

## Identifikácia metabolických ciest v patogenéze diabetickej retinopatie s využitím exómových sekvenačných dát – pilotná štúdia

Andrej Ficek, Andrea Šoltýsová, Ľudevít Kádaši

Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Katedra molekulárnej biológie

Diabetická retinopatia je jednou z najčastejších mikrovaskulárnych komplikácií diabetu mellitu a patrí medzi najčastejšie príčiny straty zraku v rozvinutých krajinách. Hyperglykémia, hypertenzia či zvýšená hladina lipidov, ktoré patria medzi hlavné faktory, však predstavujú približne len 10 % rizika vzniku a rozvoja tohto ochorenia. Veľký význam so snahou odhaliť presný mechanizmus sa pripisuje genetickým faktorom. V tejto pilotnej štúdii sme analýzou zastúpenia DNA variantov získaných celoexómovou analýzou u pacientov s diabeticou retinopatiou a skupine diabetickej pacientov bez retinopatie identifikovali metabolické cesty, ktoré by mohli zohrávať úlohu v mechanizme vzniku tohto ochorenia. Medzi významné dráhy patrili dráhy podieľajúce sa na O-glykozylácii, viaceré metabolické dráhy bunkovej organizácie a komponentov či metabolizmus kolagénu, lipidov, plazmatického lipoproteínu, selénu a mnohé ďalšie. Analýza zastúpenia metabolických ciest kombinuje efekt slabých účinkov viacerých variantov a zvyšuje tak silu informácie prevažne v asociačných štúdiách s malým počtom vzoriek. **Kľúčové slová:** diabetická retinopatia, exómové sekvenovanie, analýza metabolických ciest

### *Identification of metabolic pathways in pathogenesis of diabetic retinopathy using exome sequencing – a pilot study*

Diabetic retinopathy is one of the most common microvascular complications of diabetes mellitus and is a common cause of vision loss in western countries. Hyperglycaemia, hypertension and dyslipidaemia, which are among the main factors, however, represent only approximately 10% of total risk of development and disease progression. Various genetic variants are considered and tested intensively to unveil the exact pathophysiological mechanism. In this pilot study, we analysed the representation of DNA variants identified by exome sequencing in the group of patients with diabetic retinopathy and diabetic patients without retinopathy, to identify metabolic pathways that could play a role in the disease onset. Among the significant pathways those involved in O-glycosylation, metabolic pathways of cellular organization and components, metabolism of collagen, lipids, plasma lipoprotein, and selenium were most represented. Metabolic pathway analysis combines the weak effects of multiple variants and increases the power of information mainly in association studies conducted on a small number of samples.

**Keywords:** diabetic retinopathy, exome sequencing

**NewsLab, 2020; roč. 11 (1): 5 – 8**

### Úvod

Diabetická retinopatia (DR) je jednou z najčastejších mikrovaskulárnych komplikácií DM a radí sa medzi najčastejšie príčiny straty zraku u ľudí stredného a vyššieho veku. Vznik a progresia diabetickej retinopatie sú spojené s predĺženým trvaním diabetu, hyperglykémiou, hypertenziou a so zvýšenou hladinou lipidov. Tieto faktory však predstavujú len 10 % rizika vzniku a rozvoja tohto ochorenia a predpokladá sa existencia ďalších faktorov, spomedzi ktorých sa najväčší význam pripisuje genetickým faktorom. Presný mechanizmus vzniku ochorenia nie je jasný, ale je známe, že do patogenézy diabetickej retinopatie je zapojených viacero biochemických dráh. Spomínané biochemické mechanizmy zahŕňajú napríklad polyolovú metabolickú dráhu, neenzymatickú glykáciu a tvorbu koncových produktov pokročilej glykácie, oxidačný stres, aktiváciu proteínkinázy C a mnohé iné<sup>(1)</sup>.

