökt en population av mexikanska amerikaner. I ett samarbete mellan Helsingfors universitet, Lunds universitet och Whitehead-institutet vid MIT i USA lokaliserade vår forskargrupp den andra genen för typ 2-diabetes (NIDDM2). Vi fann att finländska familjer med låg insulinsekretion uppvisade koppling till en region på kromosom 12q. Tidigare hade genen för en ovanlig form av diabetes, MODY3, lokaliserats till exakt samma kromosomregion. Detta sporrade oss att undersöka insulinsekretionen också hos patienter med MODY3. Det visade sig att både MODY3 och NIDDM2 karakteriseras av nedsatt insulinsekretion även om störningen är gravare vid MODY3. Däremot förelåg det en avsevärd skillnad i åldern för sjukdomsdebuten. Sjukdomen debuterade i 25-årsåldern i familjerna med MODY3 till skillnad från familjerna med NIDDM2, där patienterna var 30 år äldre när de insjuknade. Resultatet är förenligt med hypotesen att MODY3 och NIDDM2 representerar relaterade men distinkta former av diabetes. Därför föreslår vi att de utgör olika alleler av samma gen. Enligt denna hypotes skulle en MODY3-mutation resultera i en gravare störning av insulinsekretionen. Följden av detta skulle innebära en tidigare sjukdomsdebut jämfört med NIDDM2.

Resultaten från tvilling-, familje- och populationsstudier är förenliga med antagandet att typ 2-diabetes har en genetisk komponent. Barnett och medarbetare visade att konkordansen för typ 2-diabetes är över 90 procent hos monozygota tvillingar (1). Detta fynd stöds av en studie av Newman et al (2). I den uppgick konkordansen för typ 2-diabetes till 58 procent vid den första undersökningen. Anmärkningsvärt var att endast ett av femton monozygota tvillingpar förblev diskordant vid en senare undersökning (2). Ty-

vär finns det inga omfattande studier som skulle ha jämfört konkordansen för monozygota och dizygota tvillingar. Däremot finns det undersökningar som visar att barn och syskon till typ 2-diabetiker har en 2–4-faldig risk att insjukna i typ 2-diabetes jämfört med personer som saknar släktbelastning för typ 2-diabetes (3). En genetisk faktor kunde ytterligare förklara de skillnader i prevalens för typ 2-diabetes som föreligger mellan olika etniska grupper. I de flesta länder i västvärlden är prevalensen för typ 2-diabetes

3–5 procent (4, 5, 6). Däremot är prevalensen så hög som 30 procent i vissa isolerade indianpopulationer i Nordamerika (7). Ett annat exempel på en population med extremt hög prevalens för typ 2-diabetes är invånarna på ön Nauru. Också i denna population uppgår prevalensen till 30 procent (8).

Trots den kända ärftliga benägenheten är nedärvningsmönstret för typ 2-diabetes i de flesta fall oklart. Undantaget utgörs av en form av typ 2-diabetes som karakteriseras av insjuknande i ung ålder. Denna form av diabetes kallas för MODY (maturity-onset diabetes of the young) och den har en autosomal dominant nedärvning. Traditionellt sett baserar sig MODY diagnosen på följande familjekarakteristika: det bör finnas typ 2-diabetes i minst två generationer och minst 2 personer med sjukdomsdebut före 25 års ålder i familjen. Endast ca 5 procent av alla typ 2-diabetiker har MODY-diabetes. Vad den vanliga for-

FÖRFATTARNA

Elisabeth Widén är medicine doktor från Helsingfors universitet 1993. För närvarande är hon forskarassistent vid Lunds universitet.

Markku Lehto är biokemist, fil. mag. från Helsingfors universitet och för närvarande doktorand vid Lunds universitet.

men av typ 2-diabetes beträffar är nedärvingen varken entydigt recessiv eller dominant. I detta avseende liknar typ 2-diabetes andra vanliga sjukdomar, bl.a. astma, blodtryckssjukdom och reumatoid artrit som också antas ha en multifaktoriell bakgrund. Ett "komplex" nedärvningsmönster kan uppkomma till följd av geninteraktion eller miljöfaktors inverkan. Det är naturligt att komplexiteten avsevärt kan försvåra försöken att identifiera generna för dessa multifaktoriella sjukdomar. För en översikt se Lander och Shork (9).

På vilket sätt kan gener för typ 2-diabetes bäst identifieras?

Flertalet försök att identifiera typ 2-diabetesgener har baserat sig på undersökning av kandidatgener. Dessa är kända gener som är involverade i glukosmetabolism eller insulinsekretion. Problemet med denna metod är att de metabola signalsystem som är involverade i upprätthållandet av normal glukoshomeostas är mycket invecklade och delvis okända. Dessutom har patienter med typ 2-diabetes flera omfattande metabola störningar: 1) nedsatt insulinkänslighet i tvärstrimmig muskelvävnad, 2) förhöjd glukosproduktion i levern och 3) en störning i insulinsekretionen (10).

Genom att undersöka personer med ökad risk för typ 2-diabetes har man försökt ringa in den fysiologiska defekt som initierar utvecklingen av typ 2-diabetes. Detta har inte lett till något enhetligt slutresultat. Både nedsatt insulinkänslighet (insulinresistens) (11–14) och störning i insulinsekretionen (15–18) har föreslagits vara den primära defekt som leder till typ 2-diabetes.

