



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α' ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ-ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Γ.Π. ΧΡΟΥΣΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Γενετική διερεύνηση του γονιδίου *HNF1A* υπεύθυνου για τον
Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου MODY3 στον Ελληνικό πληθυσμό»**

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΤΑΤΣΗ

ΙΑΤΡΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2013

**ΕΚ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΥ ΟΡΚΟΥ
ΚΕΙΜΕΝΟ**

« ΟΜΝΥΜΙ ΤΟΝ ΘΕΟΝ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ
ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ.
ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ
ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ. ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ
ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ
ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ
ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ. ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ
ΤΟΙΗΝΔΕ. ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ.
ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ
ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ'
ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ
ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ. Α Δ' ΑΝ
ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ, Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ
ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ,
ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ
ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ
ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ
ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ
ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝΑΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ. ΤΑΥΤΗΝ ΤΗΝ
ΕΠΑΓΓΕΛΙΑΝ ΕΠΙΤΕΛΟΥΝΤΙ ΕΙΗ ΜΟΙ ΤΟΝ ΘΕΟΝ ΑΡΩΓΟΝ
ΚΤΗΣΑΣΘΑΙ ΕΝ ΤΩ ΒΙΩ »

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ

ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

« ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΣΤΟ ΘΕΟ ΟΤΙ ΘΑ ΕΚΠΛΗΡΩΣΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ ΑΥΤΟ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ ΟΤΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΕΚΕΙΝΟΝ ΠΟΥ ΜΟΥ ΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΥΤΗ ΙΣΟΝ ΜΕ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ . ΟΤΙ ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΩ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΔΙΑΙΤΑ ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΩΦΕΛΕΙΑ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΟΣΟ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ, ΚΑΙ (ΥΠΟΣΧΟΜΑΙ ΟΤΙ) ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΡΟΦΥΛΑΞΩ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΑ.

ΔΕΝ ΘΑ ΧΟΡΗΓΗΣΩ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟ ΦΑΡΜΑΚΟ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΣΟ ΚΑΙ ΑΝ ΠΑΡΑΚΛΗΘΩ, ΟΥΤΕ ΘΑ ΥΠΟΔΕΙΞΩ ΤΕΤΟΙΑ ΣΥΜΒΟΥΛΗ. ΕΠΙΣΗΣ ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΟ ΕΚΤΡΩΤΙΚΟ, ΑΓΝΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΗ ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ. ΣΕ ΟΣΑ ΣΠΙΤΙΑ ΠΡΟΣΚΑΛΟΥΜΑΙ, ΘΑ ΜΠΑΙΝΩ ΓΙΑ ΤΟ ΚΑΛΟ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΚΡΑΤΩΝΤΑΣ ΤΟΝ ΕΑΥΤΟ ΜΟΥ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΘΕΛΗΜΑΤΙΚΗΣ ΑΔΙΚΙΑ Η ΑΛΛΗ ΔΙΑΦΘΟΡΑ ΚΑΙ ΠΡΟ ΠΑΝΤΩΝ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΑΦΡΟΔΙΣΙΑΚΗΣ ΠΡΑΞΗΣ .

ΟΣΑ ΔΕ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΘΑ ΔΩ Η ΘΑ ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΑΣΧΟΛΙΕΣ ΜΟΥ ΣΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ ΖΩΗ, ΟΣΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΚΟΙΝΟΛΟΓΟΥΝΤΑΙ ΣΤΟΥΣ ΕΞΩ, ΘΑ ΤΑ ΑΠΟΣΙΩΩ, ΥΠΟΛΟΓΙΖΟΝΤΑΣ ΟΤΙ ΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΙΕΡΑ ΜΥΣΤΙΚΑ. ΟΣΟ ΛΟΙΠΟΝ ΘΑ ΤΗΡΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ, ΚΑΙ ΔΕΝ ΘΑ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΙΑΖΩ ΕΙΘΕ ΝΑ ΠΕΤΥΧΑΙΝΩ ΣΤΗ ΖΩΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ, ΕΧΟΝΤΑΣ ΚΑΛΟ ΟΝΟΜΑ ΠΑΝΤΟΤΕ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΩ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ.

ΔΙΔΟΝΤΑΣ ΑΥΤΟ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΕΥΧΟΜΑΙ ΝΑ ΕΧΩ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΟΥ ΘΕΟΥ ΣΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ».

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

Διδακτορική Διατριβή

Διδάκτορας: Χριστίνα Τάτση

Θέμα: «Γενετική διερεύνηση του γονιδίου *HNF1A* υπεύθυνου για τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου MODY3 στον Ελληνικό πληθυσμό»

Ημερομηνία αίτησης του υποψηφίου: 22/10/2008

Ημερομηνία ορισμού της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 24/2/2009

Μέλη τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

- 1) Χριστίνα Κανακά-Gantenbein, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής Ενδοκρινολογίας-Νεανικού Διαβήτη Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Επιβλέπον Μέλος
- 2) Γεώργιος Π. Χρούσος, Καθηγητής Παιδιατρικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών
- 3) Νικόλαος Τεντολούρης, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών

Ημερομηνία ορισμού Θέματος Διδακτορικής Διατριβής: 10/4/2009

Ημερομηνία κατάθεσης Διδακτορικής Διατριβής: 14/6/2013

Ημερομηνία ορισμού Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: 10/7/2013

Ημερομηνία Υποστήριξης Διδακτορικής Διατριβής: 20/12/2013

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής: Μελέτιος Αθανάσιος Δημόπουλος

Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

- 1) Χριστίνα Κανακά- Gantenbein, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής Ενδοκρινολογίας-Νεανικού Διαβήτη Πανεπιστημίου Αθηνών, Επιβλέπον Μέλος
- 2) Γεώργιος Π. Χρούσος, Καθηγητής Παιδιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών
- 3) Νικόλαος Τεντολούρης, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών
- 4) Αναστάσιος Παπαδημητρίου, Αναπληρωτής Καθηγητής Παιδιατρικής Ενδοκρινολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών
- 5) Κυριακή Καραβανάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών
- 6) Κωνσταντίνος Μακρυλάκης, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών
- 7) Εμμανουήλ Ζουμάκης, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιοχημείας Πανεπιστημίου Αθηνών

«Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν αποτελεί αποδοχή των γνώμων του συγγραφέως» (Οργανισμός Πανεπιστημίου Αθηνών, άρθρο 202 του Νόμου 5343)

Σύντομο Βιογραφικό Σημείωμα

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: Χριστίνα Τάτση

Ημερομηνία Γέννησης: 11 Οκτωβρίου 1983

Τόπος Γέννησης: Άρτα

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- **Ειδίκευση στην Παιδιατρική** Brooklyn, NY, Η.Π.Α.
Maimonides Medical Center July 2012-Σήμερα
- **Διδακτορικές Σπουδές** Αθήνα, Ελλάδα
ΕΚΠΑ, Ιατρική Σχολή Οκτώβριος 2008-Σεπτέμβριος 2013
Α' Παιδιατρική Κλινική
Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο
- **National Institutes of Health** Bethesda, MD, Η.Π.Α.
NICHD, Εργαστήριο Dr C.A. Stratakis Σεπτέμβριος 2011-Φεβρουάριος 2012
Ειδική Εθελόντρια-Ερευνήτρια
- **Children's Hospital of Pittsburgh** Pittsburgh, PA, USA
Τμήμα Παιδιατρικής Ενδοκρινολογίας Ιούλιος 2011-Αύγουστος 2011
Κλινική παρακολούθηση
- **Ανώτατη Εκπαίδευση** Αθήνα, Ελλάδα
ΕΚΠΑ, Ιατρική Σχολή Σεπτέμβριος 2001-Ιούλιος 2007
Πτυχίο Ιατρικής, Βαθμός: 8,38/10
- **Μέση Εκπαίδευση** Άρτα, Ελλάδα
1^ο Ενιαίο Λύκειο Άρτας 2001
Απολυτήριο Λυκείου, Βαθμός: 19,83/20

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ-ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Συμμετοχή σε περισσότερα από 30 σεμινάρια και συνέδρια (επιλεγμένα αναφέρονται παρακάτω):

1. 2nd International Congress on Steroid Research 2012, Chicago, IL, Η.Π.Α.
2. The Endocrine Society: Endocrine Essentials Live Pro 2012, NYC, NY, Η.Π.Α.
3. Next-Gen 101: A How-To for Whole-Exome Sequencing Research
2011, Bethesda, MD, Η.Π.Α.
4. Genetic Analysis in Translational Medicine 2010, Αθήνα, Ελλάδα
5. 49th Annual Meeting of the European Society of Pediatric Endocrinology
2010, Πράγα, Τσεχία
6. Seminars In Biomedicine Organized by Bodossaki Foundation
2010, Βραυρώνα, Αθήνα

ΒΡΑΒΕΙΑ ΚΑΙ ΤΙΜΗΤΙΚΕΣ ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

- Υποτροφία από το Ίδρυμα Μποδοσάκη για την ολοκλήρωση των διδακτορικών σπουδών 2010
- 1ο Βραβείο στον Μαθηματικό Διαγωνισμό «Θαλής» στην περιφέρεια της Άρτας 1999

ΙΑΤΡΙΚΑ ΔΙΑΠΙΣΤΕΥΤΗΡΙΑ

- Άδεια άσκησης ιατρικού επαγγέλματος στην Ελλάδα 2007, Αθήνα, Ελλάδα
- Μέλος του Ιατρικού Συλλόγου Αθηνών 2007, Αθήνα, Ελλάδα
- Πιστοποιητικό ECFMG (Educational Commission for Foreign Medical Graduates)
Οκτώβριος 2011, Η.Π.Α.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ
ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Coexistence of growth hormone and glucocorticoid resistance in cases of Laron syndrome can be the reason of poor response to IGF-1 therapy
Poster, 52th Annual Meeting of European Society of Pediatric Endocrinology, Milan, 2013
2. The spectrum of *HNF1A* gene mutations in Greek patients with MODY3 diabetes. Identification of seven novel mutations
Poster, ISPAD, Instabul, 2012
3. Premature ovarian failure (POF) and diabetes caused by mutation in HNF1A gene in an adolescent. Related or coincidental events?
Poster, 50th Annual Meeting of the European Society of Pediatric Endocrinology, Glasgow, 2011
4. Further evidence that pituitary stalk and/or pituitary gland defects may be caused by mutations in holoprosencephaly (HPE) genes
Oral Presentation, 49th Annual Meeting of the European Society of Pediatric Endocrinology, Prague, 2010
5. Holoprosencephaly associated gene mutations as a possible cause of pituitary stalk interruption syndrome (PSIS)
Poster, 48th Annual Meeting of the European Society of Pediatric Endocrinology, New York, 2009

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Tatsi C, Kanaka-Gantenbein C, Vazeou-Gerassimidi A, Chrysis D, Delis D, Tentolouris N, Dacou-Voutetakis C, Chrousos GP, Sertedaki A. The spectrum of *HNF1A* gene mutations in Greek patients with MODY3: relative frequency and identification of seven novel germline mutations. *Pediatr Diabetes*. 2013 Mar 21. [Epub ahead of print]
2. Tatsi C, Sertedaki A, Voutetakis A, Valavani E, Magiakou MA, Kanaka-Gantenbein C, Chrousos GP, Dacou-Voutetakis C. Pituitary stalk interruption syndrome and isolated pituitary hypoplasia may be caused by mutations in holoprosencephaly-related genes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Apr;98(4):E779-84

3. Courcoutsakis NA, Tatsi C, Patronas NJ, Lee CC, Prassopoulos PK, Stratakis CA. The complex of myxomas, spotty skin pigmentation and endocrine overactivity (Carney complex): imaging findings with clinical and pathological correlation. *Insights Imaging*. 2013 Feb;4(1):119-33.

ΓΛΩΣΣΕΣ

Ελληνικά:	Μητρική Γλώσσα	
Αγγλικά:	University of Cambridge, Certificate of Proficiency in English	1999
Γαλλικά:	Université de Paris-Sorbonne, Certificat Pratique De La Langue Française, 1er degré	1999
Ισπανικά:	Instituto Cervantes, Diploma De Español, Nivel Inicial	2008

Αφιερώνεται

Στους γονείς μου, Λευτέρη και Βούλα, που πάντα με αφήνουν να κυνηγώ τα όνειρά μου.

Στην αδερφή μου, Κατερίνα, για την στήριξή της.

*Στον αρραβωνιαστικό μου, Χάρη, για τις
πολύτιμες συμβουλές του.*

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Χριστίνα Κανακά-Gantenbein και την Γενετίστρια κα Αμαλία Σερτεδάκη, για την στήριξη και την βοήθειά τους. Τις ευχαριστώ ιδιαίτερα για την ευκαιρία που μου έδωσαν να δουλέψω δίπλα τους και για τις πολύτιμες συμβουλές τους όποτε τις χρειαζόμουν κατά την εκπόνηση της διατριβής. Πάνω από όλα τις ευχαριστώ γιατί αποτέλεσαν για εμένα πρότυπα επιστημόνων και ανθρώπων, και μου έμαθαν πως συμπεριφέρεται ένας ευσυνείδητος επαγγελματίας υγείας.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή κο Γεώργιο Π. Χρούσο, για την επιστημονική συμβολή του στη μελέτη και για τις πολύτιμες ευκαιρίες που μου έχει δώσει μέχρι σήμερα.

Ευχαριστώ τη Βιολόγο κα Μαρία Δρακοπούλου και την τεχνολόγο κα Ελένη Γκολφινόπουλου που μου δίδαξαν με υπομονή και ακρίβεια τις εργαστηριακές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

Ευχαριστώ την Ομότιμη Καθηγήτρια κα Αικατερίνη Δάκου για τη συμβολή της στην εκτέλεση της μελέτης, για τα νέα επιστημονικά ερωτήματα που διατύπωσε, καθώς και την τελική διόρθωση του άρθρου.

Ευχαριστώ όλους τους ιατρούς ενδοκρινολόγους από πανεπιστημιακές και διωτικές κλινικές που παρέπεμψαν ασθενείς στο εργαστήριο. Ιδιαίτερος ευχαριστώ την Επιμελήτρια κα Στασινού, τον Καθηγητή κο Μακρυλάκη, και τον Επιμελητή κο Δελλή.

Ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Αναστασία Κωνσταντινίδου για την πραγματοποίηση της τεχνικής της ανοσοϊστοχημείας στο Α΄ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τέλος ευχαριστώ το Ίδρυμα Μποδοσάκη για την υποτροφία που μου έδωσε για την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής και μου επέτρεψε να συνεχίσω να σπουδάζω σε μία δύσκολη οικονομικά περίοδο.

Περιεχόμενα

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

	Σελίδα
1. Εισαγωγή	15
1.1 Γενικά-Σακχαρώδης Διαβήτης	15
1.2 Ιστορία-Ετυμολογία της λέξης	15
1.3 Επιδημιολογία του ΣΔ	16
1.4 Φυσιολογία παραγωγής ινσουλίνης και ρύθμισης της γλυκόζης πλάσματος	18
1.5 Διάγνωση Σακχαρώδη Διαβήτη	20
1.6 Τύποι Σακχαρώδη Διαβήτη	22
1.6.1. ΣΔ τύπου 1 (ΣΔτ1)	24
1.6.2. ΣΔ τύπου 2 (ΣΔτ2)	25
1.6.3. Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης (ΣΔ κύησης)	27
1.6.4. Άλλοι τύποι ΣΔ-Γονιδιακές Διαταραχές των β-κυττάρων του παγκρέατος	28
2. MODY	29
2.1 Ιστορική αναδρομή του ΣΔ τύπου MODY (ΣΔτMODY)	29
2.2 Ονομασία ΣΔτMODY	30
2.3 Κριτήρια ΣΔτMODY	30
2.4 Τύποι ΣΔτMODY	30
2.5 Παθοφυσιολογία ΣΔτMODY	32
2.6 MODY3 - Γονίδιο <i>HNF1A</i>	33
2.7 Ισομερή της πρωτεΐνης HNF1A	36
2.8 Παθοφυσιολογία και τύποι των μεταλλάξεων του γονιδίου <i>HNF1A</i>	37
2.9 Κλινική εικόνα ΣΔτMODY3	38
2.10 Επιπλοκές του ΣΔτMODY3	40
2.11 Συσχέτιση γονοτύπου- φαινοτύπου	41
2.12 Διάγνωση ΣΔτMODY3	42
2.13 Θεραπεία του ΣΔτMODY3	43

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

	Σελίδα
3 Υπόθεση μελέτης	45
4 Ασθενείς και Μέθοδοι	46

4.1	Ασθενείς	46
4.2	Μέθοδοι	50
4.2.1	Απομόνωση DNA	50
4.2.2	Αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)	52
4.2.3	Σάρωση των δειγμάτων με τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αποδιατακτικού παράγοντα υπό κλίση (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis-DGGE)	57
4.2.4	Αντίδραση αλληλούχησης (Sequencing)	59
4.2.5	Μέθοδος πολλαπλής ενίσχυσης ανιχνευτών εξαρτώμενη από την αντίδραση λιγάσης (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification-MLPA)	62
4.2.6	<i>In silico</i> πρόβλεψη της παθογόνου δράσης σημειακών αλλαγών	64
4.2.7	Στατιστική ανάλυση	67
5.	Αποτελέσματα	68
5.1	Συχνότητα Μεταλλάξεων στον Ελληνικό πληθυσμό	68
5.2	Σύνοψη των Μεταλλάξεων στον Ελληνικό πληθυσμό	69
5.3	Κατανομή των μεταλλάξεων στο γονίδιο <i>HNF1A</i>	70
5.4	Τύπος των μεταλλάξεων	71
5.5	Μέθοδος ανίχνευσης	71
5.6	Καινούριες μεταλλάξεις	72
5.6.1	Διερεύνηση των καινούριων μεταλλάξεων	73
5.6.2	Περιγραφή των καινούριων μεταλλάξεων	73
5.6.2.1	c.481G>C, p.Ala161Pro	73
5.6.2.1.1	Διερεύνηση της παθογονικότητας της μετάλλαξης	74
5.6.2.1.2	Χαρακτηριστικά της ασθενούς που φέρει τη μετάλλαξη c.481G>C, p.Ala161Pro	77
5.6.2.2	c.493T>C, p.Trp165Arg	78
5.6.2.2.1	Διερεύνηση της παθογονικότητας της μετάλλαξης	79
5.6.2.2.2	Χαρακτηριστικά της ασθενούς που φέρει τη μετάλλαξη c.493T>C, p.Trp165Arg	82

5.6.2.3	c.682-684delGAG, Glu228del	83
5.6.2.3.1	Χαρακτηριστικά της ασθενούς που φέρει τη μετάλλαξη c.682-684delGAG, Glu228del	83
5.6.2.4	c.1201 C>T, Gln401X	84
5.6.2.4.1	Χαρακτηριστικά της ασθενούς που φέρει τη μετάλλαξη c.1201 C>T, Gln401X	84
5.6.2.5	c.824-826delAAG, Glu275del	85
5.6.2.5.1.	Χαρακτηριστικά της ασθενούς που φέρει τη μετάλλαξη c.824-826delAAG, Glu275del	85
5.6.2.6.	c.1177delT, Ser393fs	86
5.6.2.6.1.	Χαρακτηριστικά του ασθενή που φέρει τη μετάλλαξη c.1177delT, Ser393fs	87
5.6.2.7	c.1331-1332delAG, Ser445fs	88
5.6.2.7.1	Χαρακτηριστικά των ασθενών που φέρουν τη μετάλλαξη c.1331-1332delAG, Ser445fs	88
5.7	Σύνοψη των χαρακτηριστικών των ασθενών με ΣΔ τύπου MODY3 στον Ελληνικό πληθυσμό	89
5.8	Στατιστική ανάλυση	91
5.8.1	Συσχέτιση ηλικίας διάγνωσης και γλυκόζης νηστείας με την λειτουργική περιοχή του γονιδίου	91
5.8.2	Συσχέτιση ηλικίας διάγνωσης και γλυκόζης νηστείας με τα ισομερή της πρωτεΐνης	92
5.8.3	Συσχέτιση ηλικίας διάγνωσης και γλυκόζης νηστείας με τον τύπο της μετάλλαξης	92
5.8.4	Συσχέτιση θεραπείας των ασθενών με ΣΔτMODY3 με την λειτουργική περιοχή του γονιδίου που επηρεάζεται	94
5.8.5	Συσχέτιση θεραπείας των ασθενών με MODY3 με τα ισομερή της πρωτεΐνης που επηρεάζονται	94
5.8.6	Συσχέτιση ηλικίας διάγνωσης των ασθενών με αυτή των γονέων τους	95
5.8.7	Συσχέτιση ηλικίας διάγνωσης, γλυκόζης νηστείας και θεραπείας ανάλογα με την παρουσία ή όχι μετάλλαξης στο γονίδιο <i>HNF1A</i>	95
5.9	Λοιπά Αποτελέσματα	96
5.9.1	Διπλασιασμός των εξωνίων 6,7, και 8 του γονιδίου <i>HNF4A</i>	97

5.9.2	Απάλειψη του γονιδίου <i>HNFB</i>	97
6.	Συζήτηση	99
6.1	Συχνότητα του ΣΔτMODY3	99
6.2	Είδος μεταλλάξεων - Ιδιωτικές μεταλλάξεις	100
6.3	Μέθοδοι ανίχνευσης των μεταλλάξεων	100
6.4	Κλινικά χαρακτηριστικά	102
6.4.1	Ηλικία διάγνωσης της νόσου	102
6.4.2	Γλυκόζη νηστείας στη διάγνωση της νόσου	104
6.4.3	Αυτοαντισώματα	104
6.4.4	Θεραπεία	105
6.4.5	Πάσχουσες γενεές	105
6.5	Κριτήρια διάγνωσης	106
6.6	Συσχέτιση γονοτύπου- φαινοτύπου	107
6.7	Όφελος διάγνωσης ΣΔτMODY3	108
7.	Συμπεράσματα	109
8.	Βιβλιογραφία	110
9.	Περίληψη	120
10.	Αγγλική Περίληψη	121
11.	Αγγλική Δημοσίευση	122

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

1.1 Γενικά-Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ), ή απλά Διαβήτης όπως συχνά αναφέρεται, είναι ένα μεταβολικό νόσημα που χαρακτηρίζεται από αυξημένες τιμές σακχάρου αίματος. Στην κατηγορία αυτή κατατάσσονται παθήσεις που προκύπτουν από διαφορετικούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς, και που οδηγούν σε ανεπαρκή παραγωγή ινσουλίνης, σε αντίσταση των περιφερικών ιστών σε αυτή ή και στα δύο. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η υπεργλυκαιμία, ενώ η θεραπεία ποικίλει από απλές διαιτητικές αλλαγές, τη χρήση αντιδιαβητικών δισκίων μέχρι την χρήση ινσουλίνης ή νεότερων θεραπειών ή ακόμη και συνδυασμό θεραπευτικών σχημάτων.

1.2 Ιστορία-Ετυμολογία της λέξης

Η πρώτη περιγραφή του Σακχαρώδη Διαβήτη πραγματοποιήθηκε σε χειρόγραφο της αρχαίας Αιγύπτου, τον "Πάπυρο Ebers", ο οποίος χρονολογείται τουλάχιστον από το 1500πΧ, ενώ ορισμένες μελέτες θεωρούν ότι αποτελεί αντίγραφο κειμένου από το 3400πΧ. Στον πάπυρο ο ΣΔ περιγράφεται ως "νόσος με πολυουρία, χωρίς πόνους, αλλά με λιποσαρκία" (δηλ. περιγράφεται ως "νόσος φθοράς"), ενώ παρουσιάζονται επίσης και θεραπευτικές συνταγές που μπορεί να βοηθήσουν στη θεραπεία του.[1]

Ο όρος «Διαβήτης» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Έλληνα ιατρό της αρχαιότητας, Αρεταίο τον Καππαδόκη (120-200πΧ). Ο όρος προέρχεται από το ρήμα «διαβαίνω» και περιγράφει την πολυουρία που παρουσιάζουν οι ασθενείς: οι ασθενείς καθώς παρουσιάζουν έντονο αίσθημα δίψας καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες υγρών τα οποία όμως «διαβαίνουν» αναλλοίωτα στα ούρα.