Účasť genetických faktorov na vzniku DR je študovaná vo veľkej miere najmä analýzou variantov vybraných kandidátnych génov a v poslednom období čoraz častejšie celogenómovými asociačnými analýzami (GWAS), ktoré sa stali ústrednou metódou na štúdium genetickej zložitosti

komplexných ochorení, pričom umožnili identifikáciu mnohých asociovaných chromozómových oblastí<sup>(2)</sup>. Pri takýchto štúdiách je výrazne limitované mapovanie kauzálnych variantov s malou populačnou frekvenciou a malým účinkom, ktoré možno identifikovať iba pri analýzach veľkých skupín, často dosahujúcich niekoľko tisíc testovaných jedincov, čo výrazne zvyšuje laboratorné a finančné nároky takýchto štúdií. Ďalšou nevýhodou v konvenčnom prístupe GWAS analýz je využitie nekódujúcich, často medzigénových jednonukleotidových (SNP) polymorfizmov, pomocou ktorých väzba k samotným kauzálnym variantom nemusí byť vždy spoľahlivo odhalená. V posledných rokoch sa preto v asociačných štúdiách využívajú prístupy sekvenovania novej generácie, často so zameraním na exóm s možnosťou priamej identifikácie kauzálneho variantu<sup>(3)</sup>. Napriek zapojeniu týchto pokročilých highthroughput postupov analýzy DNA zostáva spojitosť genetických faktorov s diabeticou retinopatiou stále otáznou, pretože napriek mnohým štúdiám výsledky nie sú konzistentné, čo je spôsobené pravdepodobne najmä v dôsledku multifaktoriálnej povahy ochorenia, tiež však malého počtu vzoriek v jednotlivých štúdiách a ťažkostí pri kontrole kovariátov

tejto choroby<sup>(3)</sup>. Identifikácia kauzálnych variantov je v prípade väčšiny multifaktoriálnych ochorení navyše komplikovaná najmä z dôvodu existencie a účasti variantov tzv. malého účinku, ktorých jednotlivá identifikácia je ťažká a na ich odhalenie je často potrebná analýza ich vzájomných vzťahov. Z tohto dôvodu je jedným z prístupov na objasnenie molekulárnej patogenézy využitie súčasnej analýzy variantov vzhľadom na ich príslušnosť k rovnakým metabolickým cestám. Analýza metabolických ciest kombinuje efekt viacerých variantov malého účinku, a tým zvyšuje silu štúdie<sup>(4)</sup>. Takýto prístup môže upriamiť analýzu na metabolickú cestu, v ktorej sú následne sledované aj iné zriedkavé varianty, ktoré nemuseli byť nutne zachytené v primárnej asociačnej štúdií. Zároveň tento typ analýzy odhaľuje možnú spojitosť skupiny variantov s fenotypom, a teda pochopenie molekulárnych mechanizmov, ktoré je nevyhnutné na identifikáciu biomarkerov na diagnostiku a liečbu.

V tejto pilotnej štúdií sme sa na základe analýzy variantov získaných exómovým sekvenovaním pacientov s diabetickou retinopatiou a kontrol spočívajúcich z pacientov s DM bez diabetickej retinopatie zamerali na identifikáciu možných kandidátnych metabolických ciest pre ďalšie štúdium tohto komplexného ochorenia.

## Experimentálna časť

### Materiál a metodika

Všetky genomické analýzy boli uskutočnené na DNA vzorkách periférnej krvi pacientov izolovaných štandardnými automatizovanými postupmi (MagNA Pure LC DNA Isolation Kit, MagNA Pure LC 2.0 Instrument, Roche, Švajčiarsko) získanými v rámci riešenia projektu.