Den största framgång som nåtts med undersökning av kandidatgener är identifieringen av mutationer i glukokinasgenen som förorsakar MODY2 (maturity-onset diabetes of the young typ 2) (19, 20). Karakteristiskt för MODY2 är förutom en tidig sjukdomsdebut också lindrig hyperglykemi. De identifierade mutationerna kan sänka glukokinasenzymets affinitet för glukos, vilket leder till ett försämrat insulinsekretionssvar på glukos och hyperglykemi som följd. Hittills har

undersökningen av kandidatgener inte lett till något stort genombrutt visavi den vanliga formen av typ 2-diabetes med sjukdomsdebut efter 40-års åldern.

En metod som under de senaste åren i ökande grad använts vid undersökningen av multifaktoriella sjukdomar är s.k. "random gene search" med genomscan (9). Här strävar man till att identifiera gener endast utifrån deras lokalisering i genomet oberoende av deras funktion. Då nedärvningsmönstret för de multifaktoriella sjukdomarna inte är känt används oftast nonparametriska, d.v.s. icke-modellbaserade metoder vid data-analys. Hittills har två grupper publicerat resultat från försök att med genomscan kartlägga s.k. typ 2-diabetesgener. Det första kartlagda lokuset *NIDDM1* rapporterades i juni detta år.

NIDDM1 är kartlagt i en population av mexikansk-amerikanska syskonpar med typ 2-diabetes i Starr County, Texas (21). I september 1996 publicerade vi kartläggningen av *NIDDM2* i Österbotten (22), ett arbete som utförts i samarbete med professor Eric Lander och medarbetare vid Whitehead-institutet i Cambridge, MA. I andra dataset har hittills inte kopplingen till vare sig *NIDDM1* eller *NIDDM2* konfirmerats.

Vår avsikt är att här presentera en översikt av våra publicerade resultat, dvs. kartläggningen *NIDDM2* (22). Dessutom presenterar vi en klinisk jämförelse av *MODY3* och *NIDDM2* (23).

Metoder: valet av familjer samt screeningen av genomet

Samtliga familjer som vi studerat är bosatta i Österbotten. Utifrån vad som är känt om Finlands kolonisationshistoria och befolkningsstruktur antog vi att denna population är relativt homogen. Befolkningen i Finland antas härstamma från ett litet antal individer som bosatte sig i södra Finland för ca 100 generationer sedan (24, 25). Sedan dess har befolkningen ökat i storlek så gott som utan inflyttning utifrån. Vid vilken tidpunkt Österbotten har befolkats är något oklart. Med säkerhet har det dock funnits bosättning där sedan mitten av 1300-talet (26). För-

delen med att kartlägga gener för en multifaktoriell och komplex sjukdom i en isolerad och homogen population som i Österbotten, är att också en multifaktoriell sjukdom i en sådan population kan förväntas vara relativt homogen. I kombination med noggrann klinisk karakterisering av patienterna kan detta utgångsläge förmodas ge oss utmärkta förutsättningar att kartlägga gener för typ 2-diabetes. Vi valde att utnyttja denna tillgång för att i så hög grad som möjligt identifiera en homogen grupp av typ 2-diabetiker med stark genetisk predisposition för diabetes. Sälunda ställde vi upp egna kriterier för definition av typ 2-diabetes samt kriterier för inklusion av familjer.

Diagnos av typ 2-diabetes

Eftersom fasteblodglukos har en kontinuerlig distribution, är det inte entydigt vilken blodglukosnivå som är att föredra vid diabetesklassificering i en genetisk studie. WHO definierar diabetes arbiträrt enligt fasteblodglukos $\geq 6,7$ mmol/l eller blodglukos $\geq 10,0$ mmol/l uppmätt två timmar efter en oral glukosbelastning (OGTT) (27). Dessa glukosnivåer korrelerar med förekomsten av retinopati hos patienter med insulinberoende diabetes (typ 1-diabetes, IDDM). För typ 2-diabetiker är däremot makroangiopati den klart vanligare komplikationen. Åtminstone 50 procent av typ 2-diabetikerna har makrovaskulära komplikationer redan när diagnosen ställs (28).

Detta tyder på att typ 2-diabetes är en process som initierats redan innan blodglukosnivåerna är så höga att en WHO-baserad diagnos kan ställas. Prospektiva studier talar för att utvecklingen av diabetes är en kontinuerlig process. Undersökningar av personer med lindrigt förhöjda glukosvärden (glukosintolerans: fasteglukos $\leq 6,7$ och blodglukos mellan 6,7 och 10,0 mmol/l två timmar efter OGTT) har visat att den viktigaste riskfaktorn för utveckling av WHO-definierad diabetes är blodglukosnivån. Ju högre glukosvärdena är (fastevärden eller OGTT-värden, desto större är risken för att personen skall utveckla diabetes (29–31). Eftersom WHO-gränserna är rätt snäva, valde vi att definiera typ