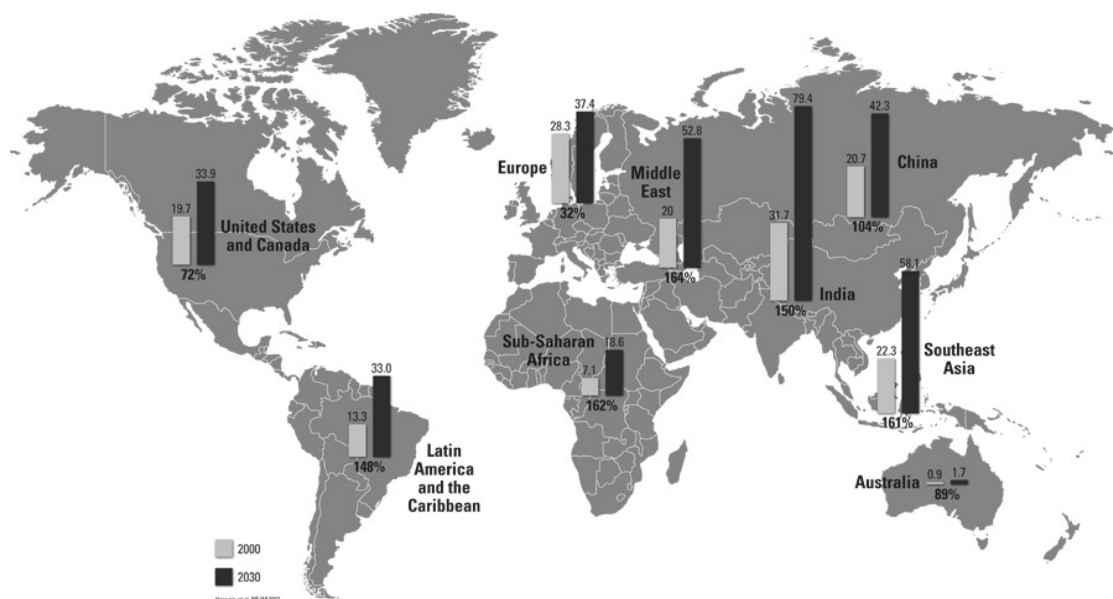
Αναφορές βρίσκονται εν συνεχεία σε κείμενα ιατρών από διάφορες περιοχές του κόσμου (Κίνα, Ινδία, Περσία κα). Διάφορες θεωρίες προτάθηκαν για τον

μηχανισμό της νόσου, αλλά μόλις το 1675, ο ιατρός Thomas Willis αναγνώρισε την γλυκιά γεύση των ούρων και πρόσθεσε τον χαρακτηρισμό «Σακχαρώδης». Η ταυτοποίηση του παγκρέατος ως του υπεύθυνου οργάνου για τον ΣΔ πραγματοποιήθηκε το 1884 από τους von Mering και Minkowski, ενώ έως τότε είχαν διατυπωθεί υποθέσεις ότι πρόκειται για νόσο νεφρικής ή νευρικής φύσεως. Τον 20^ο αιώνα η ιστορία του ΣΔ αλλάζει σημαντικά με την παραγωγή ινσουλίνης και τις εργαστηριακές μελέτες που διελεύκαναν την παθοφυσιολογία των διαφόρων τύπων ΣΔ.[2]

1.3 Επιδημιολογία του ΣΔ

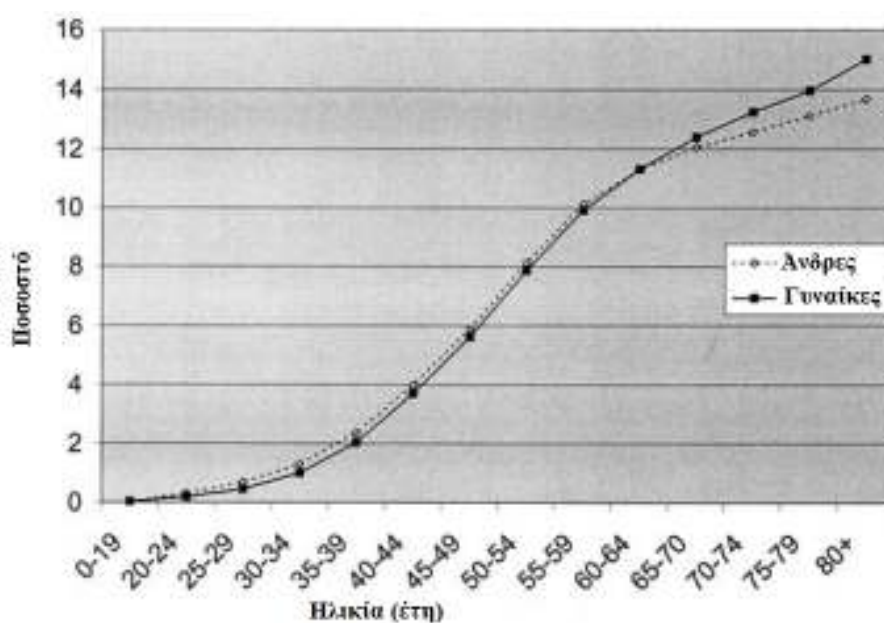
Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, περίπου 347 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως πάσχουν από Σακχαρώδη Διαβήτη, αριθμός που υπερβαίνει τον αρχικά προβλεπόμενο με βάση παλαιότερες μελέτες.[3] Η συχνότητα είναι μεγαλύτερη στις περιοχές της Βορείου Μεσογείου και Βορείου Αμερικής, όπως σχηματικά παρουσιάζεται και στην Εικόνα 1.[3, 4] Ο ΣΔ αναμένεται να λάβει διαστάσεις πανδημίας μέχρι το 2030. Η συχνότητά του αναμένεται να αυξηθεί μέσα στα επόμενα χρόνια, με σημαντικότερη αύξηση στις αναπτυσσόμενες χώρες και κυρίως στη μέση Ανατολή και την Ινδία (Εικόνα 1).[5]

Στις Η.Π.Α., χάρις στο ηλεκτρονικό σύστημα καταγραφής των ασθενών, είναι δυνατή η ακριβέστερη παρακολούθηση της συχνότητας του ΣΔ, η οποία υπολογίζεται σε 25,8 εκατομμύρια άτομα όλων των ηλικιών, αριθμός που αντιστοιχεί στο 8,3% του πληθυσμού.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της συχνότητας του ΣΔ το 2000 καθώς και της αναμενόμενης συχνότητας το 2030 ανά περιοχή.[3]

Η συχνότητα του ΣΔ είναι υψηλότερη σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας, και χαρακτηριστικά αφορά το 26,9% του πληθυσμού άνω των 65 ετών (Εικόνα 2).[3] Αντίθετα σε άτομα νεαρότερης ηλικίας (<20 έτη), η συχνότητα είναι μικρότερη (0,26%), αλλά παραμένει σημαντική αφού χαρακτηρίζεται αντιστοιχεί σε 215.000 άτομα στις ΗΠΑ. [6]



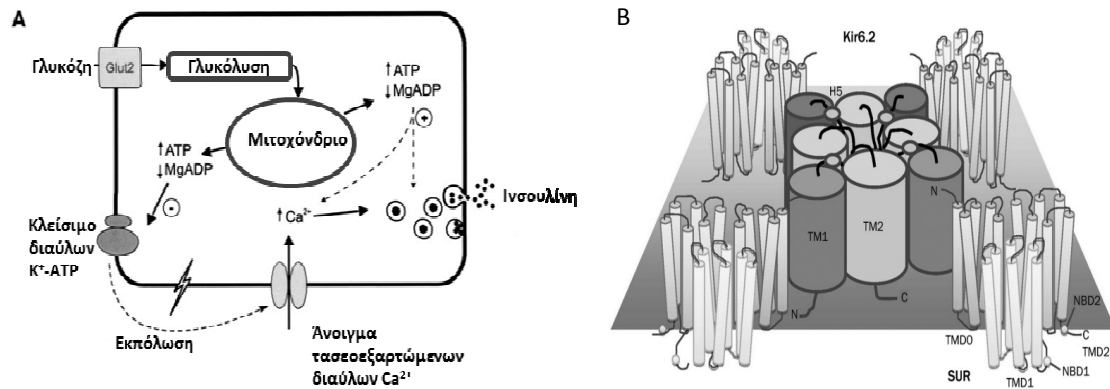
Εικόνα 2. Απεικόνιση της συχνότητας του ΣΔ παγκοσμίως με βάση την ηλικία και το φύλο των ασθενών για το 2000.[3]

Ο ΣΔ αποτελεί την έβδομη σε συχνότητα αιτία θανάτου. Επίσης αποτελεί την κύρια αιτία καρδιαγγειακών προβλημάτων και εγκεφαλικών ισχαιμικών επεισοδίων. Ο ΣΔ είναι η κύρια αιτία νεφρικής ανεπάρκειας, μη τραυματικών ακρωτηριασμών άκρων, και τύφλωσης στις ΗΠΑ.[6]

Στην Ελλάδα, η συχνότητα του ΣΔ υπολογίζεται σε περίπου 10% του πληθυσμού. Αν και δεν υπάρχουν οργανωμένα συστήματα καταγραφής των διαβητικών ασθενών στην Ελλάδα, υπάρχουν ωστόσο ορισμένες μελέτες στη βιβλιογραφία που παραθέτουν σχετικά στοιχεία. Η μελέτη που αναφέρεται στη συχνότητα του ΣΔ στη Σαλαμίνα το 2002 και το 2006, αναδεικνύει την αύξηση της συχνότητας από 8,7% σε 10,3% στον πληθυσμό της Σαλαμίνας. Οι αντίστοιχες συχνότητες ανάγονται σε 8,2% και 9,5% για τον γενικότερο ελληνικό πληθυσμό, υποδηλώνοντας τις αυξανόμενες διαστάσεις που λαμβάνει η νόσος και στην Ελλάδα.[7, 8] Ο πραγματικός αριθμός υπολογίζεται σε 700.000 διαβητικά άτομα το 2002 και 853.000 άτομα το 2006.[9]

1.4 Φυσιολογία παραγωγής της ινσουλίνης και ρύθμισης της γλυκόζης πλάσματος

Η έκκριση της ινσουλίνης από το β-κύτταρο του παγκρέατος βρίσκεται υπό αυστηρό έλεγχο από ποικίλους διεγερτικούς και ανασταλτικούς παράγοντες, από τους οποίους το επίπεδο της γλυκόζης πλάσματος είναι ο κυριότερος.[10] Η γλυκόζη πλάσματος εισέρχεται στο β-κύτταρο μέσω του υποδοχέα GLUT-2, καθώς δεν είναι δυνατή η απλή διάχυση. Η αύξηση της ενδοκυττάριας γλυκόζης πάνω από τον ουδό που ευαισθητοποιεί το ένζυμο γλυκοκινάση, οδηγεί σε φωσφορυλίωση της γλυκόζης και αύξηση των επιπέδων της 6-P-γλυκόζης. Η 6-P-γλυκόζη μεταβολίζεται εν συνεχεία στα μιτοχόνδρια του κυττάρου οδηγώντας σε αύξηση του ενδοκυττάριου ATP και κλείσιμο της αντλίας K^+ -ATP. Αυτό οδηγεί σε μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης K^+ και την εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης. Η εκπόλωση οδηγεί σε διέγερση των τασσεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου (Ca^{2+}) (VDCC=Voltage dependent Calcium channels) και αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσής του. Η αυξημένη συγκέντρωση του Ca^{2+} διεγείρει την αποκοκκίωση των κυστιδίων ινσουλίνης (Εικόνα 3).[11, 12]

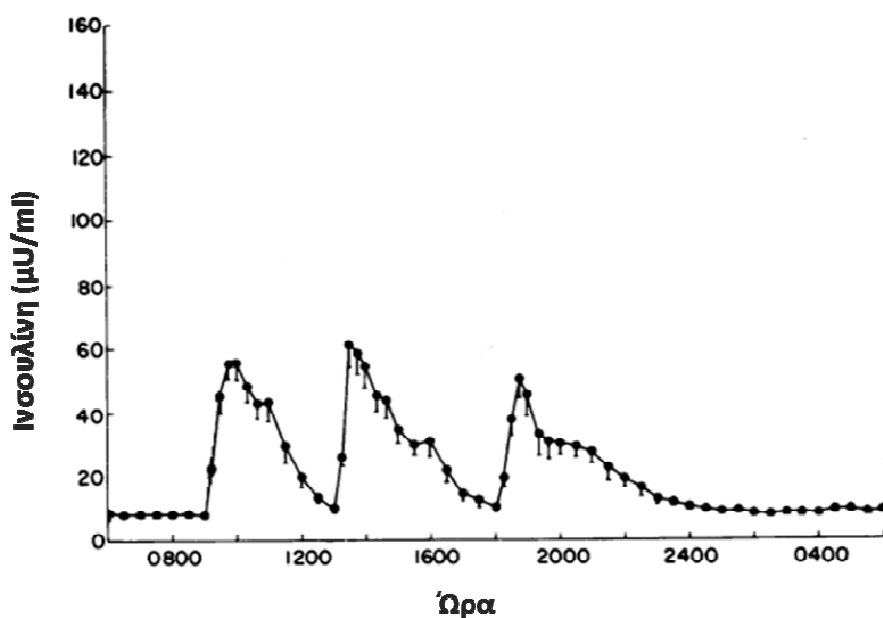


Εικόνα 3Α. Σχηματική απεικόνιση της παθοφυσιολογίας της έκκρισης της ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος.[13] **3Β.** Σχηματική απεικόνιση της αντλίας K⁺-ATP. [14]

Η αντλία K⁺-ATP παίζει κεντρικό ρόλο στη λειτουργία του β-κυττάρου και στην έκκριση της ινσουλίνης. Είναι ένα οκταμερές πολυπεπτίδιο, που αποτελείται από 2 τετραμερή δύο διαφορετικών πρωτεϊνών. Το εσωτερικό τετραμερές σχηματίζεται από τέσσερις Kir6 υπομονάδες που δημιουργούν έναν πόρο, που περικλείεται από τέσσερις SUR πρωτεΐνες-υποδοχείς που ελέγχουν τη λειτουργία του πόρου (Εικόνα 3B).[14] Η αντλία παραμένει ανοιχτή σε περιόδους νηστείας και επιτρέπει τη διόδο του K⁺ και τη διατήρηση της διαφοράς δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης σε επίπεδα παρόμοια με την τάση ισορροπίας του K⁺ (~ -70V).[13] Όταν η αντλία διεγείρεται από αυξημένες συγκεντρώσεις ATP κλείνει και δεν επιτρέπει την εξισσορόπηση της συγκέντρωσης K⁺, οδηγώντας σε εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης.[15]

Στην αντλία αυτή δρουν διάφορα μόρια, δύο από τα οποία έχουν κλινική σημασία: η διαζοξίδη και οι σουλφονυλουρίες.[16, 17] Η διαζοξίδη οδηγεί σε απευαισθητοποίηση της αντλίας από τα επίπεδα ATP και τη διατήρηση ανοιχτής αντλίας, και είναι χρήσιμη για την αντιμετώπιση μορφών συγγενούς υπερινσουλινισμού ή ινσουλινώματος.[17] Αντιθέτως οι σουλφονυλουρίες βοηθούν στο κλείσιμο της αντλίας και διευκολύνουν την έκκριση της ινσουλίνης, και είναι επομένως χρήσιμες στη θεραπεία του ΣΔτ2.[16] Μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπομονάδες της αντλίας έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία και προκαλούν είτε υπερινσουλιναιμική υπογλυκαιμία (απενεργοποιητικές μεταλλάξεις που οδηγούν σε κλείσιμο της αντλίας), είτε σε νεογνικό διαβήτη (ενεργοποιητικές μεταλλάξεις που οδηγούν σε αδυναμία διαίσθησης των επιπέδων ATP).[18, 19]

Σε περιόδους νηστείας, το πάγκρεας ενός υγιούς ατόμου εκκρίνει ινσουλίνη σε χαμηλά επίπεδα, που εξαρτώνται από την έκκριση της γλυκόζης από το ήπαρ.[20] Η έκκριση της ινσουλίνης πραγματοποιείται σε παλμούς ανά 3-6 λεπτά. Πιθανότατα η παλμική έκκριση της ινσουλίνης βοηθάει στη δράση της στους περιφερικούς ιστούς, ώστε να αποφεύγεται η καταστολή των υποδοχέων της.[21] Αντιθέτως, η έκκριση της ινσουλίνης μεταγευματικά πραγματοποιείται σε δύο φάσεις: την πρώτη άμεση, που διαρκεί λίγα μόνο λεπτά, και την δεύτερη, που διαρκεί περισσότερο (Εικόνα 4). Τα β-κύτταρα διαθέτουν δύο διαφορετικές εφεδρείες κυστιδίων ινσουλίνης: μία άμεσα διαθέσιμη που προκαλεί την πρώτη άμεση φάση, ενώ η προμήθεια νέων κυστιδίων ινσουλίνης, που χρειάζεται περισσότερο χρόνο, είναι υπεύθυνη για τη δεύτερη φάση.[22]



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση της 24ωρης έκκρισης ινσουλίνης. [23]

1.5 Διάγνωση Σακχαρώδη Διαβήτη

Σύμφωνα με τις τελευταίες κατευθυντήριες οδηγίες της Αμερικανικής Οργάνωσης Διαβήτη (American Diabetes Association-ADA), η διάγνωση του ΣΔ βασίζεται σε κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.[24]

Κριτήρια για την διάγνωση του ΣΔ σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Αμερικανικής Οργάνωσης Διαβήτη (2013)	
Η διάγνωση του ΣΔ πραγματοποιείται όταν ισχύει ένα από τα παρακάτω κριτήρια:	
1.	Γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA1c) $\geq 6,5\%$ ή
2.	Γλυκόζη πλάσματος νηστείας $\geq 126\text{mg/dl}$ ($7,0\text{mmol/L}$) (νηστεία = αποχή από κατανάλωση θερμίδων ≥ 8 ώρες) ή
3.	Γλυκόζη πλάσματος στις 2 ώρες $\geq 200\text{mg/dl}$ ($11,1\text{mmol/L}$) κατά τη διάρκεια Καμπύλης ανοχής στη Γλυκόζη (Oral Glucose Tolerance Test-OGTT) ή
4.	Συμπτώματα υπεργλυκαιμίας και τυχαία τιμή γλυκόζης πλάσματος $\geq 200\text{mg/dl}$ ($11,1\text{mmol/L}$)

Πίνακας 1. Κριτήρια για την διάγνωση του ΣΔ.

Αρχικά, η διάγνωση του ΣΔ βασίζονταν αποκλειστικά στις τιμές γλυκόζης πλάσματος (τυχαία, νηστείας ή κατά τη διάρκεια Καμπύλης Ανοχής στη Γλυκόζη). Ωστόσο, από το 2010 έγινε δεκτό ότι η τιμή της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c) $\geq 6,5\%$ αποτελεί επίσης κριτήριο για την διάγνωση του ΣΔ.[25] Διάφορες μελέτες διερεύνησαν την ευαισθησία της μεθόδου. Αποδείχθηκε ότι χρησιμοποιώντας ως ανώτερη τιμή της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης την τιμή $6,5\%$, διαγιγνώσκεται μόνο το 1/3 του αδιάγνωστου διαβητικού πληθυσμού, ενώ με τη χρήση της γλυκόζης νηστείας, και της τιμής γλυκόζης πλάσματος στις 2 ώρες στην καμπύλη OGTT θα αναγνωρίζονταν μέχρι και το 90% των αδιάγνωστων διαβητικών ασθενών.[26, 27] Με βάση πρόσφατη μετανάλυση που μελέτησε τα χαρακτηριστικά της μεθόδου, αναδείχθηκε ότι η ευαισθησία της είναι χαμηλή (0.62), αν και διατηρεί αυξημένη ειδικότητα (0.96).[28] Ωστόσο, η μειωμένη ευαισθησία της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης αντισταθμίζεται από την ευκολία χρήσης της μεθόδου, την ευρεία διαθεσιμότητά της, την μη αναγκαιότητα νηστείας του ασθενή, καθώς και την ολοκλήρωσή της με μία μόνο αιμοληψία. Με βάση αυτά τα κριτήρια, θεωρείται ότι η χρήση της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης θα συνεισφέρει στην αναγνώριση περισσότερων διαβητικών ασθενών συνολικά και συστήνεται η χρήση της.

Για την επιβεβαίωση της διάγνωσης, συνιστάται να γίνεται επανάληψη της αρχικής τεχνικής που χρησιμοποιήθηκε, ώστε να αποκλειστεί η πιθανότητα ενός ψευδώς θετικού αποτελέσματος. Η επιβεβαίωση δε θεωρείται απαραίτητη όταν ο ασθενής φέρει χαρακτηριστικά στοιχεία της νόσου (πχ. ασθενής που φέρει σημεία και συμπτώματα υπεργλυκαιμίας και τυχαία γλυκόζη πλάσματος $>> 200\text{mg/dl}$). Αν ο ασθενής φέρει δύο παθολογικά αποτελέσματα, γίνεται η διάγνωση του διαβήτη. Αν

το ένα από τα αποτελέσματα είναι φυσιολογικό, δίνεται η δυνατότητα στον επιβλέποντα ιατρό να παρακολουθήσει τον ασθενή για 3-6 μήνες και να επαναλάβει αργότερα τις εργαστηριακές εξετάσεις. Αν ως μέθοδος επιβεβαίωσης της νόσου χρησιμοποιηθεί διαφορετική από την αρχική τεχνική, και τα τελικά αποτελέσματα δεν είναι και τα δύο ενδεικτικά της νόσου, η μέθοδος που έφερε αρχικά θετικά αποτελέσματα θα πρέπει να επαναληφθεί, και αν το αποτέλεσμα της είναι και πάλι θετικό, ο ασθενής θεωρείται ότι έχει διαβήτη.[24]

1.6 Τύποι Σακχαρώδη Διαβήτη

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης αποτελεί μία ετερογενή ομάδα παθήσεων που προκύπτουν από διαφορετικούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς, αλλά οδηγούν όλοι σε υπεργλυκαιμία. Διάφορες κατατάξεις έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την περιγραφή των διαφορετικών τύπων. Η πιο πρόσφατη από αυτές δημοσιεύτηκε το 2003 από την Αμερικανική Οργάνωση Διαβήτη. [29] Οι δύο συχνότεροι τύποι ΣΔ είναι ο ΣΔ τύπου 1 (ΣΔτ1), που χαρακτηρίζεται από την αδυναμία παραγωγής ινσουλίνης εξαιτίας αυτοάνοσης καταστροφής των νησιδίων του παγκρέατος, και ο ΣΔ τύπου 2 (ΣΔτ2), που προκύπτει από τον συνδυασμό ινσουλινοαντίστασης των περιφερικών ιστών και ανεπαρκούς παραγωγής ινσουλίνης από το πάγκρεας (Πίνακας 2).

Σπανιότεροι τύποι ΣΔ αναφέρονται στην τρίτη κατηγορία (Άλλοι τύποι ΣΔ), με βάση την αιτία πρόκλησής τους. Στην κατηγορία αυτή κατατάσσονται ποικίλες αιτίες: μονογονιδιακές διαταραχές, σύνδρομα, φάρμακα, λοιμώξεις κα.

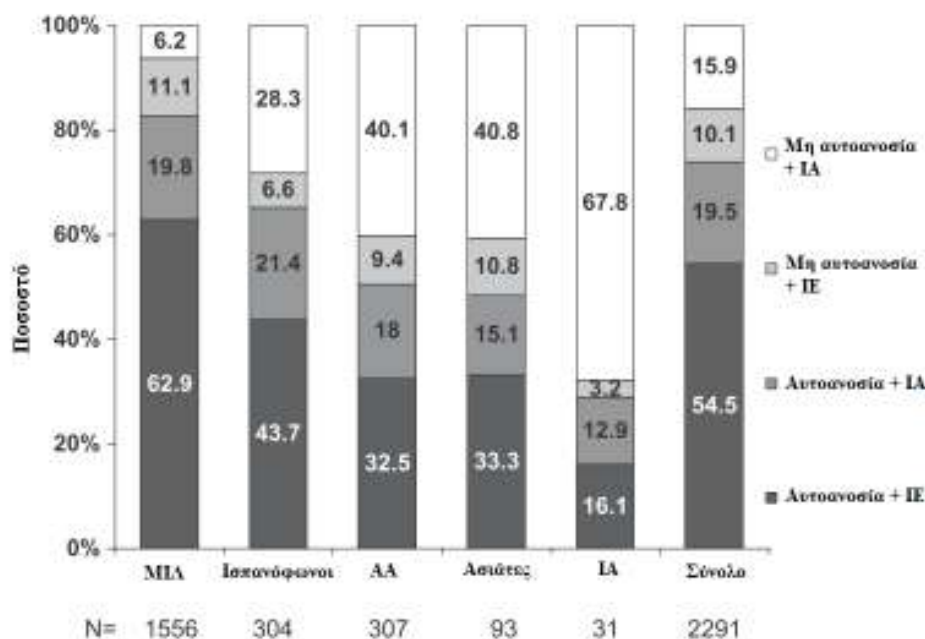
Τέλος ξεχωριστή κατηγορία αποτελεί ο ΣΔ που διαγιγνώσκεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (ΣΔ κύησης).