Príprava knižníc pre exómové sekvenovanie bola uskutočnená pomocou Nextera Rapid Capture Exome kitu (Illumina) s veľkosťou cieľovej sekvencie 37 Mb podľa odporúčaní výrobcu. Jednotlivé kroky prípravy aj kvalita pripravenej knižnice boli overené využitím kapilárnej elektroforézy systémom Agilent 2100 Bioanalyzer s použitím Agilent High Sensitivity DNA Kitu (Agilent, USA). Pripravené knižnice boli analyzované systémom NextSeq 500 Illumina s využitím NextSeq 500 High Output Kitu. Analyzované dáta boli bioinformaticky spracované pomocou web-based BaseSpace aplikácie (Illumina) a GALAXY servera<sup>(5)</sup>. Analýza variantov aj identifikácia variantov vykazujúcich signifikantne rozdielne alelové zastúpenie medzi skupinami pacientov boli uskutočnené pomocou Ingenuity variant analysis softvéru (Qiagen) využitím asociačného testu s bonferroniho korekciou. Analýza zastúpenia variantov v metabolických cestách bola vyhodnotená pomocou databázy ConsensusPathDB<sup>(6)</sup>.

### Výsledky

Exómovou analýzou bolo skúmaných 24 nepríbuzných pacientov s diabetom mellitom 2. typu rozdelených do dvoch skupín podľa prítomnosti diabetickej retinopatie. 12 pacientov vo veku 40 až 65 rokov (priemer 52,5 roka) trpelo diabetom kratšie ako 6 rokov, pričom u nich boli diagnostikované príznaky neproliferatívnej formy diabetickej retinopatie s prítomnosťou mikroaneuriziem, hemorágií a mäkkých exudátov. Zvyšných 12 pacientov vo veku 48 až 84 rokov (priemer 65 rokov) predstavovali pacienti s diabetom

mellitom pretrvávajúcim viac ako 17 rokov, avšak bez nálezu diabetickej retinopatie. V rámci uskutočnenej exómovej analýzy s priemernou hĺbkou čítania cieľových sekvencií 150x bolo u pacientov identifikovaných celkovo viac ako 120 000 variantov s minimálnym pokrytím 20 čítaní, z ktorých 2 034 variantov, lokalizovaných v 1 417 génoch, vykazovalo signifikantne rozdielne alelové zastúpenie medzi dvomi skupinami pacientov (s p-hodnotou  $\leq 0,05$ , obrázok 1). Samotná analýza príslušnosti identifikovaných génov k metabolickým cestám (over-representation analysis) pomocou integrovanej databázy ConsensusPathDB odhalila spolu 166 metabolických ciest, ktoré boli zastúpené signifikantným počtom identifikovaných génov. Identifikované metabolické cesty pochádzali z 11 databáz. Medzi metabolické dráhy, v ktorých sa v signifikantne zvýšenej miere vyskytovali gény obsahujúce nami identifikované varianty, patrili:

**O viazaná glykozylácia** ( $p = 2,05e-05$ ), O-glykozylácia mucínov ( $p = 9,84e-05$ ) a TSR proteínov ( $p = 0,0411$ ) aj terminácia biosyntézy O-glykánov ( $p = 2,57e-05$ )

**Bunková organizácia**. Viaceré metabolické cesty zodpovedné za organizáciu extracelulárneho matrixu a interakciu receptorov ECM ( $p = 2,31e-05$ , 0,00027), interakcie integrínov a beta-1 integrínu bunkových povrchov ( $p = 2,37e-05$ , 8,28e-05) či interakcie laminínov ( $p = 0,0154$ )

**Metabolizmus kolagénu**, jeho biosyntézy ( $p = 2,86e-05$ ) a formácie ( $p = 9,47e-05$ ) aj trimerizácie reťazcov a degradácie ( $p = 9,96e-05$ , 0,00166)

**Metabolizmus lipidov**, zastúpený viacerými cestami ako mitochondriálna beta-oxidácia dlhých a stredne dlhých reťazcov ( $p = 0,00287$ , 0,00107), predĺženie reťazca mastných kyselín v mitochondrii ( $p = 0,00821$ ) či syntéza eikozanoidov ( $p = 0,00311$ ) a iné.