Tabell 1. Kliniska karakteristika hos de 26 familjerna i genomscananalysen

Familj	Ålder vid diagnosen		Oral glukostoleranstest							
			Glukos (mmol/l)				Insulin (μ U/ml)			
			Medelvärde	(Individuell ålder)	Fasta	30 min	60 min	120 min	Fasta	30 min
80*	50	(32, 59,65)	9,7	10,0	12,7	12,3	7,2	10,0	21,3	28,3
219	64	(49,56,72,73,74)	7,5	11,1	13,3	13,3	6,3	17,9	26,8	35,4
31*	54	(29,51, 53,57,73,78)	6,1	9,7	12,3	12,0	7,7	24,3	34,9	46,7
178*	59	(51,60,67)	10,4	14,9	18,2	17,3	15,3	25,3	29,8	35,2
106*	55	(39,64,65)	11,6	14,3	16,2	12,1	7,8	26,3	40,1	23,7
18*	63	(54,56,83)	6,2	9,6	12,6	12,5	6,9	27,1	32,1	39,5
172	63	(55,58,69,70)	7,0	11,2	11,4	9,0	9,9	28,1	55,3	48,0
42	61	(44,61,62,71,74)	7,5	9,5	11,0	9,1	6,8	33,3	57,8	71,1
166	46	(32,43,45,54,62)	10,9	15,7	18,9	18,7	15,0	33,4	43,5	39,3
119	53	(47,52,60)	7,0	8,9	11,2	9,8	7,7	36,1	48,6	56,6
90*	60	(54,57,58,73)	7,1	12,8	13,8	13,4	10,0	36,5	51,8	56,0
7	46	(37,50,52)	10,5	14,0	18,0	16,9	14,5	38,0	61,4	65,4
123	57	(42,53,61,63,72)	9,7	13,8	5,8	15,2	12,6	38,5	51,6	58,3
128	46	(24,35,42,46,48,66,89)	7,5	10,3	12,4	11,5	13,4	45,8	62,7	83,1
64	51	(37,55,67)	6,3	11,2	12,7	12,4	12,8	47,5	56,2	68,8
71	39	(35,37,40,46)	8,1	10,9	13,5	11,8	13,9	48,0	76,9	76,4
78	54	(42,52,55,72)	6,8	12,5	14,9	12,9	8,8	48,2	25,8	51,9
200	56	(39,47,48,56,58,60,68,69,70)	7,3	10,8	13,7	12,0	27,7	49,9	84,3	92,5
6	65	(52,65,68,70,72)	7,4	11,1	13,4	14,0	21,8	51,8	71,3	96,4
100	55	(44,60,62)	8,1	9,1	8,8	7,9	12,2	63,9	53,6	57,8
146	59	(41,52,52,57,66,59,71,81)	6,7	9,9	9,2	9,0	14,0	67,1	66,8	50,3
163	55	(50,56,57,58)	9,6	12,9	14,1	13,6	24,4	74,5	55,3	49,1
187	61	(45,56,68,68,73)	7,1	11,3	10,8	9,4	11,0	99,2	95,3	82,9
183	61	(48,61,65,73)	7,6	11,4	9,0	5,0	20,2	111,0	122,0	67,0
225	61	(49,51,54,55,63,64,65,68,86)	10,0	–	–	–	9,2	–	–	–
195	48	(35,56,57)	11,4	–	–	–	20,5	–	–	–

Familjerna är sorterade i stigande ordning enligt insulinvärdet 30 min. efter påbörjad oral glukostoleranstest. Resultaten presenteras som medelvärdet av samtliga typ 2-diabetespatienter i varje familj. Patienternas individuella ålder för sjukdomsdebut finns angiven inom parentes. Insulinvärdena logaritmttransformerades före beräkningen av medelvärdet. Familjer där samtliga patienter ärvt samma kopia av kromosom 12 är utmärkta med *. Denna tabell är en modifierad version av tabell 1 i Mahtani et al. 1996 (22).

2-diabetes enligt ett vidare kriterium i vår genomscananalys (Botnia-diabetes). Definitionen för Botnia-diabetes är fasteglukos $\geq 6,5$ mmol/l eller blodglukos $\geq 8,5$ mmol/l två timmar efter en OGTT.

Val av familjer

I syfte att öka sannolikheten för att den form av typ 2-diabetes vi studerar är genetisk och minska sannolikheten för att flera diabetesgener segregerar i samma familj, ställde vi upp fyra inklusionskriterier vid valet av familjerna för genomscananalysen. Eftersom prevalensen för typ 2-diabetes stiger dramatiskt i takt med stigande ålder (32), sannolikt till följd av fysiologiskt åld-

rande och miljöns inverkan, utelöst vi familjer med en genomgående sen sjukdomsdebut.