Αιτιολογική Ταξινόμηση του Σακχαρώδη Διαβήτη

1. Διαβήτης τύπου 1 (καταστροφή των β-κυττάρων, που συνήθως οδηγεί σε πλήρη ανεπάρκεια ινσουλίνης)	
Α. Αυτοάνοσος	
Β. Ιδιοπαθής	
2. Διαβήτης τύπου 2 (ποικίλει από κυρίως ινσουλινοαντίσταση με σχετική έλλειψη ινσουλίνης μέχρι κυρίως διαταραχή έκκρισης της ινσουλίνης με ινσουλινοαντίσταση)	
3. Άλλοι ειδικοί τύποι	
Α. Γονιδιακές διαταραχές της λειτουργίας των β-κυττάρων του παγκρέατος	
1. Χρωμόσωμα 12, <i>HNF1A</i> (MODY3)	Ε. Φάρμακα ή χημικές ουσίες
2. Χρωμόσωμα 7, <i>Γλυκοκινάση</i> (MODY2)	1. Πυρινουρόνη
3. Χρωμόσωμα 20, <i>HNF4A</i> (MODY1)	2. Πενταμιδίνη
4. Μιτοχονδριακό DNA	3. Νικοτινικό οξύ
5. Άλλοι	4. Γλυκοκορτικοειδή
Β. Γονιδιακές διαταραχές της δράσης της ινσουλίνης	5. Θυρεοειδής ορμόνη
1. Ινσουλινοαντίσταση τύπου Α	6. Διαζοξίδη
2. Λεπρεσωνισμός (Leprechaunism)	7. Β-αδρενεργικοί αγωνιστές
3. Σύνδρομο Rabson-Mendenhall	8. Θειαζίδες
4. Λιποατροφικός διαβήτης	9. Φαινυτοΐνη
5. Άλλοι	10. Ιντερφερόνη-α
Γ. Παθήσεις του εξοκρινούς παγκρέατος	11. Άλλα
1. Παγκρεατίτιδα	ΣΤ. Λοιμώξεις
2. Τραύμα/ Παγκρεατεκτομή	1. Συγγενής ερυθρά
3. Νεοπλασία	2. Κυτταρομεγαλοϊός
4. Κυστική ίνωση	3. Άλλες
5. Αιμοχρωμάτωση	Ζ. Σπάνιοι τύποι ανοσοεξαρτώμενου διαβήτη
6. Ινσασβεστοποιός παγκρεατοπάθεια	1. Σύνδρομο «Stiff-man»
7. Άλλες	2. Αντισώματα έναντι του υποδοχέα της ινσουλίνης
Δ. Ενδοκρινοπάθειες	Η. Άλλα γενετικά σύνδρομα σχετιζόμενα με διαβήτη
1. Μεγαλακρία	1. Σύνδρομο Down
2. Σύνδρομο Cushing	2. Σύνδρομο Klinefelter
3. Γλυκαγόνωμα	3. Σύνδρομο Turner
4. Φαιοχρωμοκύττωμα	4. Σύνδρομο Wolfram
5. Υπερθυρεοειδισμός	5. Ατάξια Freidreich
6. Σωματοστατίνωμα	6. Χορεία Huntington
7. Αλδοστερόνωμα	7. Σύνδρομο Laurence-Moon-Biedl
8. Άλλες	8. Μυοτονική δυστροφία
	9. Πορφυρία
	10. Σύνδρομο Prader-Willi
	11. Άλλα
4. Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης	

Πίνακας 2. Αιτιολογική κατάταξη των διαφόρων τύπων ΣΔ

Η κατάταξη αυτή βεβαίως δε διαχωρίζει σαφώς τα περιστατικά του ΣΔ, και μελέτες αποδεικνύουν ότι υπάρχει μεγάλη επικάλυψη μεταξύ των δύο τύπων (1 και 2), με αναγνώριση αυτοανοσίας σε άτομα που ταυτόχρονα εμφανίζουν ινσουλινοαντίσταση και παρουσία αυτοαντισωμάτων σε άτομα που παρουσιάζουν χαρακτηριστικά στοιχεία ΣΔτ2 και ινσουλινοαντίσταση (Εικόνα 5).[30]

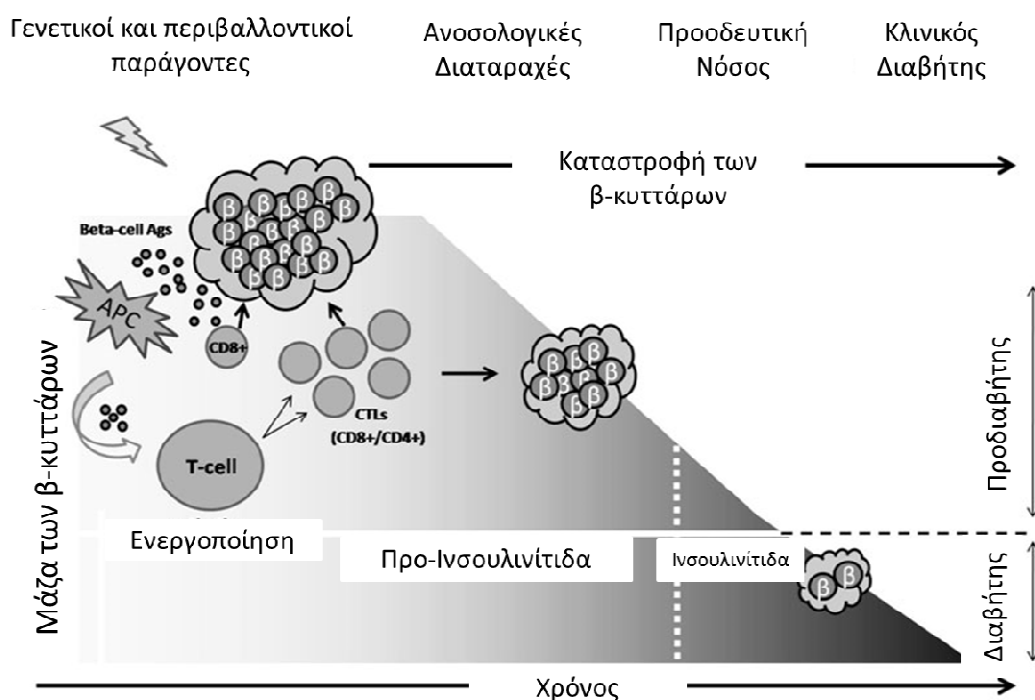


Εικόνα 5. Κατανομή του διαβητικού πληθυσμού της μελέτης SEARCH ανάλογα με την αιτιολογία του ΣΔ και την φυλή των ασθενών. (ΙΑ:Ινσουλινοαντίσταση, ΙΕ:Ινσουλινοευαισθησία, ΜΙΑ:Μη Ισπανόφωνοι Λευκοί, ΑΑ:Αφρικανοαμερικάνοι, ΙΑ:Ιθαγενείς Αμερικάνοι)

1.6.1. ΣΔ τύπου 1 (ΣΔτ1)

Ο ΣΔτ1 αντιστοιχεί στην προηγούμενη ονομασία ινσουλινοεξαρτώμενος ΣΔ ή νεανικός ΣΔ. Αναφέρεται στον ΣΔ που προκύπτει από την αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος.[31] Ποικίλοι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν ερευνηθεί για την ερμηνεία της παθοφυσιολογικής βάσης της νόσου, και έχουν αναδείξει ποικίλους συσχετισμούς (Εικόνα 6). [32, 33] Βασικό χαρακτηριστικό της διάγνωσης είναι η ανεύρεση των αυτοαντισωμάτων στον ορό των ασθενών: αντινησιδιακά (Islet Cell Autoantibodies-ICA), αντι-GAD (anti-Glutamic

Acid Decarboxylase), έναντι της ινσουλίνης (Insulin Autoantibodies), σχετιζόμενα με το ινσουλίνωμα (IA2) και έναντι του μεταβιβαστή του ψευδαργύρου (ZnT8).[34] Τα αυτοαντισώματα ποικίλουν από ασθενή σε ασθενή και παρουσιάζονται διακυμάνσεις των τίτλων τους με την πάροδο του χρόνου.[35, 36]



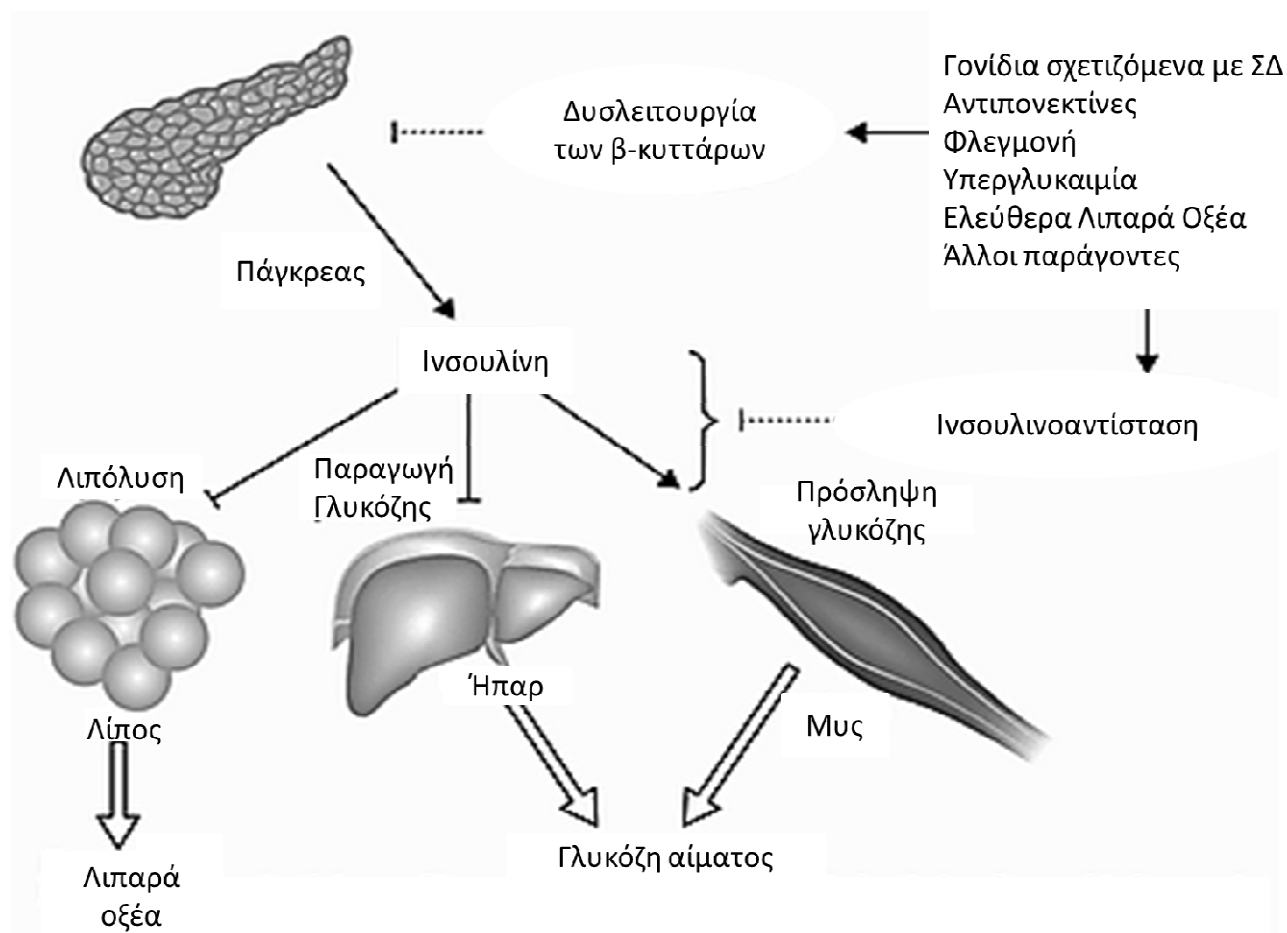
Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση της παθοφυσιολογικής βάσης του ΣΔτ1.[37]

Ο ΣΔτ1 εμφανίζεται κυρίως σε άτομα νεαρής ηλικίας (μέση ηλικία διάγνωσης: αρχή και μέση της εφηβείας). Οι ασθενείς παρουσιάζουν συνήθως τα κλασικά συμπτώματα του ΣΔ (πολυδιψία, πολυφαγία, πολυουρία, απώλεια βάρους) σε ποσοστό 67%, ενώ δεν είναι σπάνια και η εμφάνιση σημείων κετοξέωσης (25%). Οι ασθενείς αν και αρχικά μπορεί να απαιτούν χαμηλές δόσεις ινσουλίνης, παραμένουν ινσουλινοεξαρτώμενοι για την υπόλοιπη ζωή τους. [38]

1.6.2. ΣΔ τύπου 2 (ΣΔτ2)

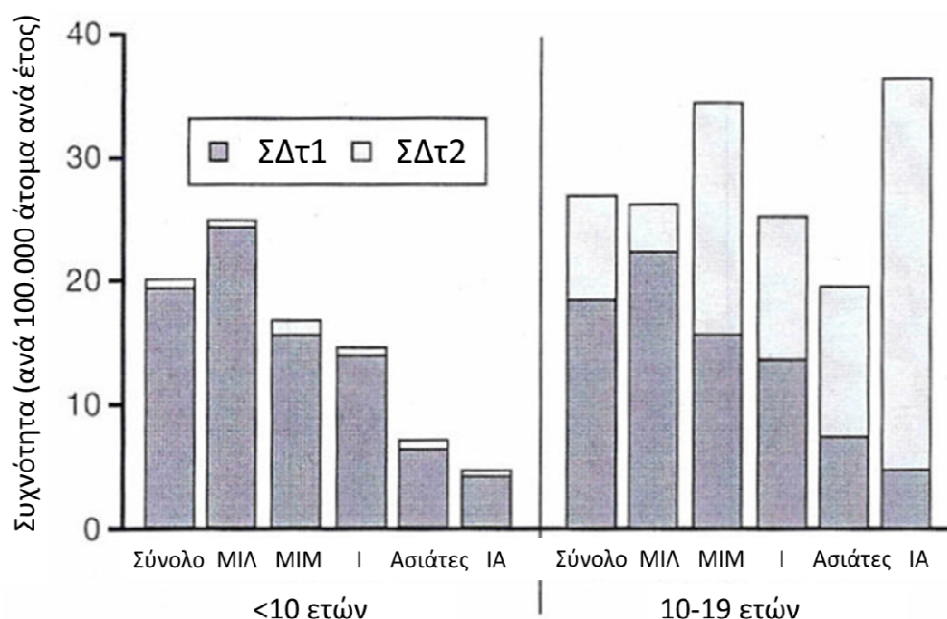
Ο ΣΔτ2, παλαιότερα γνωστός ως μη ινσουλινοεξαρτώμενος ΣΔ ή ΣΔ ενηλίκου ζωής, οφείλεται κυρίως στην αντίσταση των περιφερικών ιστών στην ινσουλίνη και στη σχετική ανεπάρκεια ινσουλίνης (Εικόνα 7).[39] Αφορά το 90% των διαβητικών ασθενών, κυρίως παχύσαρκων, οι οποίοι εμφανίζουν συνήθως χρόνια υπεργλυκαιμία

και παρουσιάζονται είτε με τα συνήθη συμπτώματα ΣΔ (πολυδιψία, πολυουρία, απώλεια βάρους), είτε σε μεγάλο ποσοστό σε εργαστηριακό έλεγχο ρουτίνας, ενώ σπάνια εκδηλώνουν σημεία κετοξέωσης.[40, 41]



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση της παθοφυσιολογικής βάσης του ΣΔτ2.[42]

Σύμφωνα με μελέτες, η έναρξη της νόσου συνήθως γίνεται 4-7 χρόνια πριν την εκδήλωση συμπτωμάτων και συνεπώς η υπεργλυκαιμία προηγείται της διάγνωσης.[41] Αν και η νόσος θεωρούνταν αρχικά νόσος της μεγάλης ηλικίας, νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι η συχνότητά της αυξάνεται σημαντικά στο νεαρό πληθυσμό, ιδιαίτερα για ορισμένες φυλετικές ομάδες (Εικόνα 8).[43, 44]



Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση της κατανομής του ΣΔτ1 και ΣΔτ2 ανάλογα με την ηλικία και τη φυλή των ασθενών στις Η.Π.Α. (ΜΙΑ: Μη-Ισπανόφωνοι Λευκοί, ΜΙΜ: Μη-Ισπανόφωνοι Μαύροι, Ι: Ισπανόφωνοι, ΙΑ: Ιθαγενείς Αμερικάνοι) [6]

Οι ασθενείς με ΣΔτ2 δεν είναι συνήθως ινσουλινοεξαρτώμενοι και πολλές φορές μπορούν να ρυθμίσουν τα επίπεδα σακχάρου αίματος μόνο με αντιδιαβητικά δισκία.[45] Παρόλα αυτά, οι ασθενείς με ΣΔτ2 εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο μικροαγγειακών και μακροαγγειακών παθήσεων, καθώς και καρκίνου, λοιμώξεων, και εκφυλιστικών παθήσεων.[46]

1.6.3. Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης (ΣΔ κύησης)

Ο ΣΔ κύησης αναφέρεται στο ΣΔ που εμφανίζεται ή διαγιγνώσκεται για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Ο όρος ισχύει ανεξάρτητα από τη θεραπεία που χρησιμοποιείται και αφορά και τις περιπτώσεις που ο ΣΔ παραμένει μετά την κύηση.[47] Η συχνότητά του υπολογίζεται σε 1,3% έως 19,9% ανάλογα με τον πληθυσμό που μελετάται και τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται.[48] Τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης αίματος έχουν συσχετισθεί με ποικίλες επιπλοκές τόσο για την μητέρα όσο και για το βρέφος. Ανάμεσα σε αυτές συγκαταλέγονται γενετικές διαταραχές, αυξημένο βάρος γέννησης και μακροσωμία, καρδιαγγειακά προβλήματα και αυξημένος κίνδυνος για ΣΔτ2 και παχυσαρκία στην μετέπειτα ζωή. [49, 50]

Αν και υπάρχουν ποικίλα κριτήρια για τη διάγνωση του ΣΔ κύησης, η Αμερικανική Οργάνωση Διαβήτη με βάση τις κατευθυντήριες οδηγίες του 2013, προτείνει η διάγνωση του ΣΔ κύησης να πραγματοποιείται με βάση τα κριτήρια του Πίνακα 3.[24]

Κριτήρια διάγνωσης ΣΔ κύησης
Πραγματοποίηση Καμπύλης Ανοχής στη Γλυκόζη με χορήγηση 75g γλυκόζης και μέτρηση της γλυκόζης πλάσματος μετά από 1 και 2 ώρες, κατά τις 24-28 εβδομάδες κύησης σε γυναίκες που δεν έχουν προηγουμένως διαγνωσθεί με ΣΔ
Η καμπύλη πρέπει να πραγματοποιηθεί το πρωί μετά από νηστεία 8 ωρών
Η διάγνωση του ΣΔ κύησης πραγματοποιείται όταν παρατηρείται μία από τις επόμενες τιμές γλυκόζης πλάσματος:
• Γλυκόζη νηστείας ≥ 92 mg/dL (5,1mmol/L)
• Γλυκόζη 1 ώρα μετά την έναρξη της καμπύλης ≥ 180 mg/dL (10 mmol/L)
• Γλυκόζη 2 ώρες μετά την έναρξη της καμπύλης ≥ 153 mg/dL (8,5 mmol/L)

Πίνακας 3. Κριτήρια διάγνωσης ΣΔ κύησης

1.6.4. Άλλοι τύποι ΣΔ – Γονιδιακές Διαταραχές των β-κυττάρων του παγκρέατος

Σύμφωνα με την κατάταξη του 2003, οι κύριοι τύποι ΣΔ που αναγνωρίζονται είναι οι τύποι 1 και 2, καθώς και ο ΣΔ κύησης. Οι υπόλοιποι τύποι κατατάσσονται πλέον στην κατηγορία «Άλλοι Ειδικοί Τύποι» (Other specific types), όπου γίνεται η περιγραφή τους ανάλογα με την αιτιολογία τους.

Για παράδειγμα, η παλαιότερη κατηγορία ΣΔ τύπου MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young), δεν αναφέρεται πλέον ξεκάθαρα στην νέα κατάταξη. Αντίθετα οι διάφοροι τύποι ΣΔ τύπου MODY (ΣΔτMODY) περιγράφονται πλέον με βάση το όνομα του γονιδίου που προκαλεί την κάθε διαταραχή, στην κατηγορία Γονιδιακές διαταραχές της λειτουργίας των β-κυττάρων του παγκρέατος (Genetic defects of β -cell function) (Πίνακας 2).

2. MODY

2.1 Ιστορική αναδρομή του ΣΔ τύπου MODY (ΣΔτMODY)

Από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα υπήρξαν στη βιβλιογραφία διάφορες αναφορές ασθενών με ΣΔ με χαρακτηριστικά που διέφεραν από τα έως τότε συχνά περιγραφόμενα.

Χαρακτηριστικά σε άρθρο του 1928, ο Cammidge περιέγραψε έξι οικογένειες με ΣΔ με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Δύο από αυτές τις οικογένειες παρουσίαζαν αυτοσωμική επκρατούσα κληρονομικότητα και ήπια γλυκοζουρία, χαρακτηριστικά που προσομοιάζουν με τον ΣΔτMODY3.[51] Παράλληλα περιγράφηκαν στη βιβλιογραφία περιπτώσεις διαβητικών ασθενών με ήπιο διαβήτη που αντιμετωπίζονταν με επιτυχία με σουλφονυρίδες, στοιχείο που επίσης συνηγορεί υπέρ του ΣΔτMODY3.[52]

Ωστόσο η πρώτη επίσημη και συστηματική περιγραφή περιπτώσεων ΣΔτMODY πραγματοποιήθηκε το 1974.[53] Σε αυτό το άρθρο περιγράφονται 3 οικογένειες με ήπιο οικογενή ΣΔ από νεαρή ηλικία χωρίς την εμφάνιση μακροχρόνιων επιπλοκών. Τα διαβητικά μέλη της οικογένειας παρουσίαζαν ήπια υπεργλυκαιμία, χωρίς κέτωση, και έλεγχαν τις τιμές σακχάρου ικανοποιητικά με σουλφονυλουρίδες. Για πρώτη φορά αναφέρθηκαν ορισμένα από τα κριτήρια του ΣΔτMODY, κάποια από τα οποία χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα. Την επόμενη χρονιά, το 1975, οι Tattersall και Fajans δημοσίευσαν μία μελέτη όπου συνέκριναν οικογένειες με τον οικογενή τύπο ΣΔ με ασθενείς που έφεραν τον κλασικό τύπο νεανικού διαβήτη.[54] Για πρώτη φορά επίσης ανέφεραν την ονομασία MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young). Από τότε πολλαπλές αναφορές οικογενή ΣΔ έχουν γίνει στη διεθνή βιβλιογραφία.

2.2 Ονομασία ΣΔτMODY

Η ονομασία προέρχεται από την παλαιότερα χρησιμοποιούμενη κατάταξη του ΣΔ, σε νεανικό ινσουλινοεξαρτώμενο (juvenile) και σε μη ινσουλινοεξαρτώμενο ΣΔ που εμφανίζεται σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας (mature). Η κατάταξη αυτή έχει ωστόσο εγκαταληφθεί και αντικατασταθεί πλέον με τις ονομασίες ΣΔ τύπου 1 και τύπου 2, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, και έχει γίνει αποδεκτό ότι η ηλικία του ασθενή δεν αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την ανάγκη για ινσουλινοθεραπεία. Επομένως και η ονομασία MODY δεν είναι πλέον δόκιμη.[55] Για το λόγο αυτό προτάθηκε η αντικατάσταση του όρου με την κατηγορία «γονιδιακές διαταραχές των β-κυττάρων του παγκρέατος». Στην τελευταία κατάταξη οι διάφοροι τύποι ΣΔτMODY παρουσιάζονται με βάση το γονίδιο που φέρει τη μετάλλαξη (Πίνακας 2).

Παρόλα αυτά, νεότερα άρθρα στη βιβλιογραφία δεν έχουν εγκαταλείψει τον όρο MODY, αφού η χρήση του για 50 σχεδόν χρόνια, τον έχει πλέον εδραιώσει στην επιστημονική κοινότητα.

2.3 Κριτήρια ΣΔτMODY

Αν και δεν υπάρχουν σαφώς καθορισμένα και κοινώς αποδεκτά κριτήρια, με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα για τη διάγνωση των ασθενών με MODY, ορισμένα βασικά χαρακτηριστικά του ΣΔτMODY που συνήθως χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίησή του είναι:

- Αυτοσωμική επικρατούσα κληρονομικότητα
- Έναρξη της νόσου σε νεαρή ηλικία, συνήθως μικρότερη των 25 ετών
- Πρωτογενής βλάβη της λειτουργίας των β κυττάρων του παγκρέατος, με μικρές ανάγκες σε ινσουλίνη (<0,5 μονάδες/κιλό/ημέρα)
- Απουσία αυτοανοσίας [56]

2.4 Τύποι ΣΔτMODY

Ο ΣΔτMODY αντιστοιχεί σε 1-5% όλων των περιπτώσεων διαβήτη. [57, 58]
Ο τύπος 2 αντιπροσωπεύει το 3-80% των περιπτώσεων, ενώ ο ΣΔτMODY3 το 4-

64%, ανάλογα με τη χώρα προέλευσης της μελέτης και τον πληθυσμό που συμμετέχει σε αυτήν. Οι περισσότερες μελέτες αναδεικνύουν τον τύπο 3 ως τον συχνότερο τύπο MODY.[59-69] Οι υπόλοιποι τύποι MODY αντιπροσωπεύουν σπανιότερες μορφές, ενώ περιπτώσεις όπου τα κριτήρια για MODY πληρούνται αλλά δεν έχει αναδειχθεί γονιδιακή βλάβη κατατάσσονται ως MODYX (16-45%).[70-80]

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί 11 διαφορετικοί γονιδιακοί τύποι που προκαλούν τους αντίστοιχους τύπους ΣΔτMODY (Πίνακας 4).[81]

Τύπος	Γονίδιο
MODY1	<i>HNF4A</i>
MODY2	<i>GCK</i>
MODY3	<i>HNF1A</i>
MODY4	<i>PDX1</i>
MODY5	<i>HNF1B</i>
MODY6	<i>NEUROD1</i>
MODY7	<i>KLF11</i>
MODY8	<i>CEL</i>
MODY9	<i>PAX4</i>
MODY10	<i>INS</i>
MODY11	<i>BLK</i>

Πίνακας 4. Τύποι ΣΔτMODY και τα υπεύθυνα γονίδια για κάθε τύπο.