**Metabolizmus plazmových lipoproteínov** a ich klírensu ( $p = 0,0123$ , 0,00525)

**Signálne dráhy** ako dráha ovplyvňujúca hladinu cAMP cez G alfa podjednotky ( $p = 0,00639$ ) či NOTCH1 ( $p = 0,0143$ ) a NOTCH3 ( $p = 0,0218$ ) signálne dráhy

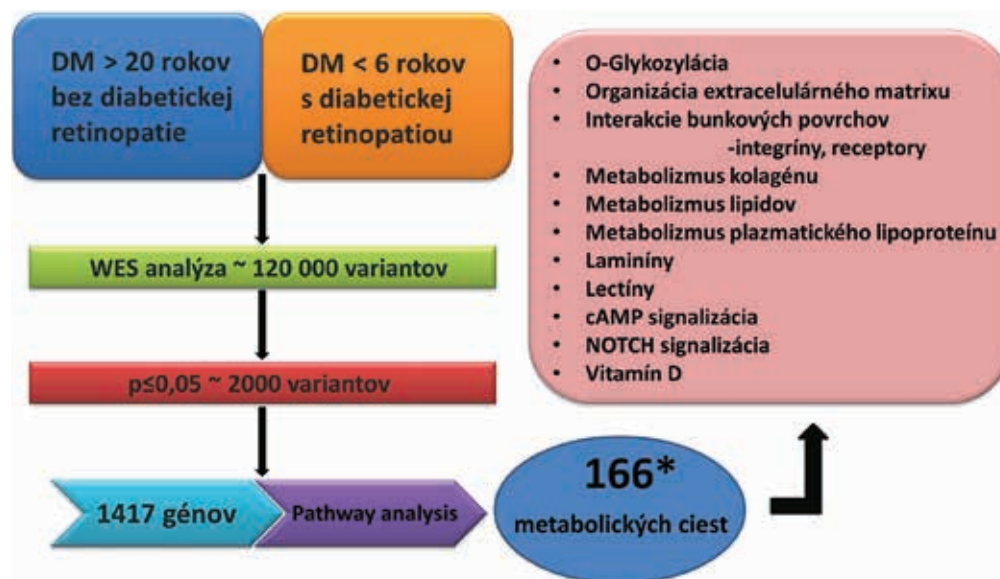
**Metabolické cesty spájané so selénom** a kyselinou selénovou ( $p = 0,00109$ ) a metabolizmus zlúčenín obsahujúcich selén ( $p = 0,0225$ )

Spomedzi 2 034 variantov vykazujúcich signifikantne rozdielne zastúpenie medzi skupinami boli identifikované aj varianty v 32 génoch, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu v patogenéze retinálnych ochorení, napríklad CNGA1 (retinitis pigmentosa), ERCC6 (macular degeneration), NBAS (optic atrophy and retinal dystrophy), OPN1SW (tritanopia), POC5 (syndromic disease with retinitis pigmentosa), RP1L1, CDH3 (macular dystrophy) a iné.

### Diskusia

Presný mechanizmus vzniku diabetickej retinopatie doposiaľ nie je napriek mnohým štúdiám celkom objasnený, je však známe, že do patogenézy je zapojených viacero biochemických dráh pre reguláciu hyperglykémie, hypertenzie, zápalu, hladiny lipidov a mnohé ďalšie. V tejto pilotnej štúdií sme analýzou dát exómoveho sekvenovania 24 pacientov identifikovali celkovo 166 kandidátnych metabolických ciest, z ktorých najviac zastúpenými boli cesty zapojené do O-glykozylácie, organizácie ECM, metabolizmu kolagénu,

**Obrázok 1.** Prehľad analýz a získaných výsledkov pilotnej štúdie zameranej na identifikáciu skupín metabolických ciest pre štúdium asociácie genetických markerov s diabetickou retinopatiou. \*166 metabolických ciest bolo identifikovaných v 11 databázach (BioCarta, Inoh, Humancyc, Reactome, Kegg, Smpdb, EHMN, Netpath, Signalink, Pid a Wikipathways) pričom v niektorých prípadoch sa môžu identifikované metabolické cesty prekrývať.