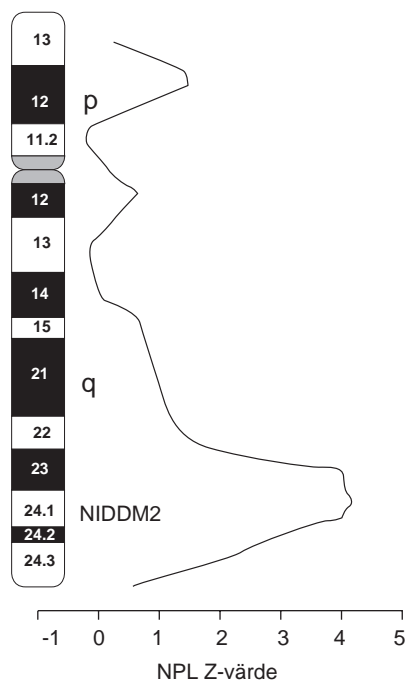
Inklusionskriterierna

- 1) Det måste finnas minst tre patienter med typ 2-diabetes tillgängliga i familjen.
- 2) En patient måste ha sjukdomsdebut före 60 år och en annan före 65 år.
- 3) Probanden fick inte ha ett syskon med typ 1-diabetes.
- 4) Det fick inte finnas tecken på bilineal nedärvning, d.v.s. den ena probandens föräldrar samt dennes syskon fick inte ha diabetes. Alternativt fick inte heller probandens samtliga syskon ha typ 2-diabetes.

Genom att använda dessa kriterier identifierade vi 26 familjer för genomscananalys. I genomsnitt fanns det 8,3 personer i familjerna. Totalt ingick 217 personer i genomscananalysen av vilka 120 uppfyllde kriterierna för Botnia-diabetes.

Bestämningen av genotyp samt analysen av data

Genotypen för 387 polymorfa mikrosatellitmarkörer bestämdes i de 26 familjerna. Det genomsnittliga avståndet mellan markörerna var 10 cM (33). Genotypningen utfördes dels manuellt radioaktivt, dels semiautomatiskt med ABI-sekvensator och ABI-analysprogram dels vid Whitehead-institutet, dels



Figur 1. Resultatet för den non-parametriska kopplingsanalysen (NPL Z-värde) för de sex typ 2-diabetesfamiljerna med den lägsta insulinsekretionen. Figuren beskriver fluktueringen i Z-värden över hela kromosom 12. Den ungefärliga lokaliseringen för *NIDDM2* finns utmärkt på den långa armen av kromosom 12. För detaljerade uppgifter om den exakta lokaliseringen av *NIDDM2* se Mahtani et al. 1996 (22).

vid Wallenberglaboratoriet vid Lunds universitet och vid Millennium Pharmaceuticals inc. Alla genotypningsresultat avlästes oberoende av två personer. Data analyserades med det nyligen publicerade programmet Genehunter (34). Detta dataprogram beräknar "IBD-sharing" hos de familjemedlemmar som har den egenskap som undersöks – i vårt fall Botnia-typ 2-diabetes – baserat på multipointanalys. Med IBD (Identical by Descendance) avses den situation då personer i en familj ärvt samma kromosom. Om diabetikerna oftare ärver samma kromosom än det som kan förväntas enligt Mendels lag om slumpmässig nedärvning, är detta ett bevis för koppling till diabetes. Analysen förutsätter inte att någon gene-

tisk modell (allelfrekvens och penetrans) specificeras.

Kartläggningen av *NIDDM2*: en typ 2-diabetesgen associerad med nedsatt insulinsekretion

Simuleringar utfördes för att vi skulle kunna fastställa vilka förutsättningarna var för att upptäcka signifikant koppling med de 26 familjer som ingick i genomscananalysen. Simuleringen visade att vi med 90 procents säkerhet kunde upptäcka en sannolikt signifikant koppling under förutsättningen att resultaten från 50 procent av de 26 familjerna innebär stöd för genetisk koppling. Med sannolikt signifikant koppling avses $P < 7,4 \times 10^{-4}$, ett resultat som enligt Lander och Kruglyak (35) kan förväntas förekomma en gång i varje genomscan. Simuleringarna visade ytterligare att signifikant koppling kunde upptäckas med 75 procent säkerhet om det hos 50 procent av familjerna finns stöd för genetisk koppling. Med signifikant koppling avses $P < 2 \times 10^{-5}$, vilket motsvarar en "genome wide" signifikansnivå på 5 procent (34).

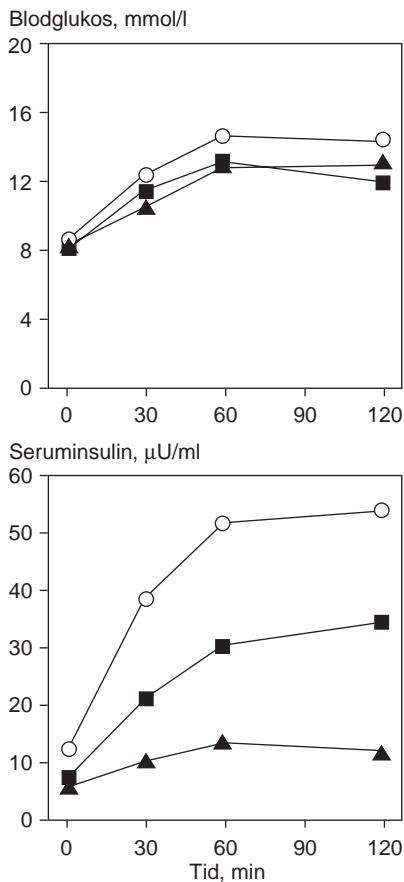
Då data analyserades fann vi inte ett enda lokus som uppfyllde kriterierna för signifikant koppling ($Z > 4,1$). Dessvärre kunde vi inte heller upptäcka ett enda lokus som skulle ha varit sannolikt signifikant ($Z > 3$). Vi tolkade detta resultat som bevis för att typ 2-diabetes är en heterogen sjukdom också i vårt utvalda familjematerial i Österbotten. I ett försök att öka den genetiska homogeniteten valde vi att subklassificera familjerna enligt en fysiologiskt relevant variabel, dvs. utifrån insulinsekretion.