Κάθε τύπος ΣΔτMODY διαθέτει ορισμένα χαρακτηριστικά στοιχεία που διευκολύνουν τη διάγνωσή του. Με βάση τα κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία του ασθενή είναι δυνατή η επιλογή ορισμένων μόνο γονιδίων για περαιτέρω διερεύνηση, μειώνοντας με τον τρόπο αυτό το συνολικό κόστος της εξέτασης.

Ο ΣΔτMODY2 προκαλεί συνήθως ήπια υπεργλυκαιμία νηστείας που είναι εμφανής από τη γέννηση. Συνήθως οι ασθενείς διατηρούν την ικανότητα έκκρισης ινσουλίνης κατά την Καμπύλη Ανοχής στη Γλυκόζη και δεν παρουσιάζουν αύξηση της γλυκόζης στις δύο ώρες.[82] Εξαιτίας της ήπιας μόνο υπεργλυκαιμίας, συνήθως διατηρούν χαμηλά επίπεδα γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης και δεν φέρουν κίνδυνο για τις μακροπρόθεσμες επιπλοκές του Διαβήτη. Για το λόγο αυτό δεν είναι απαραίτητη η θεραπεία των ασθενών με ινσουλίνη ή με αντιδιαβητικά δισκία.[83]

Ο ΣΔτMODY1 παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με την κλινική εικόνα του τύπου 3, όπως αυτή παρουσιάζεται εν συνεχεία. Για το λόγο αυτό, ασθενείς που δεν φέρουν μετάλλαξη του γονιδίου *HNF1A* πρέπει εν συνεχεία να ελέγχονται για μεταλλάξεις του γονιδίου *HNF4A*. [83]

Οι υπόλοιποι τύποι είναι σπανιότεροι ή έχουν περιγραφεί σε λίγες μόνο οικογένειες. Συνήθως φέρουν επιπρόσθετα χαρακτηριστικά που είναι ιδιαίτερα για κάθε γονιδιακή βλάβη (π.χ. ο τύπος 5 φέρει επίσης διαταραχές των νεφρών, συνήθως κύστεις, ενώ στους τύπους 4 και 6 συνυπάρχουν ανωμαλίες ή/και αγενεσία του παγκρέατος) (Πίνακας 5). [55]

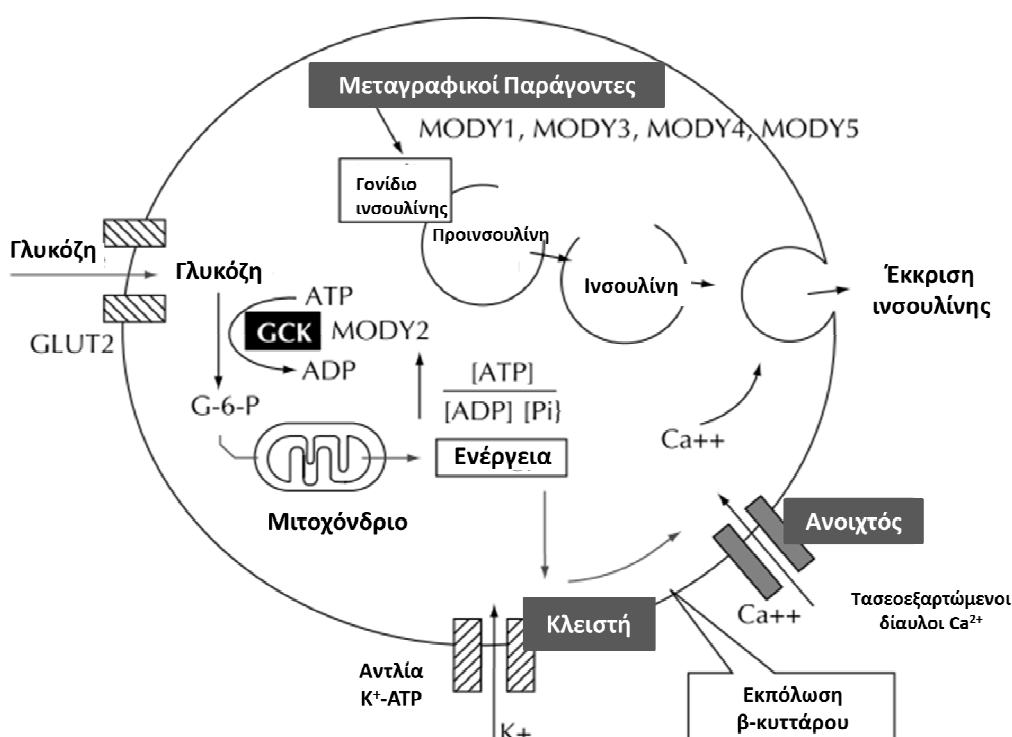
	MODY1	MODY2	MODY3	MODY4	MODY5	MODYX
Χρωμόσωμα	20q	7q	12q	13q	17cen-q21.3	Άγνωστο
Πρωτεΐνη	HNF4A	Γλυκοκινάση	HNF1A	IPF-1	HNF1B	Άγνωστη
Κατανομή (% των ατόμων με MODY)	Σπάνιος	3-80%	4-64%	Σπάνιος	Σπάνιος	16-45%
Ηλικία διάγνωσης	Μετεφηβεία	Παιδική ηλικία	Μετεφηβεία	Ενωρίς ενήλικη ζωή	Μετεφηβεία	Ετερογενής
Σοβαρότητα ΣΔ	Σοβαρός	Ήπιος	Σοβαρός	Ήπιος?	Σοβαρός	Ετερογενής
Επιπλοκές ΣΔ	Συχνές	Σπάνιες	Συχνές	Σπάνιες	Σπάνιες	Άγνωστο

Πίνακας 5. Σύνοψη των βασικών χαρακτηριστικών των κυριότερων τύπων ΣΔτMODY. Πίνακας τροποποιημένος από τη βιβλιογραφική αναφορά [84]

2.5 Παθοφυσιολογία ΣΔτMODY

Τα γονίδια που προκαλούν ΣΔτMODY σχετίζονται με διαταραχές στην παραγωγή της ινσουλίνης από το β-κύτταρο του παγκρέατος. Οι περισσότεροι τύποι ΣΔτMODY προκαλούνται από μεταλλάξεις σε μεταγραφικούς παράγοντες. Οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν σε μειωμένη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με τον ενδοκυττάριο μεταβολισμό της γλυκόζης και οδηγούν σε μειωμένη παραγωγή της ινσουλίνης.

Αντιθέτως, ο ΣΔτMODY2 προκαλείται από μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο της γλυκοκινάσης (*GCK*). Οι απενεργοποιητικές μεταλλάξεις του γονιδίου *GCK* οδηγούν σε αύξηση του ουδού διαίσθησης των επιπέδων γλυκόζης στο β-κύτταρο. Κατά συνέπεια δημιουργείται σχετική μείωση της παραγωγής της 6-φωσφορυλιωμένης γλυκόζης και μειωμένη παραγωγή ενδοκυττάριου ATP που οδηγούν στην τελική έκκριση μειωμένων επιπέδων ινσουλίνης για το αντίστοιχο επίπεδο γλυκόζης αίματος (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση της φυσιολογίας παραγωγής και έκκρισης της ινσουλίνης και των βημάτων που επηρεάζονται σε διαφορετικούς τύπους ΣΔτMODY.[85]

2.6 MODY3 - Γονίδιο *HNF1A*

Το γονίδιο *HNF1A* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12 και περιγράφηκε για πρώτη φορά ως αιτία του ΣΔτMODY3 το 1996.[86] Αποτελείται από 10 εξόνια που εκτείνονται σε μία περιοχή 23KB και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 633 αμινοξέων που

δρα ως μεταγραφικός παράγοντας. Η πρωτεΐνη αποτελείται από 3 λειτουργικές περιοχές, την περιοχή διμερισμού (αμινοξέα 1-33), την DNA-δεσμευτική περιοχή (αμινοξέα 100-184 και 198-281) και την περιοχή της μεταγραφικής δραστηριότητας (αμινοξέα 282-631) (Εικόνα 10). [87] Η περιοχή διμερισμού επιτρέπει τη δημιουργία ομο- και ετερο-διμερών των πρωτεϊνών της οικογένειας HNF. Η πρωτεΐνη μπορεί να δράσει ως ομοδιμερές ή ως ετεροδιμερές με την πρωτεΐνη HNF1B. Η DNA-δεσμευτική περιοχή περιέχει μία POU-A περιοχή και μία επιπλέον περιοχή 21 αμινοξέων που ενισχύει την πρόσδεση στο DNA. Τέλος η καρβόξυ-τελική περιοχή της πρωτεΐνης αποτελεί την περιοχή που ελέγχει τη μεταγραφική της δραστηριότητα.[88]

Η πρωτεΐνη εκφράζεται σε ποικίλους ιστούς. Αν και αρχικά περιγράφηκε σε δείγματα ήπατος, η πρωτεΐνη εκφράζεται επίσης στο πάγκρεας, το στομάχι, τους νεφρούς, το έντερο, και άλλα όργανα.[89, 90]



Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου *HNF1A* και των λειτουργικών περιοχών της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από αυτό.[91]

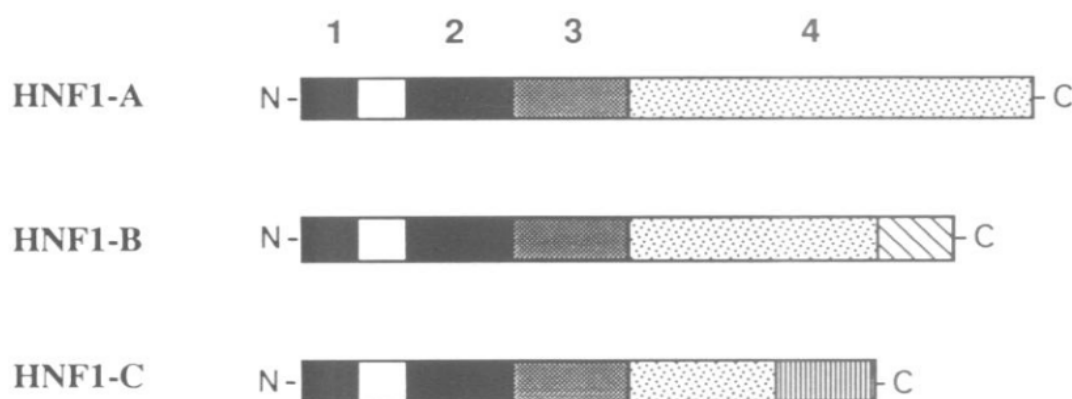
Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF1A έχει τη δυνατότητα να επηρεάζει τη μεταγραφή ποικίλων γονιδίων, που παίζουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό και τη φωσφορυλίωση της γλυκόζης, τον μεταβολισμό των λιπιδίων, τον μεταβολισμό και τη μεταφορά των αμινοξέων, κ.α. (Πίνακας 7).

A	AADAC	KIAA0101	B	AADAC	DLEU1	HPX	PHF2	ZNF288
	ABCC9	KIAA0399		ABCC2	DUSP6	HSD11B1	PIST	ZNF361
	ADH4	KIAA0844		ACF	EIF4EBP2	HSD17B2	PLCB1	
	APOH	KIF13A		ADH1A	ELF3	HSPC111	PLG	
	ARHGAP11A	KIR-023GB		ADH1B	ENPEP	HSPC129	PLGL	
	B29	KIR2DS2		ADH6	F11	IFNAR1	PS-PLA1	
	BCL6	KIR3DL1		AGT	FE65L2	IGF1R	PZP	
	BIKE	KRTAP1.1		AHSG	FH	IGFBP1	RAB33B	
	C4BPA	KRTHA3A		AK2	FKSG87	INADL	RAMP	
	C6orf11	LIPA		AKR1C2	FLJ10242	ITIH3	RARB	
	CDC45L	LOC113201		AKR1C3	FLJ10276	ITIH4	RBP5	
	COL3A1	LOC113220		AKR1C4	FLJ10525	ITM2B	RNGTT	
	COQ7	LOC51092		ALB	FLJ10583	KIAA0022	RPL37AP1	
	CPXCR1	LOC56906		ALDH3A2	FLJ10650	KIAA0669	SAC	
	CRH	MCCC1		ALS2	FLJ10774	KIAA0844	SCYE1	
	CTS2	MGC10500		AMBP	FLJ11000	KIAA0872	SEL1L	
	CYB5-M	MGC15677		ANGPTL3	FLJ11838	KIAA1041	SERPINA1	
	DKFZP564J157	MIA2		ANPEP	FLJ12788	KNG	SERPINA10	
	DLEU1	MRPL15		AP3M1	FLJ13448	LBP	SERPINA6	
	DOCK1	Nod1(-)6kb		APCS	FLJ13611	LOC51060	SERPINC1	
	DSC1	NPY2R		APG3	FLJ14356	LOC51096	SERPINE1	
	EIF3S6	NR0B2		APOA2	FLJ20080	LOC51326	SERPING1	
	ELF3	NR2C2		APOH	FLJ20718	LOC54518	SGK2	
	FBXO8	NR5A2		AQP3	FLJ21272	LOC56902	SLC17A2	
	FE65L2	PAFAH2		AQP9	FLJ21934	LOC58486	SLC22A11	
	FIL1(EPSILON)	PAX8		ARHGAP11A	FLJ22551	LY6E	SLPI	
	FLJ10242	pcnp		ASGR1	FLJ23259	M17S2	SNX17	
	FLJ10252	PEX13		ASGR2	FNTB	M96	SRI	
	FLJ10474	PGCP		ATF2	G0S2	MAGEA9	SSA2	
	FLJ10650	PRO2032		AUTL1	G3A	MGC10500	SSTR1	
	FLJ11301	PSMA5		BAT3	G6PT1	MGC11034	SSTR4	
	FLJ13273	PS-PLA1		BIKE	GARS	MGC11266	STRAIT11499	
	FLJ13385	RAB33B		BTN2A1	GBE1	MGC13010	SUPV3L1	
	FLJ13448	RAB6KIFL		C1S	GCKR	MGC15435	SYN3	
	FLJ14855	SDCCAG10		C2	GDI2	MGC955	TARS	
	FLJ20156	SEL1L		C4BPA	GIOT-2	MIA2	TBPL1	
	FLJ20225	SGK2		C8B	GJB1	MRPL15	TEF	
	FLJ20234	SLC26A7		CCNE1	GOT1	MRPS18B	TFRC	
	FLJ20298	SPO11		CDCA1	GPR39	MSH6	TIEG2	
	FLJ20643	SRI		CISH	GPX2	MT1H	TIEG2	
	FLJ20731	SSTR1		CLYBL	GRHPR	MT1L	TM4SF4	
	FLJ21272	TACR3		CNTNAP2	GTF2B	MT1X	TMEM1	
	FLJ22559	TM4SF4		CPB2	GTF2E1	MTHFD1	TNFRSF6	
	FNTB	TMOD2		CREBL2	GTPBG3	MTP	UGT1A1	
	GCNT3	TMP21		CRP	HABP2	NAPA	UGT2B11	
	GIOT-2	UQCRC2		CTS2	HAL	NET-2	UGT2B15	
	GLA	UROD		CYB5	HAO1	NFKBIB	UQCRC2	
	GNB2L1	VNN3		CYB5-M	HCAP-G	NPC1L1	VNN3	
	GPR74	WBP4		CYP2E	HGD	NR0B2	VTN	
	H4F2	ZNF155		CYP3A43	HGFAC	NR1D1	WBP4	
	HAVCR-1	ZNF300		DAF	HNF4A	NR5A2	WDF2	
	HHLA2			DC13	HNF4A	NRD1	WDR12	
	HNF4a7			DKFZP564O0463	HNF4a7	PAFAH2	XDH	
	IFNA10			DKFZP586A0522	HNMT	PAX8	XPC	
	INSR			DKFZP586M0122	HPCL2	PCK1	ZK1	

Πίνακας 7. Σύνοψη των γονιδίων του παγκρέατος (A) και του ήπατος (B), των οποίων η μεταγραφή επηρεάζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα HNF1A.[92]

2.7 Ισομερή της πρωτεΐνης HNF1A

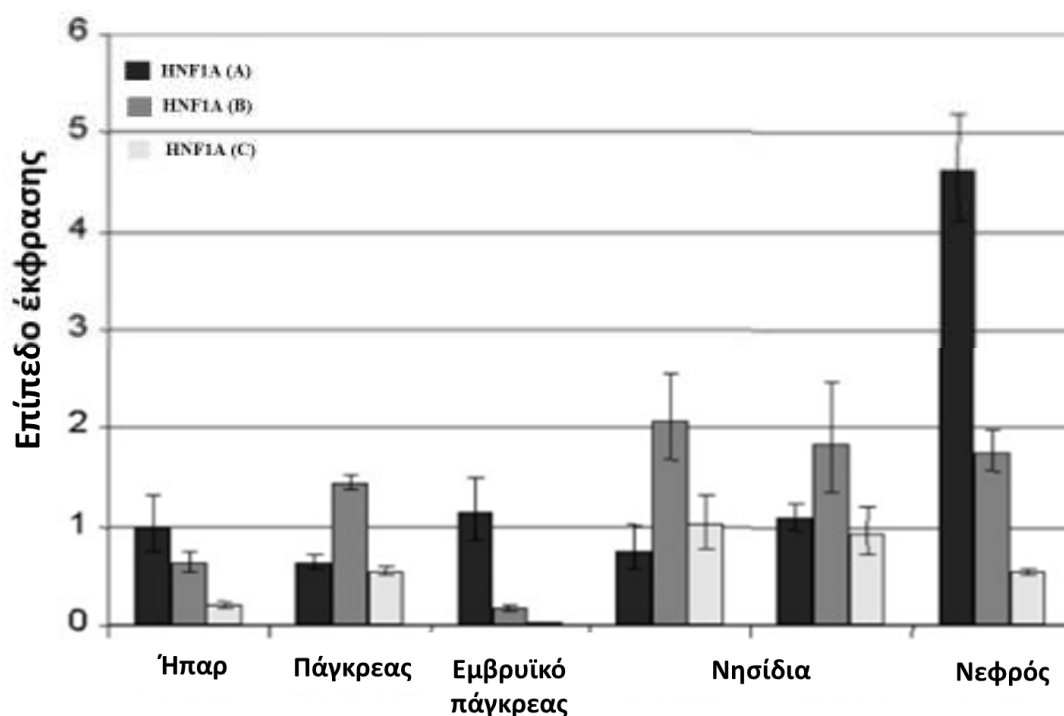
Από το 1993, μελέτες με τη δημιουργία cDNA βιβλιοθηκών σε διάφορους ιστούς απέδειξαν ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται σε 3 διαφορετικά ισομερή (A, B και C). Το ισομερές A αποτελείται από τα 631 αρχικά περιγραφέντα αμινοξέα της πρωτεΐνης. Το ισομερές B προκύπτει από την προσθήκη 42 νέων αμινοξέων μετά από το αμινοξύ 500, ενώ το ισομερές C προκύπτει από την προσθήκη 57 νέων αμινοξέων μετά από το αμινοξύ 437 του ισομερούς A. Επομένως και τα τρία ισομερή αποτελούνται από την ίδια περιοχή διμερισμού και DNA δέσμευσης και διαφέρουν μόνο ως προς την περιοχή της μεταγραφικής δραστηριότητας (Εικόνα 11). [93]



Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση των τριών ισομερών της πρωτεΐνης HNF1A (A, B και C) και των περιοχών του γονιδίου που διαφέρουν σε καθένα από αυτά.[93]

Τα τρία διαφορετικά ισομερή προκύπτουν από εναλλακτικά σημεία πολυαδενυλίωσης (B) ή από την μη απάλειψη του ιντρονίου 6 (εναλλακτικό μάτισμα) (C).[93] Με μεθόδους παροδικής επιμόλυνσης μελετήθηκε επίσης η ισχύς του κάθε ισομερούς και διαπιστώθηκε ότι τα ισομερή B και C έχουν 5 φορές μεγαλύτερη μεταγραφική δραστηριότητα σε σύγκριση με το ισομερές A.[93] Επίσης με την εφαρμογή της μεθόδου ημιποσοτικής RT-PCR διαπιστώθηκε η κατανομή των ισομερών σε διάφορους ιστούς. Αν και το ισομερές A αποτελεί το κύριο ισομερές στο ήπαρ και τους νεφρούς, η κατανομή είναι διαφορετική σε άλλους ιστούς. Στο πάγκρεας, για παράδειγμα, όπου ασκείται η κύρια δράση της πρωτεΐνης σε σχέση με την έκκριση της ινσουλίνης, το κυρίαρχο ισομερές είναι το B σε ιστό ενηλίκου παγκρέατος και το A σε πληθυσμό νησιδίων (Εικόνα 12).[94] Δεδομένου ότι παρατηρείται διαφορετική έκκριση των ισομερών σε διαφορετικούς ιστούς και

λαμβάνοντας υπόψη ότι τα ισομερή B και C έχουν 5 φορές μεγαλύτερη δραστικότητα, πιθανόν μικρές αλλαγές στην έκφρασή τους μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην τελική δράση της πρωτεΐνης.



Εικόνα 12. Απεικόνιση της έκφρασης των ισομερών της πρωτεΐνης HNF1A σε διάφορους ιστούς σε σύγκριση με το ισομερές HNF1A(A) στο ήπαρ.