selénu, lipidov a plazmových lipoproteínov. Za jeden z hlavných faktorov vzniku DR je považovaný pretrvávajúci, subklinický zápal, ktorý v dôsledku hyperglykémie, oxidačného stresu, nadmernej glykácie a hypertenzie vedie k zvýšenému tlaku retinálnej vaskulatury, neovaskularizácii, hemorágii a leukostáze, ktorá je významným javom DR<sup>(7-10)</sup>. Centrálnu úlohu zápalu v patogenéze DR potvrdzujú aj štúdie zamerané na podávanie protizápalových liekov, ktoré bránia progresii DR<sup>(11)</sup>. Pretrvávajúca expresia proinflamačných cytokínov, chemokínov a aktivácia solubilných a bunkových adhézných molekúl koreluje s progresiou DR a prispieva k leukostáze zvyšovaním interakcie leukocytov s endoteliálnymi bunkami. K zvýšenej adhézii leukocytov prispievajú zmeny v uhlodíkových reťazcoch membrán leukocytov, pri ktorých v dôsledku zápalovej aktivácie N-acetylglukózamyltransferázy (C2GNT) dochádza k ich O-glykozylácii, ktorej zvýšená miera koreluje s progresiou a závažnosťou DR aj diabetickej nefropatie<sup>(8)</sup>. Lokálny zápal spôsobuje tiež aktiváciu mikrogliálnych buniek, ktorá vedie k zvýšenej produkcii metaloproteináz (MMPs). Úlohu MMPs vo vzťahu k organizácii extracelulárneho matrixu a interakcii ECM receptorov analyzovali viaceré štúdie, pri ktorých bolo preukázané, že degradáciu komponentov ECM sa MMPs podieľajú na regulácii proliferácie, neovaskulogenézy a tkanivového remodelingu<sup>(12,13)</sup>. Varianty MMP-2 boli sledované aj vo vzťahu ku kolagénu IV, ktorého akumulácia spôsobujúca zväčšenie bazálnej mem-

brány kapilár je známym patologickým nálezom DR a diabetickej nefropatie<sup>(14,15)</sup>. Úloha selénu bola skúmaná v súvislosti s reguláciou enzýmov zúčastňujúcich sa na ochrane proti oxidačnému stresu, pričom bolo ukázané, že suplementácia selénom pomáha zmierneniu tvorby mikrovaskulárnych lézií v retine a má protektívny efekt pred oxidačným stresom indukovaným glukózou<sup>(16,17)</sup>. Viaceré hypotézy vznikali ohľadne úlohy plazmových lipoproteínov. Kým pri zdravej retine lipoproteíny neprechádzajú krvno-retinálnou bariérou, v prípade diabetickej retiny môže byť táto bariéra narušená, preto lipoproteíny môžu hrať nepriamu, ale dôležitú úlohu v modulácii následkov tohto porušenia<sup>(18)</sup>. Súvislosť DR a plazmových lipidov bola preukázaná vo viacerých štúdiách priamym meraním koncentrácie cholesterolu, LDL, HDL, LDL a HDL fosfolipidov, triglyceridov, a apolipoproteínov A a B, pričom bola pozorovaná zvýšená koncentrácia viacerých z nich práve u pacientov s DR<sup>(19,20)</sup>. V rámci tejto pilotnej štúdie boli identifikované viaceré metabolické cesty, ktoré môžu byť kandidátmi pre ďalšie štúdie, úloha jednotlivých génov a ich variantov však musí byť sledovaná analýzou väčšieho súboru pacientov.