Logiken bakom detta beslut är följande. Som nämnt har typ 2-diabetes dels föreslagits vara förorsakat av insulinresistens, dels av insulinbrist. Det är möjligt att insulinresistens spelar en större roll i vissa populationer, medan insulinbrist är mera betydande i andra. Eftersom skandinaver inte hör till de populationer som uppvisar extrem insulinresistens kunde insulinbrist förväntas vara en mera relevant parameter för vårt familjematerial. Det bästa tillgängliga mått vi hade på insulinsekretion var insulinvärdet 30 min. efter

OGTT (insulin 30 min.). Det mått på insulinsekretion som användes var Botnia-diabetiker-nas insulinvärden. Familjernas insulin 30-minuters medelvärde beräknades, och familjerna indelades i kvartiler enligt det. Kliniska karakteristika, inklusive insulinsekretionsdata, för samtliga 26 familjer återfinns i Tabell 1. Vi analyserade först kvartilen med den lägsta insulinsekretionen separat och adderade därefter de följande kvartilerna i tur och ordning.

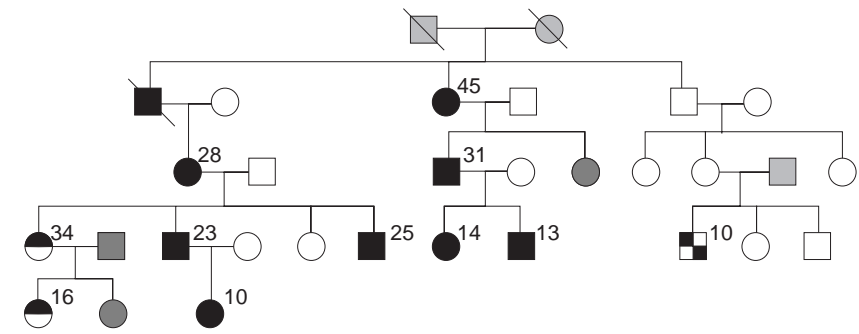
Vår subklassificeringsstrategi visade sig vara en framgångsrik metod för att öka den genetiska homogeniteten. När den fjärdedel av familjerna med de lägsta insulinivåerna analyserades, erhöll vi sannolikt signifikant koppling ($Z = 3,9$, $P = 4,1 \times 10^{-5}$ till ett lokus på kromosom 12q nära markören D12S366. När alla familjer analyserades tillsammans var Z vid motsvarande lokus endast 1,3. För att kunna extrahera så mycket information som möjligt bestämde vi genotypen för ytterligare 14 markörer i det identifierade området på kromosom 12q (36). När tilläggsmarkörerna inkluderades erhölls en genomsnittlig markörtäthet på < 1 cM och en ökning av informationen från 70 procent till 90 procent. Detta ledde till att Z-värdet ytterligare förbättrades till 4,1 i kvartilen med den lägsta insulinsekretionen. Vi tolkade detta som bevis för att det finns en gen i denna region på kromosom 12q som påverkar benägenheten att insjukna i typ 2-diabetes. Denna form av typ 2-diabetes som vi kartlagt karakteriseras av låg insulinsekretion. Eftersom detta är den andra kartlagda genen för typ 2-diabetes, kallade vi den för *NIDDM2*. Analysen av de sex familjerna med den lägsta insulinsekretionen presenteras i Figur 1.

Lokuset för *NIDDM2* visade sig vara identiskt med *MODY3*, det tredje kartlagda *MODY*-lokuset (37). Anmärkningsvärt är att sjukdomsbilden för *MODY3* och *NIDDM2* skiljer sig avsevärt. Som tidigare nämnts karakteriseras *MODY* av ett tidigt insjuknande. Den genomsnittliga åldern för insjuknande var 26 år för *MODY3*. Ingen av de 26 familjer som ingick i genomscananalysen uppfyllde de traditionella *MODY*-kriterierna. I familjerna med den lägsta insulinsekretio-



Figur 2. Glukos- och insulinvärden uppmätta under en oral glukostoleranstest (OGTT). Den övre panelen föreställer glukos- och den nedre panelen föreställer insulinvärdena hos fyra familjer med MODY3, de sex typ 2-diabetesfamiljer som uppvisade låga insulinvärden och koppling till kromosom 12q och övriga typ 2-diabetespatienter ($n = 1\ 200$) som undersökts inom ramen för Botniastudien. MODY3 visas med trianglar, NIDDM2 med fyrkanter och övrig typ 2-diabetes med cirklar.

nen fanns det inte en enda patient med sjukdomsdebut före 26 års ålder (Tabell 1). För att bekräfta att vi inte missat unga patienter med tidigare odagnostiserad diabetes i dessa familjer, undersökte vi typ 2-diabetikernas barn. Deras glukostolerans testades med OGTT. Genotypbestämningar gjordes för markörer inom *NIDDM2*-området på kromosom 12q för att fastställa om de ärvt den *NIDDM2*-bärande kromosomen. Resultatet var att vi inte kunde identifiera en enda person med odagnostiserad diabetes. Däremot identifierades sex personer