2.8 Παθοφυσιολογία και τύποι των μεταλλάξεων του γονιδίου *HNF1A*

Μέχρι σήμερα τουλάχιστον 300 διαφορετικές μεταλλάξεις του γονιδίου έχουν περιγραφεί σε άτομα με ΣΔτMODY3. Οι περισσότερες μεταλλάξεις είναι σημειακές μεταλλάξεις, που οδηγούν σε αλλαγή ενός αμινοξέος ή σε πρώιμο τερματισμό της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Λιγότερο συχνά παρατηρούνται απαλείψεις ή εισαγωγές λίγων νουκλεοτιδίων που οδηγούν σε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης της πρωτεΐνης και συνήθως σε πρώιμο τερματισμό της. Μεταλλάξεις κοντά σε σημεία ματίσματος έχουν περιγραφεί επίσης, και με τη βοήθεια τεχνικών ανάστροφης μεταγραφής έχουν αποδειχθεί ως η αιτία παθολογικής έκφρασης της πρωτεΐνης.[95] Μεταλλάξεις στον υποκινητή του γονιδίου, αν και έχουν περιγραφεί δεν αποτελούν συχνή αιτία

ΣΔτMODY3. Τέλος λίγες μόνο περιπτώσεις απάλειψης ή διπλασιασμού μεγάλου μέρους της πρωτεΐνης έχουν επίσης περιγραφεί στη βιβλιογραφία.[96]

Σημαντικό ρόλο στις σημειακές μεταλλάξεις φαίνεται να παίζει η απαμίνωση των μεθυλκυτοσινών των νησιδίων CpG βάσεων, καθώς τουλάχιστον 30% των μεταλλάξεων προκύπτουν από αλλαγή CG>TG ή CG>CA.[95]

Όσον αφορά μικρές απαλείψεις/εισαγωγές λίγων νουκλεοτιδίων, η μετάλλαξη c.872dupC θεωρείται ότι βρίσκεται σε σημείο του γονιδίου με 8 βάσεις κυτοσίνης, ιδιαίτερα επιρρεπές σε μικρές απαλείψεις/εισαγωγές κυτοσίνης.[97] Η μετάλλαξη αυτή έχει περιγραφεί σε πολλούς ασθενείς ανά τον κόσμο και θεωρείται ότι αντιστοιχεί στο 15-20% περίπου όλων των ασθενών με ΣΔτMODY3. Η μετάλλαξη, αν και αρχικά είχε θεωρηθεί ότι φέρει επικρατούσα αρνητική δράση, τελικά πιστεύεται ότι οδηγεί σε πρόωμη καταστροφή του μεταγράφου και τελικά σε μειωμένα επίπεδα της πρωτεΐνης στο αίμα.[98, 99]

Γενικά, οι μεταλλάξεις του γονιδίου προκαλούν είτε μειωμένη συγκέντρωση της πρωτεΐνης, ή φέρουν επικρατούσα αρνητική δράση. Οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε μείωση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, είτε προκαλούν την παραγωγή μικρότερης ποσότητας πρωτεΐνης είτε οδηγούν σε πρόωμο τερματισμό της αλυσίδας προκαλώντας πρόωμη καταστροφή των μεταγράφων της (nonsense-mediated decay).[99, 100]

2.9 Κλινική εικόνα ΣΔτMODY3

Οι ασθενείς με ΣΔτMODY3 συνήθως εκδηλώνουν αρχικά ήπια ασυμπτωματική υπεργλυκαιμία. Χαρακτηριστικά αρχικά εμφανίζεται διαταραχή στην ανοχή στη γλυκόζη στις 2 ώρες κατά την καμπύλη OGTT. Τα άτομα με ΣΔτMODY3 εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερες τιμές γλυκόζης σε σύγκριση με τα άτομα με ΣΔτMODY2 στις 2 ώρες στην καμπύλη γλυκόζης. Επομένως, αποδεικνύεται ότι σε αυτόν τον τύπο διαβήτη υπάρχει κατά κύριο ρόλο διαταραχή στην παραγωγή και έκκριση της ινσουλίνης, σε αντίθεση με τον ΣΔτMODY2 όπου υπάρχει κυρίως διαταραχή στην ενεργοποίηση της έκκρισης της ινσουλίνης σε ήπια επίπεδα υπεργλυκαιμίας με διατήρηση της παραγωγικής και εκκριτικής λειτουργίας του β-κυττάρου.[101]

Με την πάροδο του χρόνου οι ασθενείς εμφανίζουν υπεργλυκαιμία νηστείας και τελικά έκδηλο διαβήτη που απαιτεί θεραπεία είτε με αντιδιαβητικό δισκίο είτε με

ινσουλίνη. Συνήθως οι ασθενείς διαγιγνώσκονται σε ετήσιους προληπτικούς ελέγχους, ενώ σπάνια εμφανίζουν σημεία κετοξέωσης και σημαντικής υπεργλυκαιμίας. Η μέση ηλικία διάγνωσης είναι 20,5 έτη, αν και μέχρι 40% των ασθενών παρουσιάζει ηλικία διάγνωσης μεγαλύτερη από 25 έτη.[102] Η διεισδυτικότητα της νόσου είναι πολύ υψηλή αλλά η ηλικία έναρξης ποικίλει ακόμα και για τα άτομα της ίδιας οικογένειας που φέρουν την ίδια μετάλλαξη. Παρόλα αυτά μέχρι την ηλικία των 55 ετών περισσότερα από 95% των ατόμων με μετάλλαξη του γονιδίου *HNF1A* έχουν εκδηλώσει κάποια σημεία της νόσου.[59]

Χαρακτηριστικό της νόσου αποτελεί επίσης ο χαμηλός ουδός έκκρισης γλυκόζης στα ούρα. Η πρωτεΐνη HNF1A επηρεάζει την έκφραση του υποδοχέα Νατρίου-Γλυκόζης (SGLT2) στο εγγύς νεφρικό σωληνάριο με τελικό αποτέλεσμα την έκκριση γλυκόζης στα ούρα σε επίπεδα γλυκόζης αίματος περίπου 152 mg/dl σε αντίθεση με τη φυσιολογική λειτουργία (180 mg/dl).[103-106]

Οι ασθενείς με ΣΔτMODY3 συχνά διαγιγνώσκονται ως ΣΔτ1 ή 2. Η νεαρή ηλικία έναρξης της νόσου συχνά οδηγεί λανθασμένα στην κατάταξη των ασθενών ως ινσουλινοεξαρτώμενο ΣΔτ1.[107, 108] Το οικογενειακό ιστορικό διαβήτη, η έλλειψη αυτοανοσίας και η διατήρηση της λειτουργίας του παγκρέατος περισσότερο από το αναμενόμενο για την περίοδο μέλιτος, βοηθάει στη διαφοροποίηση των δύο τύπων. Οι χαμηλές ανάγκες των ασθενών σε ινσουλίνη από την άλλη μεριά συχνά οδηγούν στην ταξινόμηση των ασθενών ως ΣΔτ2.[68] Πολλές φορές μάλιστα οι ασθενείς με ΣΔτMODY3 παρουσιάζουν στοιχεία ινσουλινοαντίστασης και παχυσαρκία, μέχρι και σε ποσοστό 50% των ασθενών, γεγονός που κάνει την διαφοροποίηση των δύο τύπων δύσκολη.[68] Σημαντικές διαφορές ωστόσο υπάρχουν και με τις δύο αυτές κατηγορίες όπως φαίνεται και στον Πίνακα 8.

	ΣΔτ1	ΣΔτ2	MODY3
Παθοφυσιολογία	Αυτοανοσία και καταστροφή των β-κυττάρων	Ινσουλινοαντίσταση και ανεπάρκεια των β-κυττάρων	Δυσλειτουργία των β-κυττάρων
Παρουσία παχυσαρκίας	<24% υπέρβαροι	85% υπέρβαροι	Ίδια συχνότητα με το γενικό πληθυσμό
Οικογενειακό Ιστορικό	5-10%	50-75%	Αυτοσωμική επικρατούσα κληρονομικότητα
Θεραπεία	Ινσουλίνη	Ινσουλίνη/Αντιδιαβητικά δισκία	Σουλφονυλουρίες
Ηλικία έναρξης νόσου	Νεαρή παιδική και εφηβεία	Συνήθως ενήλικη ζωή	Μέση ηλικία 20 έτη

Πίνακας 8. Βασικά χαρακτηριστικά που διαφοροποιούν τον ΣΔτ1 και ΣΔτ2 από τον ΣΔτMODY3.

2.10 Επιπλοκές του ΣΔτMODY3

Οι ασθενείς με ΣΔτMODY3 διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν τις επιπλοκές του ΣΔ. Το ποσοστό των μικροαγγειακών επιπλοκών (νευροπάθειας, αμφιβληστροειδοπάθειας, νεφροπάθειας) είναι περίπου ίσο με το αντίστοιχο ποσοστό στους ασθενείς με ΣΔτ2 και ΣΔτ1.[109] Ο κίνδυνος ανάπτυξης μακροαγγειακών επιπλοκών (στεφανιαίας νόσου και περιφερικής αγγειοπάθειας) ωστόσο είναι μικρότερος στα άτομα με ΣΔτMODY3 σε σύγκριση με τον ΣΔτ2, αλλά μεγαλύτερος από τα άτομα με ΣΔτ1. Ο κίνδυνος ανάπτυξης επιπλοκών συσχετίζεται κυρίως με το βαθμό της υπεργλυκαιμίας και λιγότερο με τη διάρκεια της νόσου.[110]

Σπανιότερες επιπλοκές που έχουν αποδειχθεί ότι σχετίζονται με μεταλλάξεις του γονιδίου *HNF1A* αφορούν ηπατικές βλάβες καθώς και κακοήθειες μεταλλάξεις. Αν και από το 1970 περιγράφησαν περιπτώσεις ατόμων με ηπατική αδενωμάτωση και διαβήτη, το 2002 παρουσιάστηκε η πρώτη συστηματική μελέτη που αποδείκνυε με μοριακές τεχνικές ότι ομόζυγη απενεργοποίηση του γονιδίου *HNF1A* αποτελούσε την αιτία των αδενωμάτων σε τουλάχιστον 50% των περιπτώσεων.[111-113] Οι περισσότερες περιπτώσεις αφορούσαν σωματικές μεταλλάξεις ή απαλείψεις του γονιδίου, αλλά μία τουλάχιστον περίπτωση ατόμου με γαμετική μετάλλαξη του

γονιδίου και τυπική εκδήλωση του ΣΔτMODY3 περιλαμβάνονταν στη μελέτη.[112] Από τότε περισσότερες περιπτώσεις ηπατικής αδενωμάτωσης δημοσιεύθηκαν, δίνοντας έμφαση στις σοβαρές επιπλοκές που μπορεί να φέρουν, όπως ρήξη και αιμορραγία του αδενώματος ή και κακοήγη μεταλλαγή τους, ενώ και μία περίπτωση πρώιμης ηπατικής στεάτωσης συσχετίστηκε με μετάλλαξη του γονιδίου.[114-117] Μάλιστα αρκετοί ερευνητές στη βιβλιογραφία αναφέρουν ότι το γονίδιο *HNF1A* φέρει χαρακτηριστικά ογκοκατασταλτικού γονιδίου, και επομένως η ομόζυγη απενεργοποίησή του μπορεί να οδηγήσει σε κακοήγη μεταλλαγή των κυττάρων.[112, 118] Εξαιτίας των σοβαρών επιπλοκών που ενέχει η ηπατική αδενωμάτωση, συστήνεται έλεγχος του ήπατος με απεικονιστικές μεθόδους κατά τη διάγνωση και ενδεχομένως κατά την παρακολούθηση των ασθενών. Διατυπώθηκε μάλιστα η υπόθεση ότι η ταυτόχρονη λήψη αντισυλληπτικών δισκίων με οιστρογόνα πιθανόν αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης των αδενωμάτων, και η συνταγογράφησή τους πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή.[114, 119]

2.11 Συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου

Ποικίλες μελέτες έχουν δημοσιευθεί με στόχο να περιγράψουν πιθανές συσχετίσεις γονοτύπου-φαινοτύπου. Αρχικά, οι περισσότερες μελέτες δεν απέδειξαν κάποια σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ηλικίας διάγνωσης της νόσου και του τύπου ή της θέσης της μετάλλαξης.[59] Εν συνεχεία όμως παρουσιάστηκαν στοιχεία που απεδείκνυαν κάποια συσχέτιση της μετάλλαξης που φέρει κάθε ασθενής με την έκφραση της νόσου. Για παράδειγμα το 2004 δημοσιεύθηκε μελέτη που συσχέτιζε την ηλικία έναρξης της νόσου με τη θέση της μετάλλαξης (μικρότερη ηλικία διάγνωσης για τις μεταλλάξεις που βρίσκονται στα εξώνια 1-6 σε σύγκριση με τα εξώνια 7-10). Η συσχέτιση αυτή περιοριζόταν στις σημειακές μόνο μεταλλάξεις, ενώ περαιτέρω συσχέτιση με τους άλλους τύπους μετάλλαξης ή με τη λειτουργική περιοχή της πρωτεΐνης δεν έφερε σημαντικά αποτελέσματα.[94] Περαιτέρω μελέτες επιβεβαίωσαν αυτό το εύρημα: μικρότερη ηλικία διάγνωσης στα άτομα με σημειακές μεταλλάξεις των πρώτων 6 εξονίων.[120]

2.12 Διάγνωση ΣΔτMODY3

Η διάγνωση του ΣΔτMODY3 παραμένει δύσκολη καθώς η κλινική εικόνα του διαβήτη παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με το ΣΔτ1 και 2. Τα κλασικά κριτήρια του ΣΔτMODY, όπως αναφέρονται παραπάνω, μπορούν να βοηθήσουν στην κατάταξη των ασθενών και τη διαφοροποίησή τους από το ΣΔτ1. Ωστόσο, η αυστηρή χρήση των κριτηρίων δεν βοηθάει στη διαφοροποίηση περιπτώσεων ΣΔτMODY3 από ΣΔτ2, καθώς υπάρχει μεγάλη αλληλοεπικάλυψη των χαρακτηριστικών ινσουλινοαντίστασης μεταξύ των δύο αυτών κατηγοριών

Με στόχο την διαφοροποίηση του ΣΔτMODY3 από τις άλλες περιπτώσεις διαβήτη, οι Bellane-Chantellot και συν. ανέπτυξαν έναν αλγόριθμο που συμπεριλαμβάνει 3 διαφορετικές παραμέτρους (Εικόνα 13). Ο αλγόριθμος αυτός εμφανίζει ευαισθησία 90% και ειδικότητα 49%, και αποτελεί μία από τις ακριβέστερες μεθόδους αναγνώρισης του ΣΔτMODY που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα.[102]

$P = 1 / (1 + \exp(2,095 - 0,3263 \times (\text{απουσία συμπτωμάτων}^*) - 0,2733 \times ((28,05 - \text{ηλικία}) / 5) - 0,0023 \times (25,47 - \text{BMI}) - 0,8416 \times (\geq 3 \text{ γενεές πάσχουσες}^*) - 1,3178 \times (\text{Καυκάσια φυλή}^*) - 0,200 \times (\text{απουσία συμπτωμάτων}^*) \times 25,47 - \text{BMI})))$
P= Πιθανότητα διάγνωσης ΣΔτMODY3 • * : 1 αν είναι αλήθεια, 0 σε διαφορετική περίπτωση • Ηλικία: ηλικία διάγνωσης σε έτη • BMI (Body Mass Index): Δείκτης μάζας σώματος στη διάγνωση (kg/m²)

Εικόνα 13. Αλγόριθμος των Bellane-Chantellot και συν. για την αναγνώριση του ΣΔτMODY3.

Ένα δεύτερο μοντέλο πρόβλεψης περιγράφηκε από τους Shields και συν. το 2012, το οποίο λαμβάνει υπόψη το φύλο, την ηλικία διάγνωσης της νόσου, τη θεραπεία του ασθενή, το οικογενειακό ιστορικό, το BMI και την τιμή της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (Εικόνα 14).[121] Σε αυτό το μοντέλο δημιουργήθηκαν δύο διαφορετικοί αλγόριθμοι. Ο πρώτος εφαρμόζεται σε ασθενείς με ανάγκη για ινσουλινοθεραπεία μέσα στους πρώτους 6 μήνες από τη διάγνωση και αφορά τη διαφοροποίηση των ασθενών από το ΣΔτ1, ενώ ο δεύτερος αναφέρεται στο διαχωρισμό από ΣΔτ2. Η ευαισθησία και η ειδικότητα των μοντέλων αυτών βρέθηκε

ότι είναι αρκετά υψηλή (91 και 94% αντίστοιχα για το βέλτιστο όριο), και υψηλότερη από την ευαισθησία των κλασικών κριτηρίων του ΣΔτMODY (72%).[121]

Age at diagnosis (years)	← Ηλικία διάγνωσης (έτη)
Sex	☐ Male ☐ Female ← Φύλο (Άρρεν ή θύλη)
Currently treated with insulin or OHA?	☐ Yes ☐ No ← Λαμβάνει την παρούσα περίοδο ινσουλίνη ή αντιδιαβητικό δισκίο; (Ναι ή όχι)
Time to Insulin Treatment (if currently treated with insulin)	☐ Not currently treated with insulin ← Δεν λαμβάνει ινσουλίνη ☐ Within 6 months of diagnosis ← Μέσα σε 6 μήνες από τη διάγνωση ☐ Over 6 months after diagnosis ← Περισσότερο από 6 μήνες μετά τη διάγνωση
BMI (kg/m ²)	
HbA1c (%)	or mmol/mol
Current Age (yrs)	← Τρέχουσα ηλικία (έτη)
Parent affected with diabetes?	☐ Yes ☐ No ← Πάσχων γονέας με διαβήτη; (Ναι ή όχι)

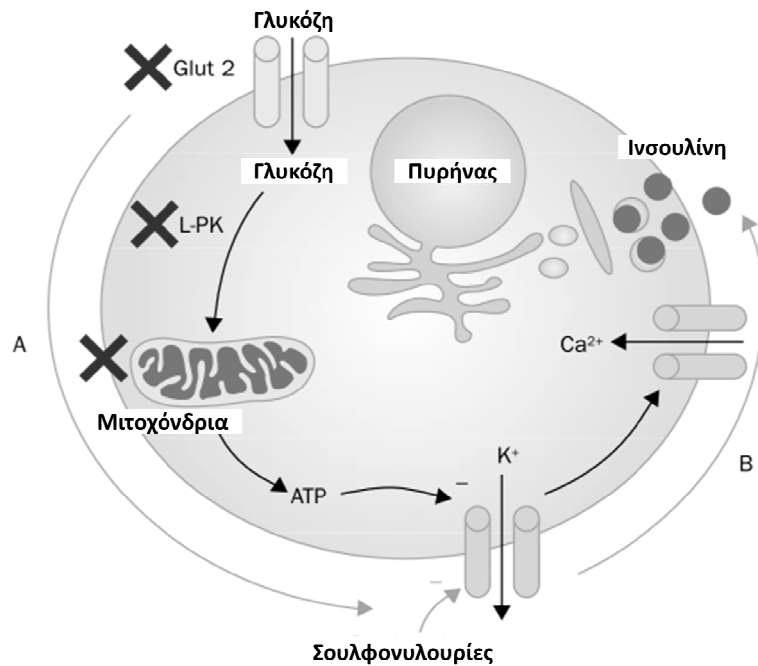
Χρόνος έναρξης
ινσουλινοθεραπείας
(εφόσον ο ασθενής
λαμβάνει ινσουλίνη)

Calculate Probability Reset

Εικόνα 14. Αλγόριθμος των Shields και συν. για το διαχωρισμό των περιπτώσεων ΣΔτMODY3 από τον ΣΔτ1 και τ2.

2.13 Θεραπεία του ΣΔτMODY3

Τα άτομα με ΣΔτMODY3 παρουσιάζουν αυξημένη ανταπόκριση στη θεραπεία με σουλφονουλιδίες.[122, 123] Οι Pearson και συν. απέδειξαν ότι οι ασθενείς που φέρουν μετάλλαξη του γονιδίου παρουσίασαν 5,2 φορές μεγαλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία με σουλφονουλιδία σε σύγκριση με τη μετφορμίνη, ενώ η ανταπόκρισή τους ήταν 3,9 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των ατόμων με ΣΔτ2.[124] Η ανταπόκριση στις σουλφονουλιδίες εικάζεται ότι προκύπτει από την παράκαμψη μεγάλου μέρους της βλάβης που προκαλείται από την έλλειψη της πρωτεΐνης HNF1A, όπως φαίνεται στην Εικόνα 15.[124]



Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού έκκρισης της ινσουλίνης από το β-κύτταρο και των βημάτων που επηρεάζονται από τις μεταλλάξεις του γονιδίου *HNF1A* (κόκκινο X), καθώς και του σημείου δράσης των σουλφονυλουριών.

Η μετάβαση ασθενών από άλλες θεραπευτικές επιλογές σε σουλφονυλουρίες έχει αποδειχθεί αποτελεσματική όσον αφορά τον έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης αίματος, καθώς και την ποιότητα ζωής των ασθενών.[125-127] Οι σύγχρονες συστάσεις αναφέρουν ότι οι ασθενείς με ΣΔτMODY3 πρέπει να ξεκινούν θεραπεία με χαμηλές δόσεις σουλφονυλουρίας (20-40mg γλικαζίδης), ενώ και οι ασθενείς που αρχικά τέθηκαν σε θεραπεία με ινσουλίνη ή άλλο αντιδιαβητικό δισκίο πρέπει να δοκιμάσουν μία περίοδο με σουλφονυλουρία. [55]

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. Υπόθεση μελέτης

Στον ελληνικό πληθυσμό, δεν υπάρχουν στοιχεία καταγραφής των διαβητικών ασθενών και της συχνότητας των διαφορετικών τύπων ΣΔ. Στη συγκεκριμένη μελέτη, γίνεται για πρώτη φορά η περιγραφή της συχνότητας του ΣΔτMODY στον ελληνικό πληθυσμό. Με τον τρόπο αυτό αναδεικνύεται η σημασία της περαιτέρω γονιδιακής διερεύνησης των περιπτώσεων ΣΔ, ιδιαίτερα σε άτομα νεαρής ηλικίας με θετικό οικογενειακό ιστορικό.

Επίσης γίνεται χαρτογράφηση των ανιχνευθέντων μεταλλάξεων στον ελληνικό πληθυσμό, για να διαπιστωθεί η ομοιότητά τους με τις μεταλλάξεις άλλων πληθυσμών. Επιπλέον γίνεται περιγραφή του φάσματος των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των ασθενών ώστε να διαπιστωθούν στοιχεία που διευκολύνουν τη διαφοροποίηση του ΣΔτMODY3 από τους υπόλοιπους τύπους ΣΔ.

Τέλος γίνεται προσπάθεια ανάδειξης συσχετίσεων γονοτύπου-φαινοτύπου. Δεδομένου ότι στην υπάρχουσα βιβλιογραφία δεν υπάρχουν σαφείς συσχετίσεις γίνεται προσπάθεια διερεύνησης όποιων διαφορών του φαινότυπου με βάση τον γονότυπο των ασθενών, γεγονός που θα διευκόλυνε τη γενετική συμβουλευτική και παρακολούθησή τους.

4. Ασθενείς και Μέθοδοι

4.1 Ασθενείς

Συνολικά, 395 άτομα παραπέμφθηκαν στο Εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας, της Α' Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία», από τον Ιανουάριο του 1996 μέχρι τον Ιούνιο του 2011 για μοριακό έλεγχο Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου MODY. Η παραπομπή των ατόμων αυτών από τον θεράποντα ιατρό τους, βασιζόνταν κυρίως στην εμφάνιση Σακχαρώδη Διαβήτη σε νεαρή ηλικία και με μικρές ανάγκες σε ινσουλίνη ή χωρίς άμεση ανάγκη για θεραπεία.

Κατά την αρχική επεξεργασία των δειγμάτων, όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε μοριακό έλεγχο για την παρουσία μεταλλάξεων του γονιδίου *HNF1A* εφαρμόζοντας μία μέθοδο σάρωσης, και συγκεκριμένα την μέθοδο DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis-DGGE). Με αυτή την μέθοδο σάρωσης, 8 άτομα ανιχνεύθηκαν με μετάλλαξη του γονιδίου. Ο αριθμός αυτός θεωρήθηκε χαμηλός σε σύγκριση με μελέτες άλλων ευρωπαϊκών χωρών. Δημιουργήθηκε λοιπόν η υπόθεση ότι η μέθοδος σάρωσης παρείχε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Για τη διερεύνηση της υπόθεσης αυτής, οι διαθέσιμοι στο εργαστήριο φάκελοι των ασθενών επανεξετάστηκαν. Με βάση τα διαθέσιμα δεδομένα, και αφού αποκλείστηκαν οι ασθενείς στους οποίους είχε ανιχνευθεί μετάλλαξη του γονιδίου *GCK-MODY2* (n=72), 54 επιπλέον άτομα βρέθηκαν να πληρούν τα κλινικά κριτήρια για Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου MODY που είναι τα εξής:

- 1) Σακχαρώδης Διαβήτης: Σάκχαρο νηστείας >126 mg/dl (6.99mmol/l) ή τιμή σακχάρου 2 ώρες μετά τη χορήγηση γλυκόζης κατά τη δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη (oral glucose tolerance test-OGTT) >200mg/dl (11.1mmol/l),
- 2) Οικογενειακό ιστορικό ΣΔ [ένας γονέας με ΣΔ ή διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη (Impaired Glucose Tolerance-IGT)] και
- 3) Ηλικία έναρξης ΣΔ <25 ετών σε ένα τουλάχιστον πάσχον μέλος της οικογένειας.

Από τα 54 άτομα που συμπεριελήφθησαν, 6 μελετήθηκαν περαιτέρω λόγω των αυξημένων τιμών σακχάρου αίματος και του θετικού οικογενειακού ιστορικού, παρά το γεγονός ότι η ηλικία έναρξης της νόσου σε κανένα μέλος της οικογένειας δεν ήταν <25 ετών, αλλά είχε εύρος από 26 έως 50 έτη. Τα επίπεδα των αυτοαντισωμάτων ήταν διαθέσιμα μόνο σε λίγους ασθενείς (n=14) και δεδομένου ότι πολλοί από τους φακέλους αφορούσαν παλαιούς ασθενείς με έναρξη της νόσου >5 χρόνια, η μέτρηση των αυτοαντισωμάτων τη στιγμή της μελέτης δεν θα έδινε ακριβή αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό το επίπεδο των αυτοαντισωμάτων δεν συμπεριελήφθη στα κριτήρια για τον περαιτέρω μοριακό έλεγχο. Επίσης μία ασθενής παραπέμφθηκε στο εργαστήριο μετά από τυχαία ανίχνευση ηπατικών αδενωμάτων και κληρονομικού διαβήτη. Μετά από τον έλεγχο του φακέλου της ασθενούς, διαπιστώθηκε ότι πληρούσε τα προαναφερθέντα κριτήρια και συμπεριελήφθη στη μελέτη.

Κατά την παραπομπή των ασθενών, ο παραπέμπων ιατρός ή ο ασθενής, στην περίπτωση που παρέδιδε ο ίδιος το δείγμα αίματος στο εργαστήριο, συμπλήρωνε το συνοπτικό ιστορικό των Εικόνων 16Α και 16Β. Στο ιστορικό αυτό καταγράφονται προσωπικές πληροφορίες του ατόμου, στοιχεία από το ατομικό του αναμνηστικό, πληροφορίες για την νόσο (ΣΔ), αποτελέσματα εργαστηριακών εξετάσεων και στοιχεία για το οικογενειακό του ιστορικό.