**Podakovanie:** Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Centrum výskumu závažných ochorení a ich komplikácií, ITMS 26240120038, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

## LITERATÚRA

1. Heng LZ, Comyn O, Peto T, et al. Diabetic retinopathy: Pathogenesis, clinical grading, management and future developments. *Diabetic Medicine* 2013; 30(6): 640-650.  
2. Sharma A, Valle ML, Beveridge C, et al. Unraveling the role of genetics in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Eye (Lond)* 2019; 33(4): 534-541.

3. Han J, Lando L, Skowronska-Krawczyk D, et al. Genetics of Diabetic Retinopathy. *Curr Diab Rep* 2019; 19(9): 67.  
4. Kao PYP, Leung KH, Chan LWC, et al. Pathway analysis of complex diseases for GWAS, extending to consider rare variants, multi-omics and interactions. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2017; 1861(2): 335-353

5. Afgan E, Baker D, Batut B, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res* 2018; 46(W1): W537-W544.
6. Kamburov A, Stelzl U, Lehrach H, et al. The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(Database issue): D793-800.
7. Chibber R, Ben-Mahmud BM, Chibber S, et al. Leukocytes in diabetic retinopathy. *Current Diabetes Reviews* 2007; 3(1): 3-14.
8. Chibber R, Ben-Mahmud BM, Coppini D, et al. Activity of the glycosylating enzyme, core 2 GlcNAc (beta1,6) transferase, is higher in polymorphonuclear leukocytes from diabetic patients compared with age-matched control subjects: relevance to capillary occlusion in diabetic retinopathy. *Diabetes* 2000; 49(10): 1724-1730.
9. Kowluru RA, Chan PS. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res* 2007; 2007: 43603
10. Matthews DR, Stratton IM, Aldington SJ, et al. Risks of progression of retinopathy and vision loss related to tight blood pressure control in type 2 diabetes mellitus: UKPDS 69. *Arch Ophthalmol* 2004; 122(11): 1631-40.
11. Kern TS, Miller CM, Du Y, et al. Topical administration of nepafenac inhibits diabetes-induced retinal microvascular disease and underlying abnormalities of retinal metabolism and physiology. *Diabetes* 2007; 56(2): 373-379.
12. Mohammad G, Kowluru RA. Novel role of mitochondrial matrix metalloproteinase-2 in the development of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(6): 3832-3841.
13. Yang J, Fan XH, Guan YQ, et al. MMP-2 gene polymorphisms in type 2 diabetes mellitus diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol* 2010; 3: 137-140.
14. Alcolado JC, Baroni MG, Li SR, Galton DJ. Genetic variation around the collagen IV 1a gene locus and proliferative retinopathy in type 2 diabetes mellitus. *Hum Hered* 1993; 43(2): 126-130.
15. Arkkila PE, Rönnemaa T, Koskinen PJ, et al. Biochemical markers of type III and I collagen: association with retinopathy and neuropathy in type 1 diabetic subjects. *Diabet Med* 2001; 18(10): 816-821.
16. González de Vega R, García M, Fernández-Sánchez ML, et al. Protective effect of selenium supplementation following oxidative stress mediated by glucose on retinal pigment epithelium. *Metallomics* 2018; 10(1): 83-92.
17. Kowluru RA, Tang J, Kern TS. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia. VII. Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy. *Diabetes* 2001; 50(8): 1938-1942.
18. Yu JY, Lyons TJ. Modified Lipoproteins in Diabetic Retinopathy: A Local Action in the Retina. *J Clin Exp Ophthalmol* 2013; 4(6): pii: 314.
19. Sinav S, Onelge MA, Onelge S, et al. Plasma lipids and lipoproteins in retinopathy of type I (insulin-dependent) diabetic patients. *Ann Ophthalmol* 1993; 25(2): 64-66.
20. Malaguarnera G, Gagliano C, Bucolo C, et al. Lipoprotein(a) serum levels in diabetic patients with retinopathy. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 943505.



**Mgr. Andrej Ficek, PhD.**

Prírodovedecká fakulta UK  
Katedra molekulárnej biológie  
Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava  
e-mail: andrej.ficek@uniba.sk