Figur 3. Släkttavla över en MODY3-familj. Siffran intill symbolerna anger åldern vid sjukdomsdebut. Svarta symboler föreställer diabetespatienter med missensmutationen T260M i *HNF-1α*-genen. Patienten med insulinberoende diabetes (IDDM) är utmärkt med rutig symbol. Patienter med diabetes associerad med insulinresistenssyndromet visas med halvfyllda symboler. Patienter med nedsatt glukostolerans (IGT) visas med randig symbol. Öppna symboler föreställer individer med normal glukostolerans. I denna familj fanns endast en bärare av T260M-mutationen som inte hade diabetes (IGT-patient, syster till diabetespatienten som insjuknat i 31 års ålder). Figuren är modifierad från Figure 1 i Lehto et al. 1997 (23).

som ärvt den *NIDDM2*-bärande kopian av kromosom 12. Dessa personer var samtliga äldre än 30 år, dvs. de hade passerat den genomsnittliga debutåldern för MODY3. Därför drog vi slutsatsen att *NIDDM2* och MODY3 representerar distinkta sjukdomar.

Också MODY3 karakteriseras av en insulinsekretionsdefekt

Lokaliseringen av *NIDDM2* och MODY3 till samma region sporrade oss att undersöka också MODY3. Vi identifierade fyra stora österbottniska familjer (totalt 230 personer, 74 diabetiker och 156 icke-diabetiker) med typisk MODY-sjukdomsbild (23). Genotypsbestämning utfördes för 18 polymorfa mikrosatellitmakörer över *NIDDM2*/*MODY3*-regionen. Koppling till MODY3 erhöles med en tidigare specificerad modell (37). Totalt utgjorde LOD poängen 15,3. En analys av haplotyp visade att tre av de fyra identifierade MODY3-familjerna hade en identisk haplotyp för tio markörer lokaliserade över en region på minst 4 cM. Detta är förenligt med att tre av familjerna ärvt MODY3-mutationen från samma förfäder. Så sent som i december 1996 klonades genen för MODY3 av en fransk-amerikansk forskargrupp (37). De visade att MODY3 förorsakas av mutationer i genen för transkriptionsfaktorn HNF-

1 α . I enlighet med haplotypanalysen i de fyra österbottniska familjerna fann vi att de tre familjerna med identisk haplotyp hade samma mutation i *HNF-1α* (en insertion av nukleotiden C (P291fsinsC) i exon 4. Den fjärde familjen hade en missensmutation i exon 4 (T260M).

Beträffande fenotypen i dessa familjer var vi mest intresserade av huruvida en liknande störning av insulinsekretionen som vi sett vid *NIDDM2* också kunde påvisas vid MODY3. Så visade sig vara fallet. De diabetiker som ärvde den MODY3-bärande kopian av kromosom 12q uppvisade en betydande störning av insulinsekretionen jämfört med tidigare undersökta typ 2-diabetiker i Botniaregionen. Denna störning i insulinsekretionen visade sig vara en gravare störning än vad vi sett vid *NIDDM2*. Dessa resultat visas också i Figur 2. Till skillnad från majoriteten av typ 2-diabetiker var diabetikerna som ärvt MODY3-mutationen normalviktiga och visade inga tecken på insulinresistens. Diabetikerna i de fyra MODY-familjerna skilde sig dessutom från fall med typ 2-diabetes genom den tidiga sjukdomsdebuten. Den genomsnittliga sjukdomsdebuten för MODY3 i Österbotten var 26 år jämfört med 58 år för *NIDDM2* och 60 år hos övriga undersökta typ 2-diabetiker i Botniaregionen.

MODY3-familjernas storlek gav oss ett ypperligt tillfälle att studera också icke-diabetiska individer som ärvt MODY3-mutationen. Totalt identifierade vi 18 sådana personer. Också de uppvisade en klar reduktion av insulinsekretionen jämfört med de icke-diabetiska familjemedlemmar som inte ärvt MODY3-mutationen. Denna skillnad i insulinsekretion var påvisbar med två olika metoder: mätning dels under OGTT, dels under intravenös glukosbelastning. Däremot var inga avvikelser i insulin känsligheten påvisbara hos de personer som ärvt MODY3-mutationen. Eftersom en minskning av insulinsekretionen var påvisbar hos friska personer med ökad risk för diabetes är det sannolikt att insulinsekretionsdefekten är den primära defekt som förorsakar diabetes i dessa familjer.

Trots att de allra flesta patienter i de identifierade MODY3 familjerna uppvisade en mutation i HNF-1 α genen hade drygt 20 procent av patienterna diabetes av annan orsak. Som exempel på detta visas släkttavlan för en av MODY3 familjerna i Figur 3. De diagnostiska problemen var störst för patienterna med tidig sjukdomsdebut. Särskilt lätt är det att förväxla MODY3 med insulinberoende diabetes (IDDM, typ 1-diabetes). Vi fann att påvisande av GAD-autoantikroppar var ett bra sätt att skilja typ 1-diabetiker från MODY3-fall. Som framgår av Figur 3 förekom det tidigt debuterande diabetes som varken var MODY3 eller typ 1-diabetes. Fenotypen för dessa personer avvek därtill avsevärt från den hos de övriga diabetikerna. De två personer (halvfyllda symboler i Figur 3) som varken hade typ 1-diabetes eller MODY3 uppvisade tecken på insulinresistenssyndromet åtföljt av höga insulinnivåer.