Η μελέτη εγκρίθηκε από το επιστημονικό συμβούλιο του Νοσοκομείου Παιδών «Η Αγία Σοφία». Επίσης πληροφορημένη συγκατάθεση για την επεξεργασία του γενετικού υλικού υπογράφηκε από τον ασθενή ή το νόμιμο κηδεμόνα του κατά την παράδοση του δείγματος.

ΙΣΤΟΡΙΚΟ MODY

Ονομα ασθενούς:.....DNA No.....
 Όνομα Πατέρα:.....DNA No.....
 Όνομα Μητέρας:.....DNA No.....
 Διεύθυνση:.....
 Τηλέφωνο:.....

ΗΓ:.....Βάρος Γέννησης :.....Εβδομάδα Κυήσεως.....
 Νεογνική Υπογλυκαιμία:.....Αν ναι: Γλυκόζη:.....Ινσουλίνη:.....

Ημερομηνία λήψης DNA.....
 ΒΣ:.....ΥΣ:.....BMI:.....

Ηλικία Αναγνώρισης Διαβήτη.....Γλυκόζη (διάγνωση):
 HbA1c (διάγνωση):.....

Συμπτώματα (διάγνωση):.....

Υπεργλυκαιμία Κύησης:.....Θεραπεία κατά την κύηση:.....

Περαιτέρω Εξέλιξη και αγωγή:.....

.....

Παγκρεατικά Αυτοαντισώματα:.....

Συνοδές παθήσεις:.....

Αυτοάνοσα νοσήματα:.....

Σημερινές τιμές σακχάρου-Πρωί:.....Μεταγευματικά:.....

		<u>OGTT</u>				
1 ^η Ημερομηνία:		0'	30'	60'	90'	120'
Γλυκόζη (mg/dl)						
Ινσουλίνη (μU/ml)						
2 ^η Ημερομηνία:		0'	30'	60'	90'	120'
Γλυκόζη (mg/dl)						
Ινσουλίνη (μU/ml)						

HbA1c:
 C-peptide:

B

Οικογενειακό ιστορικό

(ΣΔ Τύπος, τιμές γλυκόζης, θεραπεία)

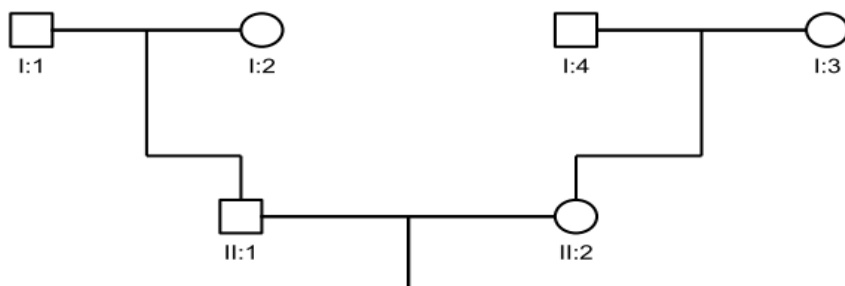
Μητέρα:

Πατέρας:.....

.....

.....

Έγγραφη έγκριση για έλεγχο DNA (επισυνάπτεται έντυπο)



Εικόνα 16. Α) και Β) Συνοπτικό ιστορικό που συμπληρώθηκε κατά την παραλαβή του δείγματος αίματος.

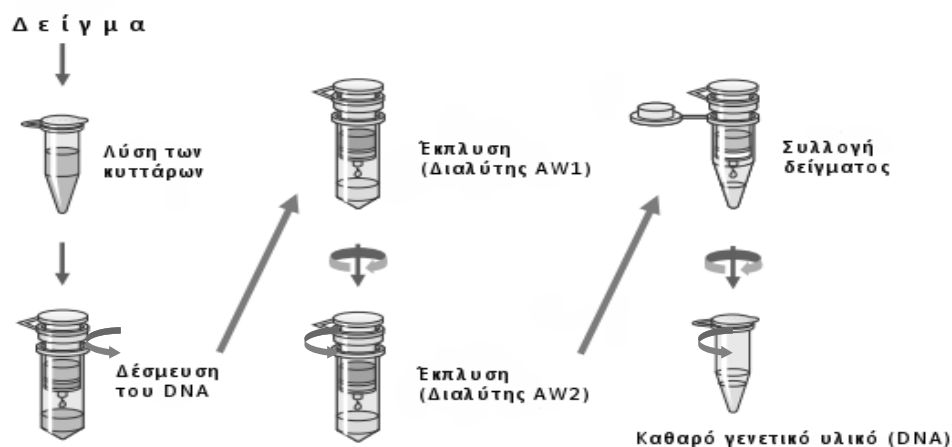
4.2 Μέθοδοι

4.2.1 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του DNA των ασθενών συλλέχθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος, ποσότητας περίπου 4 ml. Η συλλογή και αποθήκευση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε φιαλίδια που περιείχαν ως αντιπηκτικό παράγοντα το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (Ethylenediaminetetraacetic acid-EDTA).

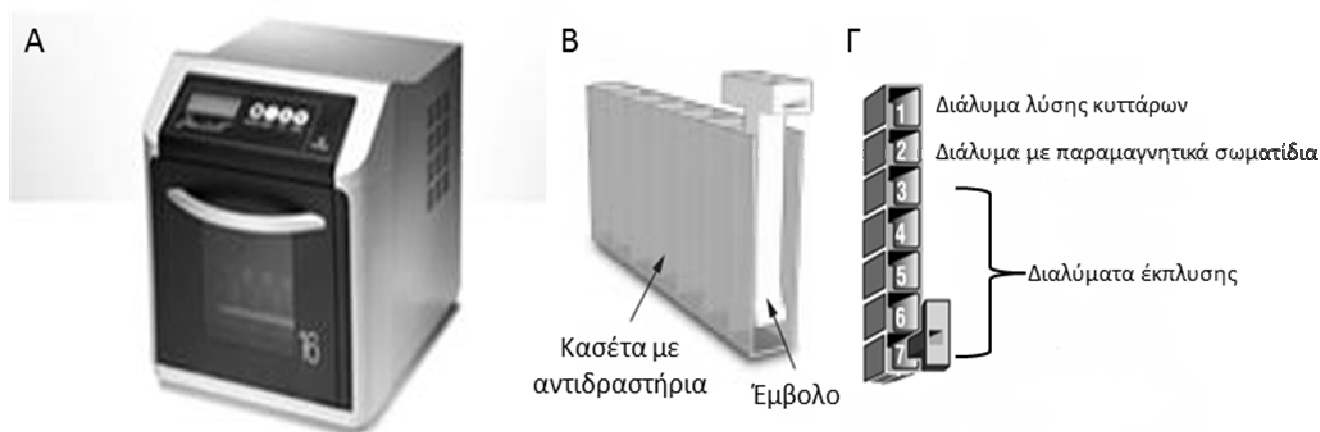
Τα λεμφοκύτταρα του δείγματος αυτού χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του γενετικού υλικού. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκαν δύο μέθοδοι απομόνωσης.

Η επεξεργασία των δειγμάτων που παραλήφθηκαν μέχρι τον Αύγουστο του 2008 έγινε με το QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Γερμανία). Το πρωτόκολλο που ακολουθείται σε αυτή τη μέθοδο περιλαμβάνει πολλαπλές φυγοκεντρήσεις του υλικού σε ειδικές κολώνες οι οποίες φέρουν μία ειδική μεμβράνη σιλικόνης-γέλης (QIAamp silica-gel membrane). Η μεμβράνη αυτή έχει την ιδιότητα να δεσμεύει το DNA, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά του αίματος διέρχονται ελεύθερα από αυτήν. Το δείγμα ξεπλένεται με δύο ειδικά ρυθμιστικά διαλύματα έκπλυσης (washing buffers) και στο τελικό στάδιο γίνεται η συλλογή του DNA σε νερό ή ειδικό διάλυμα έκλυσης (elution buffer) που παρέχεται από τον κατασκευαστή (Εικόνα 17). Η διαδικασία διαρκεί περίπου 20 λεπτά.



Εικόνα 17. Απεικόνιση των βημάτων που ακολουθούνται κατά την απομόνωση του DNA με το kit της Qiagen. (Το κυκλικό βέλος υποδεικνύει τα βήματα όπου είναι απαραίτητη η φυγοκέντρηση του δείγματος)

Η επεξεργασία των δειγμάτων που συλλέχτηκαν μετά τον Αύγουστο του 2008 έγινε με ειδικό μηχάνημα αυτόματης απομόνωσης DNA (Maxwell® 16, Promega, Madison, Η.Π.Α.) (Εικόνα 18Α). Κατά τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιούνται ειδικά Παραμαγνητικά Σωματίδια (Paramagnetic Particles). Τα σωματίδια αυτά με την βοήθεια ενός ισχυρού μαγνήτη δεσμεύονται και αποδεσμεύονται μέσα σε ειδικά ρυθμιστικά διαλύματα και διευκολύνουν τη λύση των κυττάρων, την έκπλυση του υλικού, και τελικά τη συλλογή του DNA. Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκαν 400μl αίματος που τοποθετούνται στη θέση 1 της κασέτας, όπως φαίνεται στην Εικόνα 18Β και 18Γ, και η οποία παρέχεται με τα αναγκαία ρυθμιστικά διαλύματα από την εταιρεία. Η τελική συλλογή του DNA πραγματοποιήθηκε σε 300μl διαλύματος έκλουσης. Η διαδικασία διαρκεί περίπου 35 λεπτά.



Εικόνα 18. Α) Απεικόνιση του μηχανήματος αυτόματης απομόνωσης γενετικού υλικού. Β) και Γ) Απεικόνιση της ειδικής κασέτας που χρησιμοποιείται για την απομόνωση του γενετικού υλικού. Παρέχεται γεμισμένη με τα ειδικά ρυθμιστικά διαλύματα, ενώ το έμβολο με την εφαρμογή μαγνητικού πεδίου και τη βοήθεια παραμαγνητικών σωματιδίων διευκολύνει τη δέσμευση και απομόνωση του DNA.

Μετά την απομόνωση του γενετικού υλικού, 5 μl του δείγματος και 1 μl χρωστικής ουσίας ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αгарόζης 1% w/v με βρωμιούχο αιθίδιο, μέσα σε διάλυμα TBE 10x (Tris και βορικό οξύ). Η γέλη παρατηρήθηκε υπό υπεριώδη ακτινοβολία για να ελεγχθεί η παρουσία και η ποιότητα του DNA.

4.2.2 Αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Μετά την απομόνωση του DNA, το κάθε δείγμα υποβλήθηκε σε πολλαπλασιασμό των εξωνίων 1-10 του γονιδίου *HNFL1A* με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR). Το προϊόν της αντίδρασης επεξεργάστηκε εν συνεχεία είτε με τη μέθοδο DGGE, είτε με αντίδραση αλληλούχησης (sequencing).

Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές (primers), ώστε να γίνει πολλαπλασιασμός όλων των εξωνίων καθώς και μικρής περιοχής των εσωνίων εκατέρωθεν των εξωνίων. Κατά το σχεδιασμό των εκκινητών ελήφθησαν υπόψη τα παρακάτω κριτήρια:

- Να είναι συμπληρωματικά των περιοχών που μας ενδιαφέρουν και να μην προσδένονται σε άλλες περιοχές του γονιδιώματος,
- Το μέγεθος των εκκινητών να είναι περίπου 18-21 βάσεις,
- Οι δύο εκκινητές κάθε ζεύγους να έχουν παρόμοιο ποσοστό A-T και G-C βάσεων ώστε να έχουν συγκρίσιμες θερμοκρασίες αναδιάταξης (T_m),
- Να μην έχουν υψηλή συγκέντρωση G-C,
- Να μην έχουν συμπληρωματικά άκρα, και
- Τα προϊόντα της κάθε αντίδρασης να μην είναι μεγαλύτερα των 450 βάσεων.

Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίστηκε η μέγιστη δυνατή ακρίβεια του πολλαπλασιασμού των εξωνίων του γονιδίου.

Για τις αντιδράσεις PCR, το προϊόν των οποίων προορίζονταν για περαιτέρω επεξεργασία με την μέθοδο DGGE, οι εκκινητές σχεδιάστηκαν ώστε ο ένας εκκινητής κάθε ζεύγους να περιέχει μία αλληλουχία 40 G και C βάσεων (GC-clamp). Τα εξώνια 8 και 9 πολλαπλασιάστηκαν σε μία αντίδραση. Στον Πίνακα 8 περιγράφονται οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR για DGGE.

Εξώνιο	Εμπρόσθιος (Forward) Εκκινητής	Ανάστροφος (Reverse) Εκκινητής
Εξώνιο 1	TAGCGTGGTGGACCCGGGCC	*TCTCCTGGGAGCGGGGACGG
Εξώνιο 2	*CCCCACCCTCAGAGTTGACA	CTTCCAGCCCCACCTATGAG
Εξώνιο 3	*AAGAATCAAGGGCAAGGTCA	ACCAGCACTGTTTCCCGCC
Εξώνιο 4	*TCAGAACCCTCCCCTTCATGCC	GGTGACTGCTGTCAATGGGAC
Εξώνιο 5	TGAGGCAGGACACTGCTTCC	*TGGGTTTTTCCTTACAAGCAAGG
Εξώνιο 6	CCGGACACAGCTTGGCTTCC	*CCACCCAGGTGCCCACCCAT
Εξώνιο 7	CTGATTCCCTCCCCTTCCACT	*ATCTCCTGCTGTGTGGGGCAC
Εξώνια 8-9	TCAGGCACGTTTGCCACGTCT	*GACAGTAAGGGAGGGGGTGG
Εξώνιο 10	*CTAGCAGCCTTGTTCCTCT	AAGCAGGCAGTACAGGCCCA

Πίνακας 8. Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR για DGGE. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει ότι ο εκκινητής φέρει GC clamp στο 3' άκρο του. (GC-clamp: CGGGCGGGGCGGCGGGACGG GCGCGGGGCGCGGCGGGCG)

Οι αντιδράσεις PCR για DGGE πραγματοποιήθηκαν με το ένζυμο πολυμεράση Promega MasterMix (Promega). Οι συνθήκες και οι θερμοκρασίες αναδιάταξης που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στους Πίνακες 9 και 10 αντίστοιχα.

Βήμα αντίδρασης	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95	5	1
Αποδιάταξη	94	0,5	} 35
Αναδιάταξη (Υβριδισμός)	55-65	1	
Επιμήκυνση	72	1	
Τελική επιμήκυνση	72	5	1
Διατήρηση δειγμάτων	4	∞	

Πίνακας 9. Συνθήκες της αντίδρασης PCR για DGGE.

Εξώνιο	Θερμοκρασία Αναδιάταξης (°C)	Μέγεθος Προϊόντος Αντίδρασης (bp)
Εξώνιο 1	65	405
Εξώνιο 2	60	380
Εξώνιο 3	55	300
Εξώνιο 4	60	398
Εξώνιο 5	57	210
Εξώνιο 6	60	264
Εξώνιο 7	60	249
Εξώνια 8-9	60	440
Εξώνιο 10	60	191

Πίνακας 10. Σύνοψη των θερμοκρασιών αναδιάταξης και του μεγέθους των προϊόντων της αντίδρασης PCR για DGGE. (bp-base pairs: ζεύγη βάσεων)

Για τις αντιδράσεις PCR, τα προϊόντα της οποίας προορίζονταν για την περαιτέρω επεξεργασία με την μέθοδο της αλληλούχησης (sequencing), χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά ζεύγη εκκινητών τα οποία δε διέθεταν GC-clamp. Επίσης σχεδιάστηκαν εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό του υποκινητή (promoter) του γονιδίου ο οποίος αναλύθηκε σε δύο προϊόντα. Για την αντίδραση PCR για αλληλούχηση καθώς και για την αντίδραση αλληλούχησης χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που συνοψίζονται στον Πίνακα 11. Τα εξώνια 5-6 και 8-9 πολλαπλασιάστηκαν σε μία αντίδραση. Συγκεκριμένα για τα εξώνια 5 και 6 σχεδιάστηκε και ένας εσωτερικός εκκινητής ο οποίος χρησιμοποιήθηκε μόνο στην αντίδραση αλληλούχησης.

Περιοχή Γονιδίου	Εμπρόσθιος Εκκινητής	Ανάστροφος Εκκινητής
Υποκινητής 2	ACTGTTCTTGGCACATGGTAATC	CCCTGCAAAGTGCAGGCCTCA
Υποκινητής 1	TCCCATCGCAGGCCATAGCTC	CCGTCTGCAGCTGGCTCAGTT
Εξώνιο 1	TAGCGTGGTGGACCCGGGCC	TCTCCTGGGAGCGGGGACGG
Εξώνιο 2	CCCCACCCTCAGGGTTGACA	CTTCCAGCCCCCACCTATGAG
Εξώνιο 2 (2 nd pair)	GCTCCATAACTGCTTTCATG	TGTGTAATGGGGATGGTGAA
Εξώνιο 3	AAGAATCAAGGGCAAGGTCA	ACCAGCACTGTTTCCCGCC
Εξώνιο 4	TCAGAACCCTCCCCTTCATGCC	GGTGACTGCTGTCAATGGGAC
Εξώνιο 5-6	TGGCCTAAGCAAACCAATGG	TGAGTCCCAGTGGCTCTTC
Εσωτερικοί εκκινητές εξωνίων 5-6	GAGATTCTGGAGCAGTCCCTA	TAGGGACTGCTCCAGAATCTC
Εξώνιο 7	ATTAGTGGCAGGTCCCAGTG	GTCCCAGAGACACATGCAGA
Εξώνια 8-9	AGTCTTGAGGCCTGGGACTA	ACAGTGACGGACAGCAACAG
Εξώνιο 10	CCCCATCCTGAGTACCCCTA	CAGGCTCAGGTCCTCCAG

Πίνακας 11. Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR για αλληλούχιση.

Η αντίδραση PCR για αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε με την πολυμεράση Hot Star MasterMix (Qiagen). Οι θερμοκρασίες αναδιάταξης καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης PCR για αλληλούχιση παρουσιάζονται στους Πίνακες 12 και 13 αντίστοιχα.

Βήμα αντίδρασης	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95	15	1
Αποδιάταξη	94	0,5	} 35
Αναδιάταξη (Υβριδισμός)	60-67	1	
Επιμήκυνση	72	1	
Τελική επιμήκυνση	72	10	1
Διατήρηση δειγμάτων	4	∞	

Πίνακας 12. Συνθήκες της αντίδρασης PCR για αλληλούχηση.

Ένα μέρος των προϊόντων των αντιδράσεων PCR (5μl) μαζί με 1μl χρωστικής ουσίας ηλεκτροφορήθηκε σε γέλη αгарόζης 2% w/v με βρωμιούχο αιθίδιο. Η γέλη τοποθετήθηκε σε συσκευή ηλεκτροφόρησης με διάλυμα TBE και με την εφαρμογή ρεύματος έγινε διαχωρισμός των προϊόντων της αντίδρασης ανάλογα με το μέγεθος τους. Κατά την παρατήρηση της γέλης υπό υπεριώδη ακτινοβολία, αξιολογήθηκε η καθαρότητα του προϊόντος, η παρουσία μη ειδικών προϊόντων, και με τη βοήθεια ειδικού δείγματος-κλίμακας (ladder) υπολογίστηκε το μέγεθος του

Εξώνιο	Θερμοκρασία Αναδιάταξης (°C)	Μέγεθος Προϊόντος Αντίδρασης (bp)
Υποκινητής 2	62	472
Υποκινητής 1	62	385
Εξώνιο 1	67	405
Εξώνιο 2	60	380
Εξώνιο 3	60	300
Εξώνιο 4	60	398
Εξώνιο 5-6	60	670
Εξώνιο 7	62	462
Εξώνια 8-9	60	517
Εξώνιο 10	63	301

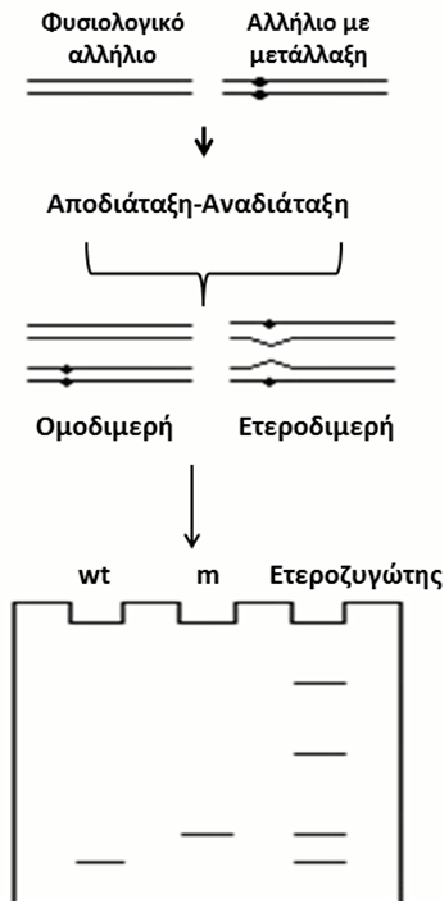
εκάστοτε προϊόντος, ώστε να εξασφαλισθεί ότι πρόκειται για το αναμενόμενο.

Πίνακας 13. Σύνοψη των θερμοκρασιών αναδιάταξης και του μεγέθους των προϊόντων της αντίδρασης PCR για αλληλούχηση. (bp-base pairs: ζεύγη βάσεων)

4.2.3 Σάρωση των δειγμάτων με τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αποδιατακτικού παράγοντα υπό κλίση (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis-DGGE)

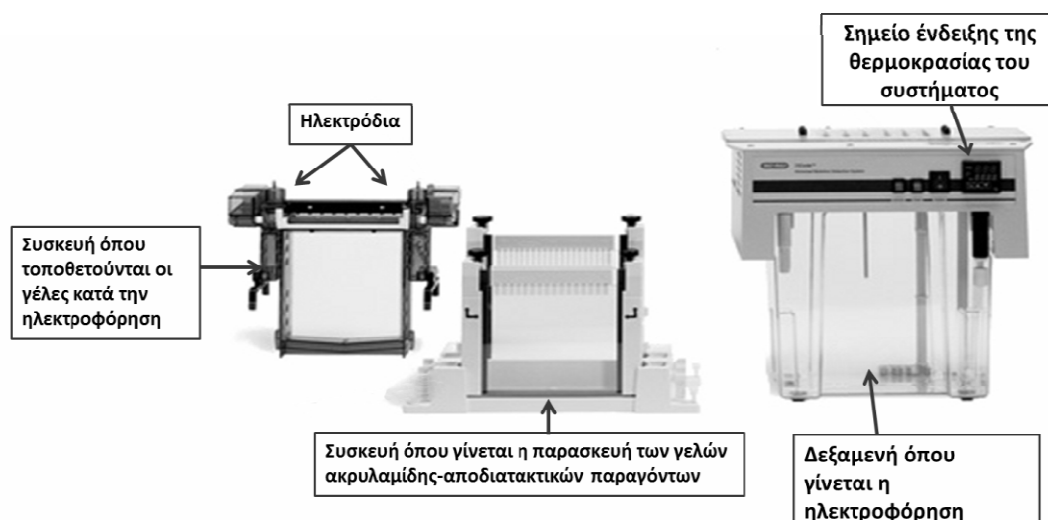
Για όλους τους ασθενείς που παραπέμφθηκαν στο εργαστήριο, ο αρχικός έλεγχος των δειγμάτων περιελάμβανε την επεξεργασία των δειγμάτων με τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αποδιατακτικού παράγοντα υπό κλίση.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί ειδικές γέλες ακρυλαμίδης με αυξανόμενη συγκέντρωση αποδιατακτικών παραγόντων κατά μήκος του πηκτώματος. Βασίζεται στην ιδιότητα των διαφορετικών, έστω και κατά μία βάση, δίκλωνων μορίων DNA να διαθέτουν διαφορετικά σημεία αποδιάταξης (T_m). Το σημείο τήξης εξαρτάται από τη συγκέντρωση του προϊόντος σε G-C και A-T. Κατά την ηλεκτροφόρηση, τα δίκλιωνα μόρια DNA συναντούν αυξανόμενες πυκνότητες αποδιατακτικών παραγόντων. Όταν ένα μόριο βρεθεί σε εκείνες τις συνθήκες που καθορίζουν το μοναδικό για αυτό σημείο αποδιάταξης, τότε αρχίζει η μετατροπή της διπλής έλικας του DNA σε μονόκλωνο μόριο. Η αλλαγή αυτή οδηγεί σε δραματική επιβράδυνση της κίνησής του στη γέλη, και ουσιαστικά στην ακινητοποίησή του. Για να παρεμποδιστεί η πλήρης αποδιάταξη του μορίου, που θα οδηγούσε σε αδυναμία ανίχνευσης των διαφορών, στην αλληλουχία των ακραίων τμημάτων του χρησιμοποιείται, όπως ήδη αναφέρθηκε, η αλληλουχία πολλαπλών G και C βάσεων (GC-clamp). Η παρουσία αυτής της αλληλουχίας, που διαθέτει ιδιαίτερα υψηλή θερμοκρασία αποδιάταξης, σε κάθε προϊόν που ηλεκτροφορείται καθιστά δυνατή την πληρέστερη εξέταση όλης της αλληλουχίας του. Με τη μέθοδο αυτή τα προϊόντα μίας αντίδρασης που έχουν το ίδιο μέγεθος αλλά διαφέρουν ως προς την αλληλουχία τους, έστω και κατά ένα μόνο νουκλεοτίδιο, (π.χ. το προϊόν πολλαπλασιασμού ενός εξωνίου από το δείγμα ενός ατόμου ετεροζυγώτη για κάποιον πολυμορφισμό ή μετάλλαξη) εμφανίζουν διαφορετικό μοτίβο ηλεκτροφόρησης στη γέλη ακρυλαμίδης (Εικόνα 19). Τα ίδια προϊόντα δε θα μπορούσαν να διαχωριστούν σε απλές γέλες αгарόζης.



Εικόνα 19. Απεικόνιση των διαφορετικών μοτίβων ηλεκτροφόρησης δειγμάτων από ομοζυγώτη και ετεροζυγώτη για κάποια μετάλλαξη. (wt-wild type= φυσιολογικό αλλήλιο, m-mutant=αλλήλιο με μετάλλαξη)

Ως αποδιατακτικοί παράγοντες χρησιμοποιήθηκαν οι ουσίες φορμαμίδιο και ουρία. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ειδικές συσκευές κάθετης ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 20) της εταιρείας Biorad (CA, Η.Π.Α.) μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (μίγμα Tris, οξικού οξέος και EDTA, με pH=8,2). Η θερμοκρασία του συστήματος ήταν σταθερή στους 60°C και η τάση ρεύματος στα 45mV. Ηλεκτροφορήθηκαν 15μl του προϊόντος της PCR μαζί με 5μl χρωστικής ουσίας. Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης ήταν περίπου 16 ώρες και ακολουθούσε εμβύθιση της γέλης σε διάλυμα με βρωμιούχο αιθίδιο για 2-3 λεπτά και παρατήρησή της υπό υπεριώδη ακτινοβολία.



Εικόνα 20. Συσκευή ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αποδιατακτικού παράγοντα υπό κλίση (Biorad).

Οι κλίσεις της συγκέντρωσης των αποδιατακτικών παραγόντων για κάθε εξώνιο φαίνονται στον Πίνακα 14.

Περιοχή Γονιδίου	Κλίση αποδιατακτικού παράγοντα
Εξώνιο 1	45-75 (ακρυλαμίδη 8%)
Εξώνιο 2	45-75 (ακρυλαμίδη 8%)
Εξώνιο 3	40-70 (ακρυλαμίδη 8%)
Εξώνιο 4	45-75 (ακρυλαμίδη 8%)
Εξώνιο 5	40-70 (ακρυλαμίδη 8%)
Εξώνιο 6	40-70 (ακρυλαμίδη 8%)
Εξώνιο 7	45-75 (ακρυλαμίδη 8%)
Εξώνια 8-9	45-75 (ακρυλαμίδη 10%)
Εξώνιο 10	45-75 (ακρυλαμίδη 8%)

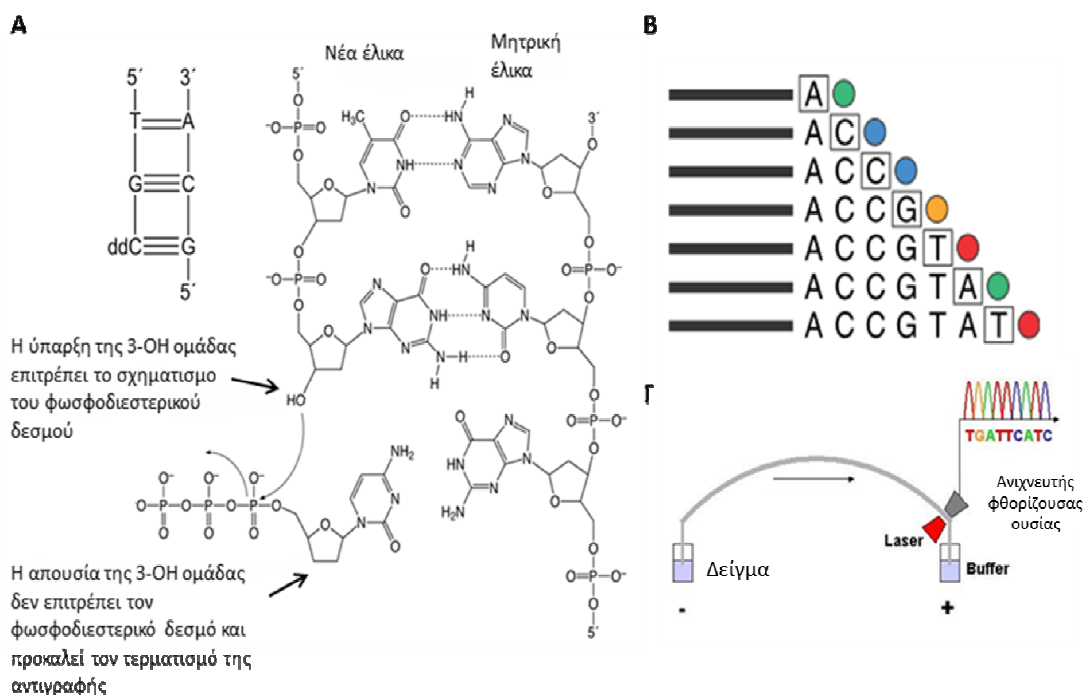
Πίνακας 14. Κλίσεις της συγκέντρωσης των αποδιατακτικών παραγόντων.

4.2.4 Αντίδραση αλληλούχησης (Sequencing)

Τα δείγματα τα οποία κατά την ανάλυση με τη μέθοδο DGGE παρουσίασαν παθολογικό μοτίβο ηλεκτροφόρησης, πολλαπλασιάστηκαν με PCR για το συγκεκριμένο εξώνιο με τους ειδικούς για την αντίδραση αλληλούχησης εκκινητές, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Για τα δείγματα τα οποία δεν ανέδειξαν παθολογικό ηλεκτροφορητικό μοτίβο, έγινε πολλαπλασιασμός όλων των εξωνίων του γονιδίου και του υποκινητή με τους ειδικούς για αλληλούχηση εκκινητές.

Η ανάλυση της αλληλουχίας των εξωνίων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Sanger σε μηχανήματα αυτόματης ανάλυσης της αλληλουχίας (ABI 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Η.Π.Α.) χρησιμοποιώντας το Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Η.Π.Α.). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα της πολυμεράσης να χρησιμοποιεί κατά την αντιγραφή της μητρικής έλικας του DNA με την ίδια ευαισθησία νουκλεοτίδια (dNTPs) και διδεδοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs). Τα διδεδοξυνουκλεοτίδια δεν διαθέτουν την 3'-υδροξυλική (OH) ομάδα που είναι απαραίτητη για τον 3'-5' φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ των νουκλεοτιδίων και επομένως η παραγόμενη έλικα DNA τερματίζεται πρόωρα. Με την τεχνική της κυκλικής αλληλούχησης παράγονται πολλαπλά προϊόντα που διαφέρουν κατά μία μόνο βάση. Επιπλέον, είναι δυνατή η σήμανση των 4 διαφορετικών διδεδοξυνουκλεοτιδίων (ddATP, ddCTP, ddGTP και ddTTP) με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική ουσία που καθιστά δυνατή την ταυτοποίηση του τελικού διδεδοξυνουκλεοτιδίου κάθε προϊόντος. Μετά την αντίδραση της αλληλούχησης είναι απαραίτητη η ηλεκτροφόρηση του δείγματος σε τριχοειδές με ειδικό πολυμερές. Κατά την ηλεκτροφόρηση και την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού το προϊόν της αντίδρασης που περιέχει μόρια DNA που έχουν τερματιστεί σε διαφορετικές θέσεις, διαχωρίζεται ανάλογα με το μοριακό βάρος. Το δείγμα διέρχεται μέσα από θύρα όπου συναντά μία δέσμη ακτίνας λέιζερ. Το φθορίζον σεσημασμένο νουκλεοτίδιο που συναντά την ακτίνα λέιζερ, εκπέμπει κάθε φορά φως σε διαφορετικό μήκος κύματος. Το φως αυτό συλλέγεται από ειδικό επεξεργαστή και μεταφράζεται σε διαφορετικό χρώμα (Αδενίνη: πράσινο, Θυμίνη: κόκκινο, Γουανίνη: μαύρο, Κυτοσίνη: μπλε). Μετά την επεξεργασία των δεδομένων, παράγεται ένα χρωματογράφημα που περιέχει ένα έπαρμα διαφορετικού χρώματος σε κάθε θέση νουκλεοτιδίου (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. Α) Απεικόνιση του φωσφοδιεστερικού δεσμού και της συνέπειας της προσθήκης ενός διδεόξυνουκλεοτιδίου. **Β)** Κάθε ένα από τα τέσσερα διαφορετικά διδεοξυνουκλεοτίδια (ddATP, ddCTP, ddGTP και ddTTP) σημαίνεται με διαφορετικό φθορίζον χρώμα. **Γ)** Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης του προϊόντος της αντίδρασης αλληλούχησης.[128]

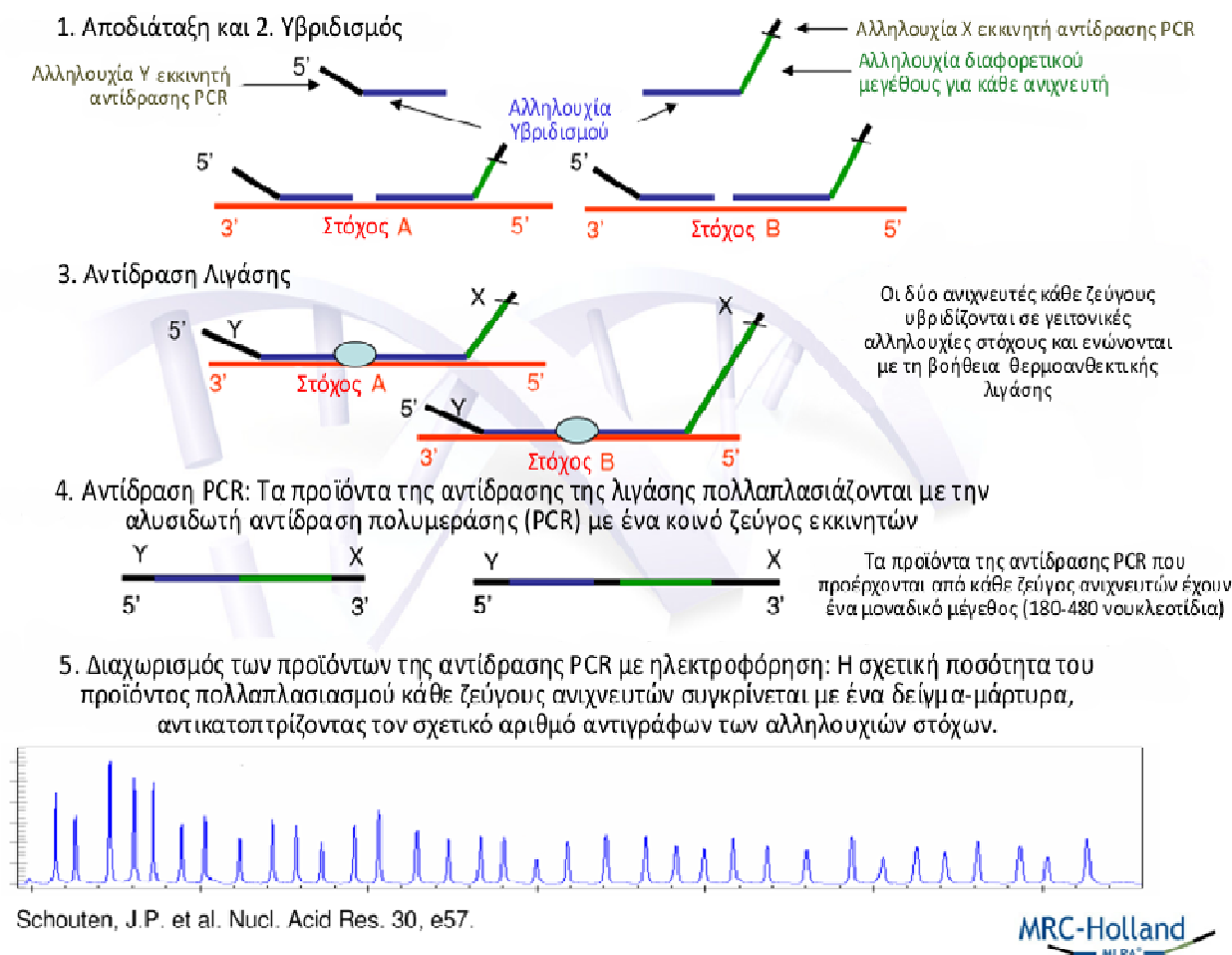
Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Chromas 2.33 (Technelysium Pty Ltd).

Στα δείγματα στα οποία ανιχνεύθηκε κάποια παθολογική μετάλλαξη, έγινε επιβεβαίωση του αποτελέσματος με δεύτερη ανεξάρτητη αντίδραση PCR και αλληλούχηση του προϊόντος. Σε αυτή την περίπτωση αναλύθηκε επίσης η αλληλουχία και για τα δείγματα των γονέων ή διαθέσιμων δειγμάτων από άλλα πάσχοντα μέλη της οικογένειας του ασθενούς, για να διαπιστωθεί ο τρόπος κληρονόμησης της γονιδιακής βλάβης καθώς και την πρώιμη διάγνωση άλλων φορέων της μετάλλαξης.

4.2.5 Μέθοδος πολλαπλής ενίσχυσης ανιχνευτών εξαρτώμενη από την αντίδραση λιγάσης (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification-MLPA)

Τα δείγματα, στα οποία δεν ανιχνεύθηκε κάποια γονιδιακή διαταραχή με τις παραπάνω μεθόδους, επεξεργάστηκαν εν συνεχεία με τη μέθοδο πολλαπλής ενίσχυσης ανιχνευτών εξαρτώμενη από την αντίδραση λιγάσης (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification-MLPA, MRC-Holland, Ολλανδία).

Στη μέθοδο αυτή ειδικοί ανιχνευτές (probes) σχεδιασμένοι σε ζεύγη που απέχουν λίγα νουκλεοτίδια μεταξύ τους και που καλύπτουν αρκετούς γονιδιακούς τόπους, υβριδίζονται με συγκεκριμένη ποσότητα DNA. Οι ειδικοί αυτοί ανιχνευτές έχουν κοινές ακραίες αλληλουχίες και μία επιπλέον παρεμβαλλόμενη αλληλουχία μοναδικού μεγέθους για κάθε ζεύγος. Μετά τον υβριδισμό, προστίθεται στο δείγμα το ένζυμο λιγάση που σταθεροποιεί τους υβριδισμένους ανιχνευτές. Το προϊόν αυτής της αντίδρασης υποβάλλεται εν συνεχεία σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τη χρήση εκκινητών συμπληρωματικών των κοινών ακραίων αλληλουχιών. Το προϊόν της αντίδρασης που προέρχεται από κάθε ζεύγος ανιχνευτών έχει ένα μοναδικό μέγεθος. Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους με ηλεκτροφόρηση. Το ύψος κάθε επάρματος συγκρίνεται με το ύψος του αντίστοιχου επάρματος του δείματος-μάρτυρα. Η σύγκριση αυτή αντικατοπτρίζει το σχετικό αριθμό αντιγράφων της συγκεκριμένης αλληλουχίας στόχου. Η μέθοδος παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 22.



Εικόνα 22. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου πολλαπλής ενίσχυσης ανιχνευτών εξαρτώμενη από την αντίδραση λιγάσης.

Για την ανάλυση MLPA χρησιμοποιήθηκε το SALSA MLPA KIT P241-B1 MODY (MRC-Holland, Ολλανδία). Το συγκεκριμένο kit περιέχει 42 ανιχνευτές που καλύπτουν τέσσερα από τα γονίδια που συσχετίζονται με το ΣΔτMODY (*HNF4A*, *GCK*, *HNF1A* και *HNF1B*). Συγκεκριμένα για τα δείγματα της μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν αρχικά 50 ng DNA, που υπολογίστηκαν μετά από τον καθορισμό της συγκέντρωσης των δειγμάτων με φωτομέτρηση χρησιμοποιώντας το μηχάνημα NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, DE, Η.Π.Α.).

Τα αποτελέσματα της μεθόδου MLPA αναλύθηκαν με το πρόγραμμα GeneMarker® V1.95 (SoftGenetics, LLC, State College, PA, Η.Π.Α.).

4.2.6 *In silico* πρόβλεψη της παθογόνου δράσης σημειακών αλλαγών

Δύο προγράμματα πρόβλεψης της παθογόνου δράσης σημειακών αλλαγών που οδηγούν σε τροποποίηση ενός αμινοξέος χρησιμοποιήθηκαν για τις νέες μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στους ασθενείς της μελέτης: το PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) και το SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant).

Το πρόγραμμα PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) (Εικόνα 23) χρησιμοποιεί 8 κριτήρια που βασίζονται στην αλληλουχία των αμινοξέων και 3 κριτήρια που βασίζονται στη δομή τους. Η πλειονότητα αυτών των κριτηρίων βασίζεται σε σύγκριση των ιδιοτήτων του φυσιολογικού αλληλίου με το αλλήλιο που φέρει την αλλαγή. Τα κυριότερα χαρακτηριστικά που βοηθούν στην πρόβλεψη είναι πόσο πιθανό είναι να βρεθεί η μετάλλαξη σε ένα αλλήλιο κατά την πολλαπλή στοίχιση ομόλογων αλληλουχιών, πόσο διαφορετική είναι η πρωτεΐνη που παράγεται από τη φυσιολογική πρωτεΐνη στον άνθρωπο και αν η αλλαγή βρίσκεται σε σημείο του γονιδίου με αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων. Δημιουργείται έτσι ένα μοντέλο πρόβλεψης στηριγμένο στο θεώρημα πιθανοτήτων Bayes. Το πρόγραμμα χρησιμοποιεί δύο διαφορετικές πλατφόρμες δεδομένων και οδηγεί σε δύο διαφορετικές βαθμολογήσεις των αποτελεσμάτων. Η βαθμολογία HumDiv αφορά σπάνιες αλλαγές σε γονιδιακούς τόπους όπου διερευνάται η συσχέτισή τους με πολύπλοκους φαινότυπους και στηρίζεται σε δεδομένα από 3.155 παθογόνα αλλήλια από τη βάση δεδομένων UniProt και 6.321 παραλλαγών μεταξύ των ανθρώπινων πρωτεϊνών και των ομόλογων τους. Η δεύτερη βαθμολογία είναι η HumVar και αφορά αλλαγές που προκαλούν κληρονομούμενες ασθένειες με μενδελιανή κληρονομικότητα και στηρίζεται σε 13.032 μεταλλάξεις που προκαλούν ασθένειες από τη βάση δεδομένων UniProt και 8.946 μη-συνώνυμους πολυμορφισμούς (nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms-nsSNPs) που δεν έχει αποδειχθεί να προκαλούν ασθένεια. Για να θεωρηθεί μία αλλαγή παθογόνος πρέπει οι βαθμολογίες HumVar και HumDiv να είναι πλησίον του 1. [129]

Για κάθε μετάλλαξη, το πρόγραμμα υπολογίζει την πιθανότητα να είναι παθογόνος και παρέχει επίσης την ένδειξη «Καλοήθης» (“Benign”), «Πιθανόν παθογόνος» (“Possibly damaging”), «Πιθανότατα παθογόνος» (“Probably damaging”) ή «Άγνωστης Παθογονικότητας» (“Unknown”).



PolyPhen-2

prediction of functional effects of human nsSNPs

Home
About
Help
Downloads
Batch query
WHESS.db

PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) is a tool which predicts possible impact of an amino acid substitution on the structure and function of a human protein using straightforward physical and comparative considerations. Please, use the form below to submit your query.

15-Feb-2012: PolyPhen-2 server has been updated to utilize version 2.2.2 of the software, protein sequences from **UniProtKB/UniRef100** Release 2011_12 (14-Dec-2011), structures from **PDB/DSSP** Snapshot 03-Jan-2012 (78,304 entries) and **UCSC** MultiZ multiple alignments of 45 vertebrate genomes with hg19/GRCh37 human genome (08-Oct-2009)

Query Data

Σημείο εισαγωγής της αλληλουχίας της φυσιολογικής πρωτεΐνης

Protein or SNP identifier

Protein sequence in FASTA format

Position

Σημείο επιλογής του αμινοξέος της φυσιολογικής πρωτεΐνης (AA1) και του αμινοξέος της πρωτεΐνης που προκύπτει από τη σημειακή αλλαγή (AA2)

Substitution
Query description

AA₁
AA₂

ARNDCEQGHILKMFPSTWYV
ARNDCEQGHILKMFPSTWYV

Θέση του αμινοξέος όπου ανιχνεύτηκε η μετάλλαξη

Εικόνα 23. Απεικόνιση της ιστοσελίδας του προγράμματος PolyPhen-2

Το δεύτερο *in silico* πρόγραμμα είναι το SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) (<http://sift.jcvi.org/>) (Εικόνα 24). Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιεί μόνο την πολλαπλή στοίχιση της αλληλουχίας που μας ενδιαφέρει, και όχι τα δομικά χαρακτηριστικά των αμινοξέων. Χρησιμοποιεί έναν ειδικό αλγόριθμο που στηρίζεται στο βαθμό συντήρησης των αμινοξέων της πρωτεΐνης μεταξύ διαφορετικών ειδών. Αλλαγές που παρατηρούνται σε εξαιρετικά συντηρημένες περιοχές θεωρούνται μη ανεκτές. Έτσι τα αποτελέσματα του προγράμματος περιγράφουν μία σημειακή αλλαγή ως «Παθογόνο» (“DAMAGING”) ή ως «Ανεκτή» (“TOLERATED”) και παρέχεται μία βαθμολογία (SIFT prediction score) η οποία όταν λαμβάνει τιμές $<0,05$ υποδεικνύει παθογόνο αλλαγή. Παράλληλα το ίδιο πρόγραμμα χρησιμοποιεί ένα μέτρο της ακρίβειας των αποτελεσμάτων μέσω της καταγραφής της ποικιλότητας που παρατηρείται στην περιοχή του γονιδίου που

65

μελετάται. Το μέτρο αυτό ονομάζεται διάμεση τιμή συντήρησης (median conservation value) και λαμβάνει τιμές από το 1 έως 4,32. Για να θεωρηθεί ότι ένα αποτέλεσμα είναι αξιόπιστο, πρέπει η περιοχή να παρουσιάζει επαρκή ποικιλότητα κατά τη στοίχιση και η διάμεση τιμή συντήρησης να είναι περίπου 3. Αν η τιμή αυτή είναι $>3,25$ θεωρείται ότι το σύνολο των αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση είναι πολύ συντηρημένο και ότι το αποτέλεσμα έχει χαμηλό βαθμό αξιοπιστίας.[130]

J. Craig Venter™
INSTITUTE

SIFT Human Protein

[JCVI Home](#) [SIFT Home](#) [Help](#) [Team](#) [Contact us](#)

→ SIFT Home

→ Help

→ Contact us

Σημείο εισαγωγής της διεύθυνσης email όπου αποστέλλονται τα αποτελέσματα

→

Σημείο εισαγωγής της αλλαγής της αλληλουχίας των αμινοξέων της πρωτεΐνης

→

User Input

Enter your email address if you want the results through email :
Please check that your address is correct and your mailbox is not full.

Protein Ensembl ENSP IDs
One ENSP number (starting with ENSP) per line (Limit 1000 proteins, please!).
[Sample format]

Paste in ENSP numbers, and any substitutions

-or-

Upload file containing ENSP numbers and substitutions

Επιλογή αρχείου

 Δεν έχει επι...ανένα αρχείο

Υποβολή

Επαναφορά

Page last modified: August 2011

© J. Craig Venter Institute | Privacy Statement | Data D

Εικόνα 24. Απεικόνιση της ιστοσελίδας του προγράμματος SIFT

4.2.7 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα IBM SPSS v.20 (IBM Corporation, Η.Π.Α.). Εξαιτίας του μικρού μεγέθους των προς ανάλυση δεδομένων, θεωρήθηκε εκ των προτέρων ότι η κατανομή των τιμών δεν είναι κανονική και χρησιμοποιήθηκαν μη-παραμετρικές στατιστικές μέθοδοι.