Via vilken mekanism är HNF-1 α involverad i regleringen av insulinsekretionen?

Det är inte klart via vilken mekanism mutationerna i HNF-1 α kunde påverka insulinsekretionen. HNF-1 α är en transkriptionsfaktor som reglerar expressionen av flera leverspecifika gener. Homozygota knockoutmöss

som saknar HNF-1 α uppvisar grav patologi och avlider kort efter födelsen (39). Karakteristiskt för dessa är leverinsufficiens men också massiv renal glukosuri. Insulinsekretionen har inte mätts hos dessa HNF-1 α -knockout möss. Det finns en rapport om att HNF-1 α skulle vara involverad i regleringen av expressionens av rättans insulin I gen (40).

Själv reglerar HNF-1 α sin egen expression (41) men dess expressionen regleras också av en annan transkriptionsfaktor HNF-4 α (42). Det är anmärkningsvärt att den forskargrupp som identifierade genen för MODY3 också identifierade genen för MODY1 som visade sig vara HNF-4 α (43). Också MODY1 karakteriseras av en insulinsekretionsdefekt.

Är NIDDM2 och MODY3 alleler av samma gen?

Samtliga MODY3-mutationer som hittills publicerats har funnits inom genens kodande region. Inga NIDDM2-mutationer har hittills identifierats. Den kodande regionen för HNF-1 α har sekvensbestämts i de sex typ 2-diabetesfamiljer med låg insulinsekretion som uppvisade koppling till NIDDM2. Vi har hittills inte funnit några mutationer i dessa familjer. Då man tar i betraktande de skillnader i fenotyp som föreligger mellan MODY3 och NIDDM2, kan man förvänta sig att NIDDM2-mutationerna skall vara av annan typ än MODY3. Det är tänkbart att NIDDM2-mutationen står att finna i genens promoter- eller enhancerregioner. Sekvensen för dessa regioner är än så länge inte känd.

Sammanfattningsvis kan konstateras att vår studie visar att typ 2-diabetes är komplex också i en isolerad population. Endast med hjälp av subklassificering av familjer enligt insulinsekretion var det möjligt att kartlägga genen NIDDM2 till en region på kromosom 12q. Denna region sammanfaller med det tidigare kartlagda MODY3. Utgående från vårt fynd att såväl MODY3 som NIDDM2 karakteriseras av en störd insulinsekretion, en defekt som är påvisbar redan hos icke-diabetiska bärare av MODY3-mutationen, föreslår vi att NIDDM2 och MODY3 representerar olika alle-

ler av samma gen. Vår hypotes är att grava mutationer, MODY3, leder till en allvarlig störning i insulinsekretionen och en tidig sjukdomsdebut. Mindre grava mutationer, NIDDM2, skulle däremot leda till diabetes först i 55-60-årsåldern.

Elisabeth Widén
Markku Lehto
Lunds Universitet
Universitetssjukhuset MAS
205 02 Malmo
Sverige

Referenser

1. Barnett AH, Eff C, Leslie RDG, Pyke DA. Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia* 1981;20:87-93.
2. Newman B, Selby JV, King MC, Slemenda C, Fabsitz R, Friedman GD. Concordance for Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia* 1987;30:763-768.
3. Harris MI. Noninsulin-dependent diabetes mellitus in black and white americans. *Diab Metab Rev* 1990; 6:71-90.
4. Harris MI, Hadden WC, Knowler WC, Bennett PH. Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance and plasma glucose levels in U.S. population aged 20-74 yr. *Diabetes* 1987;36 :523-534.
5. King H, Zimmet P. Trends in the prevalence and incidence of diabetes: non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Wld hlth statist quart* 1988; 41:190-196
6. Eriksson J, Forsén B, Häggblom M, Teppo A-M, Groop L. Clinical and metabolic characteristics of Type 1 and Type 2 diabetes: An epidemiological study from the Närpes Community in Western Finland. *Diabetic Medicine* 1992;9:654-660.
7. Knowler WC, Pettitt DJ, Saad MF, Bennett PH. Diabetes mellitus in the Pima Indians: incidence, risk factors and pathogenesis. *Diab Metab Rev* 1990;6:1-27.
8. Zimmet P, Dowse G, Finch C. The epidemiology and natural history of NIDDM - Lessons from the South Pacific. *Diab Metab Rev* 1990;6:91-124.
9. Lander ES, Shork NS. Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994;265:2037-2048.
10. DeFronzo RA The triumvirate: - cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 1988;37:667-687.
11. Eriksson J, Franssila-Kallunki A, Ekstrand A, Saloranta C, Widén E, Schalin C, Groop L. Early metabolic

- defects in persons at increased risk for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1989;321:337–343.
12. Gulli G, Ferrannini E, Stern M, Haffner S, DeFronzo RA. 1992; The metabolic profile of NIDDM is fully established in glucose-tolerant offspring of two Mexican-American NIDDM parents. *Diabetes* 1992;41:1575–1586.
 13. Schalin-Jääntti C, Härkönen M, Groop L. Impaired activation of glycogen synthase in people at increased risk for developing NIDDM. *Diabetes* 1992;41:598–604.
 14. Vaag A, Henriksen J-E, Beck-Nielsen H. Decreased insulin activation of glycogen synthase in skeletal muscles in young nonobese Caucasian first-degree relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992;89:782–788.
 15. Cerasi E, Luft R. The plasma insulin response to glucose infusion in healthy subjects and in diabetes mellitus. *Acta Endocrinol* 1967;55:278–304.
 16. Cerasi E, Efendic S, Luft R 1973; Dose-response relation between plasma-insulin and blood-glucose loads in prediabetic and diabetic subjects. *Lancet* 1973;1:794–797.
 17. O'Rahilly S, Turner RC, Matthews DR. Impaired pulsatile secretion of insulin in relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med* 1988; 318:1225–1230.
 18. Johnston C, Ward WK, Beard JC, McKnight B, Porte DJ. Islet function and insulin sensitivity in the non-diabetic offspring of conjugal type 2 diabetic patients. *Diabetic Medicine* 1989;7:119–125
 19. Froguel P, Vaxillaire M, Sun F et al. Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 1992;356:162–164.
 20. Froguel P, Zouali H, Vionnet N et al. Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;328:697–702.
 21. Hanis CL, Boerwinkle E, Chakraborty R et al. A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nature Genet* 1996;13:161–166.
 22. Mahtani MM, Widen E, Lehto M et al. Mapping of a gene for type 2 diabetes associated with an insulin secretion defect by a genome scan in Finnish families. *Nature Genet* 1996; 14:90–94.
 23. Lehto M, Tuomi, Mahtani MM et al. Characterization of the MODY3 phenotype. Early-onset diabetes caused by an insulin secretion defect. *J Clin Invest* 1997;99:582–591.
 24. Hästbacka J, de la Chapelle A, Kaitila I, Sistonen P, Weaver A, Lander E. Linkage disequilibrium mapping in isolated founder populations: diastrophic dysplasia in Finland. *Nature Genet* 1992;2:204–211.
 25. de la Chapelle A. Disease gene mapping in isolated human populations: the example of Finland. *J Med Genet* 1993;30:857–865.
 26. Meinander CF. Om svenskarnes inflyttningar till Finland. *Hist Tidskr Finland* 1983;3:229–338.
 27. WHO Technical report series 727 Diabetes mellitus. Report of a WHO study Group. World Health Organization, Geneva 1985.
 28. Harris MI, Klein R, Welborn TA, Knudman MW. Onset of NIDDM occurs at least 4–7 yr before clinical diagnosis. *Diabetes Care* 1992;15:815–819.
 29. Sartor G, Scherstén B, Carlström S, Melander A, Norden Å, Persson G Ten-year follow-up of subjects with impaired glucose tolerance. Prevention of diabetes by tolbutamide and diet regulation. *Diabetes* 1980;29:41–49.
 30. Saad MF, Knowler William C, Pettitt DJ, Nelson RG, Mott DM, Bennett PH. The natural history of impaired glucose tolerance in the Pima Indians. *N Engl J Med* 1988;319:1500–1506.
 31. Charles MA, Fontbonne A, Thibault N, Warnet Jean-M, Rosselin GE, Eschwege E. Risk factors for NIDDM in white population. Paris prospective study. *Diabetes* 1991;40:796–799.
 32. Hiltunen L, Luukinen H, Koski K, Kivelä S-L Prevalence of diabetes mellitus in an elderly Finnish population. *Diabetic Medicine* 1994; 11:241–249.
 33. Gyapay G, Morissette J, Vignal A et al. The 1993–94 Genethon human genetic linkage map. *Nature Genet* 1994;7:246–339.
 34. Kruglyak L, Daly M, Reeve-Daly MP, Lander ES Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 1996;58:1347–1363.
 35. Lander E, Kruglyak L. ; Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genet* 1995;11:241–247.
 36. Dib C, Fauré S, Fizames C, Samson D et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 1996;380:152–154.
 37. Vaxillaire M, Boccio V, Philippi A et al. A gene for maturity onset diabetes of the young (MODY) maps to chromosome 12q. *Nature Genet* 1995;9: 418–423.
 38. Yamagata K, Furuta H, Naohisa O et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* 1996;384:458–460.
 39. Pontoglio M, Barra J, Hadchouel M et al. Hepatocyte nuclear factor 1 α inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal fanconi syndrome. *Cell* 1996;84:575–585.
 40. Emens LA, Landers D, Moss LG Hepatocyte nuclear factor 1 α is expressed in hamster insulinoma line and transactivates the rat insulin I gene. *Biochemistry* 1992;89:7300–7304.
 41. Piaggio G, Tomei L, Toniatti C, De Francesco R, Gerstner J, Cortese R. 1994; LFB1/HNF1 acts as a repressor of its own transcription. *Nucl Acid Res* 1994;22:4284–4290.
 42. Miura N, Tanaka K. Analysis of the rat hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 gene promoter: synergistic activation by HNF4 and HNF1 proteins. *Nucl Acid Res* 1983;21:3731–3736.
 43. Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3).