Συγκεκριμένα, η συσχέτιση της ηλικίας έναρξης και του σακχάρου αίματος κατά τη διάγνωση με τη θέση της μετάλλαξης στο γονίδιο αναλύθηκε με το μη-παραμετρικό τεστ Mann-Whitney, που δεν προϋποθέτει την κανονική κατανομή των δεδομένων. Το ίδιο τεστ χρησιμοποιήθηκε και για τη σύγκριση της ηλικίας και του σακχάρου αίματος κατά τη διάγνωση του ΣΔ μεταξύ των ασθενών με μετάλλαξη του γονιδίου και των ασθενών που δεν έφεραν κάποια γνωστή γονιδιακή διαταραχή. Η συσχέτιση του είδους της λαμβανόμενης θεραπείας των ασθενών με ΣΔtMODY3 ανάλογα με τη θέση της μετάλλαξης πραγματοποιήθηκε με το τεστ χ^2 . Η σύγκριση της ηλικίας έναρξης της νόσου των ασθενών με μετάλλαξη του γονιδίου *HNFL1A* σε σύγκριση με την ηλικία έναρξης της νόσου στους γονείς τους έγινε με την μη-παραμετρική μέθοδο Wilcoxon-signed rank. Οι τιμές αναφέρονται ως μέση τιμή $\pm$ σταθερή απόκλιση (standard deviation $\pm$ SD).

Πρέπει να αναφερθεί ότι εξαιτίας του μικρού αριθμού των αναλυόμενων δεδομένων, η ισχύς των στατιστικών μεθόδων είναι χαμηλή, και τα περισσότερα αποτελέσματα δεν αναδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στην πραγματική απουσία διαφορών, είτε στη χαμηλή ισχύ που δεν επέτρεψε σημαντικές διαφορές να αναδειχθούν στατιστικά.

5. Αποτελέσματα

5.1 Συχνότητα Μεταλλάξεων στον Ελληνικό πληθυσμό

Συνολικά ανιχνεύτηκαν 15 διαφορετικές μεταλλάξεις σε 16 ασθενείς χωρίς μεταξύ τους συγγένεια, καθώς και σε 13 συγγενείς των ασθενών.

Αυτό σημαίνει ότι το ποσοστό ανίχνευσης μεταλλάξεων του γονιδίου *HNF1A*, στην ομάδα των ασθενών που πληρούσαν τα κριτήρια της μελέτης και στους οποίους δεν είχε ανιχνευθεί μετάλλαξη του γονιδίου της γλυκοκινάσης, είναι 26% (16/62). Λαμβάνοντας υπόψη συνολικά όλους τους ασθενείς που απευθύνθηκαν στο εργαστήριο και πληρούσαν τα κριτήρια για ΣΔτMODY (74 που ανιχνεύθηκαν με μετάλλαξη του γονιδίου της γλυκοκινάσης και 62 που συμπεριελήφθησαν σε αυτή τη μελέτη) η συχνότητα του ΣΔτMODY3 είναι 12% (16/134).

Το αντίστοιχο ποσοστό ασθενών με ΣΔτMODY2 είναι 55% (74/134). Επομένως οι περισσότεροι ασθενείς με νεανικό οικογενή διαβήτη στον ελληνικό πληθυσμό φέρουν μετάλλαξη του γονιδίου της γλυκοκινάσης.

Κατά την ολοκλήρωση της μελέτης, 44 ασθενείς που πληρούσαν τα κριτήρια για οικογενή σακχαρώδη διαβήτη δεν έφεραν μετάλλαξη των γονιδίων *HNF1A* ή *GCK*. Επομένως περίπου 33% του πληθυσμού (1/3), φέρει κάποια άλλη γονιδιακή βλάβη πέρα των συχνότερα περιγραφόμενων μεταλλάξεων οι οποίες συνδέονται με τον ΣΔτMODY2 και 3.

Στόχος της παρούσας μελέτης δεν ήταν η ανάλυση των γονιδίων που συνδέονται με τους υπόλοιπους τύπους ΣΔτMODY. Ωστόσο, κατά την εφαρμογή της μεθόδου MLPA, 3 από τους 44 ασθενείς βρέθηκαν να φέρουν απάλειψη μέρους ή ολόκληρων των γονιδίων *HNF4A* (MODY1) ή *HNF1B* (MODY4). Επειδή δεν πραγματοποιήθηκε έλεγχος με αλληλούχηση των γονιδίων αυτών, δεν είναι δυνατόν να υπολογιστεί η συχνότητα των αντιστοίχων τύπων ΣΔτMODY.

5.2 Σύνοψη των Μεταλλάξεων στον Ελληνικό πληθυσμό

Ο Πίνακας 15 παρουσιάζει συνοπτικά τις μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στον ελληνικό πληθυσμό, τον τύπο της μετάλλαξης, την κατανομή τους στο γονίδιο *HNF1A*, καθώς και ορισμένα από τα χαρακτηριστικά των ασθενών.

Αλλαγή νουκλεοτιδίου	c.391 C>T	c.481 G>A	c.481 G>C	c.493 T>C	c.599 G>A	c.607 C>T	c.682-684 delGAG	c.685 C>T	c.788 G>A	c.824-826 delAAG	c.872 dupC	c.1177 delT	c.1201 C>T	c.1331-1332 delAG	c.1501 G>A
Αλλαγή aa	R131W	A161T	A161P*	W165R*	R200Q	R203C	E228del*	R229X	R263H	E275del*	G292fs	S393fs*	Q401X*	S445fs*	A501T
Τύπος μετάλλαξης	πν	πν	πν	πν	πν	πν	Ανάλωση	πν	πν	Ανάλωση	ΑΠΑ	ΑΠΑ	πν	ΑΠΑ	πν
Επιπηρεζόμενο τομέας	DNA-Δ	DNA-Δ	DNA-Δ	DNA-Δ	DNA-Δ	DNA-Δ	DNA-Δ	DNA-Δ	DNA-Δ	DNA-Δ	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ
Επιπηρεζόμενο ισομέρι	A, B, C	A, B, C	A, 3, C	A, B, C	A, B, C	A, B, C	A, B, C	A, B, C	A, B, C	A, B, C	A, B, C	A, 3, C	A, B, C	A, B	A, B
Ηλικία διάγνωσης (χρόνια)	18	14	14	8	0.3	17	16	8/13.5	24	20	18	23	13	3	20
Πυκνή νηστεία στη διάγνωση (mg/dl)	150	160	220	153	256	170	NR	300/254	100	147	200	125	209	189	164
Αριθμός ασθενών	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
Μέθοδος ανίχνευσης	Seq	DGGE	Seq	DGGE	DGGE	DGGE	DGGE	DGGE	Seq	Seq	Seq	Seq	DGGE	Seq	DGGE

Πίνακας 15. Σύνοψη των μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν στον ελληνικό πληθυσμό.

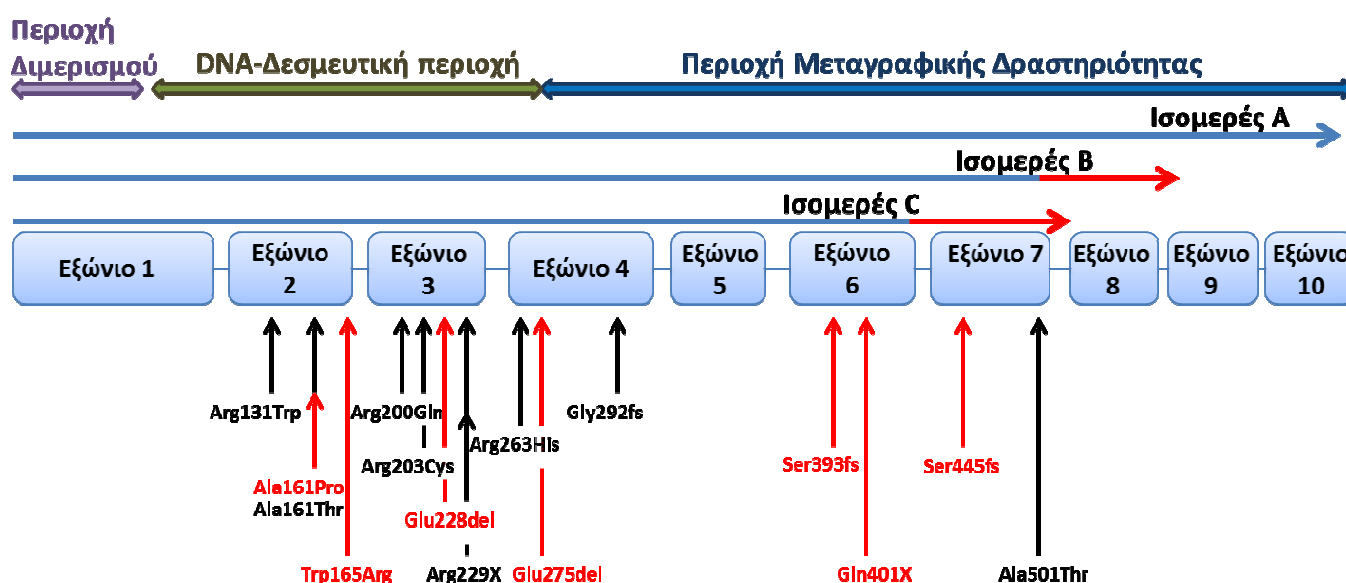
(πν: παρανοηματική, MN: μη νοηματική, ΑΠΑ: αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης, DNA-Δ: DNA-δεσμευτική περιοχή, ΜΔ: περιοχή μεταγραφικής δραστηριότητας)

5.3 Κατανομή των μεταλλάξεων στο γονίδιο *HNFI1A*

Από τις 15 μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν, οι 10 βρίσκονται στην DNA-δεσμευτική περιοχή του γονιδίου, ενώ οι υπόλοιπες 5 στην περιοχή της μεταγραφικής δραστηριότητας. Δεν ανιχνεύθηκε καμία μετάλλαξη στην περιοχή του εκκινητή ή στην περιοχή διμερισμού της πρωτεΐνης (Εικόνα 25).

Συγκεκριμένα οι περισσότερες μεταλλάξεις (11 από τις 15) ανιχνεύθηκαν στα εξώνια 2, 3 και 4. Δύο μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν σε κάθε ένα από τα εξώνια 6 και 7. Καμμία μετάλλαξη δεν ανιχνεύθηκε στα εξώνια 1, 5, 8, 9 και 10.

Ως προς τα ισομερή της πρωτεΐνης, εφόσον καμία μετάλλαξη δεν εντοπίστηκε στα εξώνια 8, 9 και 10, δεν υπήρξε περίπτωση όπου να επηρεάζεται αποκλειστικά το ισομερές A. Από τις 15 μεταλλάξεις, 2 ανιχνεύθηκαν στο εξώνιο 7 το οποίο μεταφράζεται στα ισομερή A και B, αφήνοντας ανεπηρέαστο το ισομερές C, ενώ οι υπόλοιπες μεταλλάξεις επηρεάζουν και τα τρία ισομερή A, B και C της πρωτεΐνης.



Εικόνα 25. Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου *HNFI1A*, των ισομερών του γονιδίου και των λειτουργικών περιοχών που κωδικοποιούν. Με βέλη παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στον ελληνικό πληθυσμό (Μαύρα βέλη: μεταλλάξεις που έχουν ήδη περιγραφεί στη βιβλιογραφία, Κόκκινα βέλη: καινούριες μεταλλάξεις).

5.4 Τύπος των μεταλλάξεων

Συνολικά ανιχνεύθηκαν 8 παρανοηματικές μεταλλάξεις (missense mutations, ποσοστό 50%), 2 μη νοηματικές μεταλλάξεις (nonsense mutations, ποσοστό 12,5%), 2 απαλείψεις ενός αμινοξέως (12,5%) και 3 απαλείψεις ή εισαγωγές που οδηγούν σε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης (18,75%). Δεν ανιχνεύθηκε καμία απάλειψη ή εισαγωγή πολλών εξωνίων με τη μέθοδο MLPA. (Πίνακας 16)

Η μετάλλαξη Gly292fs η οποία αντιπροσωπεύει το 30% των μεταλλάξεων του γονιδίου *HNF1A* σε διάφορους πληθυσμούς σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ανιχνεύθηκε σε ένα μόνο ασθενή από τον ελληνικό πληθυσμό (6%).

5.5 Μέθοδος ανίχνευσης

Από τις δεκαπέντε διαφορετικές μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στον ελληνικό πληθυσμό, οκτώ ανιχνεύθηκαν κατά τον αρχικό έλεγχο των δειγμάτων με τη μέθοδο DGGE. Οι υπόλοιπες επτά μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν κατά τον περαιτέρω έλεγχο των δειγμάτων με αλληλούχηση (sequencing) δύο κατευθύνσεων. Συνεπώς ένα μεγάλο ποσοστό μεταλλάξεων (47%) θα είχαν διαφύγει της διάγνωσης αν τα δείγματα δεν ελέγχονταν με αναλυτικότερη μέθοδο. Από τις επτά μεταλλάξεις που δεν ανιχνεύθηκαν με τη μέθοδο DGGE, οι τέσσερις ήταν απαλείψεις ή εισαγωγές μικρού αριθμού νουκλεοτιδίων (1-3), ενώ οι άλλες τρεις ήταν σημειακές μεταλλάξεις. Συνοπτικά οι μεταλλάξεις και ο τρόπος ανίχνευσής τους αναφέρονται στον Πίνακα 16.

Μετάλλαξη	Μέθοδος ανίχνευσης	Τύπος μετάλλαξης
R131W	Αλληλούχηση	Παρανοηματική
A161T	DGGE	Παρανοηματική
A161P	Αλληλούχηση	Παρανοηματική
W165R	DGGE	Παρανοηματική
R200Q	DGGE	Παρανοηματική
R203C	DGGE	Παρανοηματική
E228del	DGGE	Απάλειψη ενός αμινοξέος
R229X	DGGE	Μη νοηματική
R263H	Αλληλούχηση	Παρανοηματική
E275del	Αλληλούχηση	Απάλειψη ενός αμινοξέος
G292fs	Αλληλούχηση	Αλλαγή πλαισίου ανάγνωσης
S393fs	Αλληλούχηση	Αλλαγή πλαισίου ανάγνωσης
Q401X	DGGE	Μη νοηματική
S445fs	Αλληλούχηση	Αλλαγή πλαισίου ανάγνωσης
A501T	DGGE	Παρανοηματική

Πίνακας 16. Σύνοψη των μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν στον ελληνικό πληθυσμό, της μεθόδου ανίχνευσής τους και του τύπου της μετάλλαξης.

5.6 Καινούριες μεταλλάξεις

Από τις δεκαπέντε μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στον ελληνικό πληθυσμό, επτά δεν έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα ως γαμετικές μεταλλάξεις (germline), ενώ οι υπόλοιπες οκτώ έχουν προηγουμένως αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία. Οι επτά καινούριες μεταλλάξεις είναι: δύο παρανοηματικές μεταλλάξεις, μία μη νοηματική, δύο απαλείψεις τριών νουκλεοτιδίων που οδηγούν σε απάλειψη ενός αμινοξέος χωρίς αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης της πρωτεΐνης, και δύο μικρές απαλείψεις με αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης. Οι καινούριες μεταλλάξεις παρουσιάζονται με αστερίσκο στον Πίνακα 15.

5.6.1 Διερεύνηση των καινούριων μεταλλάξεων

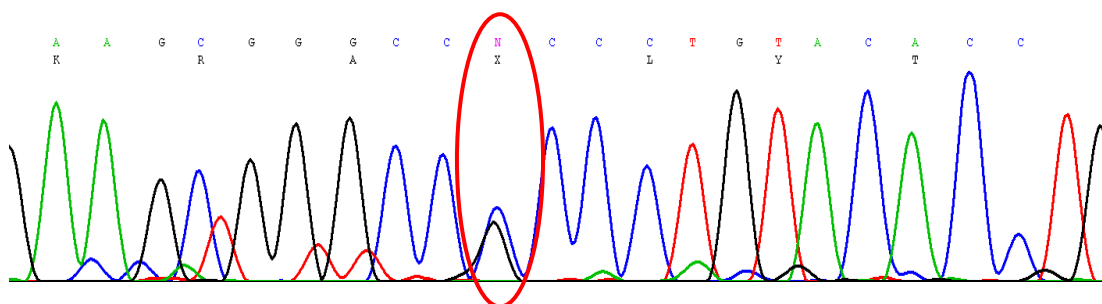
Οι μεταλλάξεις οι οποίες οδηγούν σε πρώιμο τερματισμό της πρωτεϊνικής αλυσίδας ή σε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης, λόγω της φύσεώς τους θεωρούνται παθογόνες. Αντιθέτως, οι καινούριες σημειακές αλλαγές που περιγράφηκαν μπορεί να αφορούν παθογόνες μεταλλάξεις ή μη παθογόνους πολυμορφισμούς.

Προκειμένου να αποκλειστεί το ενδεχόμενο πολυμορφισμού, έγινε αλληλούχηση των εξωνίων στα οποία ανιχνεύθηκαν νέες μεταλλάξεις σε άλλα δείγματα DNA. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες («guidelines») προσδιορισμού ενός πολυμορφισμού πρέπει να αναλυθούν συνολικά 286 χρωμοσώματα (148 δείγματα DNA).[131] Ο αριθμός αυτός υπερκαλύπτεται αφού συνολικά στο εργαστήριο έχουν αναλυθεί περισσότερα από 300 δείγματα ασθενών για το γονίδιο αυτό και οι μεταλλάξεις που αναφέρονται στην παρούσα μελέτη δεν έχουν ανιχνευθεί σε κανένα δείγμα.

Επιπλέον έγινε ανάλυση των μεταλλάξεων με δύο *in silico* προγράμματα (PolyPhen-2 και SIFT), μελετήθηκε η συντήρηση του αμινοξέως μεταξύ διαφορετικών ειδών, καθώς και οι διαφορετικές ιδιότητες των εμπλεκόμενων αμινοξέων. Τέλος η ανίχνευση της μετάλλαξης σε όλα τα μέλη της οικογένειας που παρουσιάζουν ΣΔ και η απουσία της από τα υγιή μέλη της οικογένειας αποτέλεσε επιπλέον υποστηρικτικό στοιχείο της παθογονικότητάς τους.

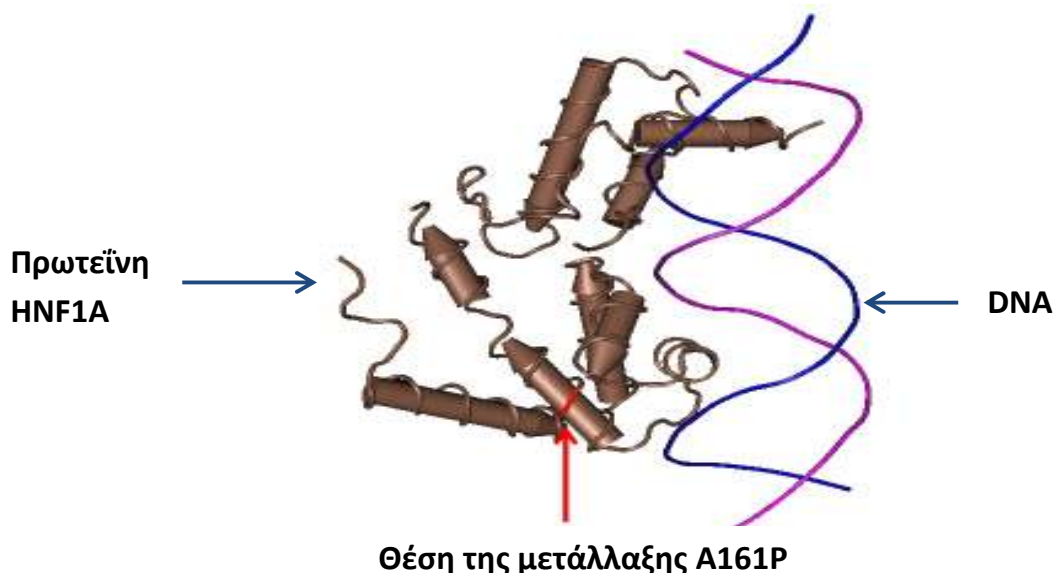
5.6.2 Περιγραφή των καινούριων μεταλλάξεων

5.6.2.1 c.481G>C, p.Ala161Pro



Εικόνα 26. Αποτέλεσμα αλληλούχησης του γονιδίου *HNF1A* της ασθενούς που φέρει τη μετάλλαξη c.481G>C, p.Ala161Pro (κόκκινος κύκλος)

Η μετάλλαξη c.481G>C, p.Ala161Pro (Εικόνα 26), οδηγεί στην αντικατάσταση του αμινοξέος Αλανίνη στη θέση 161 από το αμινοξύ Προλίνη. Το αμινοξύ 161 ανήκει στην DNA-δεσμευτική περιοχή της πρωτεΐνης, σε έλικα που σχηματίζεται από τα αμινοξέα 156-169, όπως φαίνεται στην Εικόνα 27.



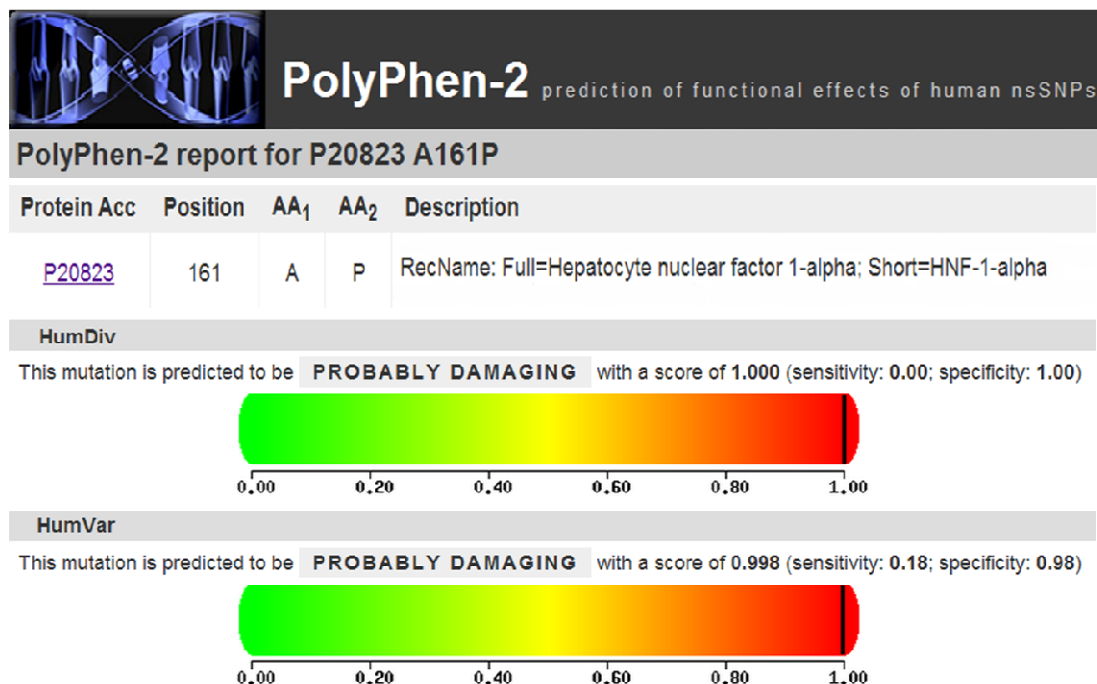
Εικόνα 27. Σχηματική παράσταση της DNA-δεσμευτικής περιοχής της πρωτεΐνης HNF1A, και της θέσης της μετάλλαξης A161P (κόκκινο βέλος)

5.6.2.1.1 Διερεύνηση της παθογονικότητας της μετάλλαξης

Αν και στην θέση 161 έχει περιγραφεί η αλλαγή του αμινοξέος Αλανίνη σε Θρεονίνη, τόσο στη διεθνή βιβλιογραφία όσο και σε ασθενή της δικής μας ομάδας, η αντικατάσταση σε Προλίνη δεν έχει περιγραφεί. Για το λόγο αυτό κρίθηκε απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση της μετάλλαξης προκειμένου να προσδιορισθεί αν η αλλαγή είναι παθογόνος.

Η αντικατάσταση αυτή δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα υπόλοιπα δείγματα DNA που μελετήθηκαν. Παράλληλα η συγκεκριμένη αντικατάσταση αναλύθηκε με τα δύο *in silico* προγράμματα.

- **Πρόγραμμα PolyPhen-2:** Το πρόγραμμα προέβλεψε ότι η μετάλλαξη είναι **“Probably Damaging”**-«Πιθανώς Παθογόνος» με HumVar score: 0.997 (Εικόνα 28) . Στόχος για επιτυχή πρόβλεψη είναι HumVar score πλησιέστερα στο 1.



Εικόνα 28. Αποτέλεσμα του προγράμματος PolyPhen-2 για τη μετάλλαξη A161P

- **Πρόγραμμα SIFT:** Το πρόγραμμα προέβλεψε ότι η μετάλλαξη είναι «Παθογόνος» (“**Damaging**”) με SIFT Score: 0.01 και Median Information Content: 2.83 (Εικόνα 29). Στόχος για επιτυχή πρόβλεψη παθογόνου μετάλλαξης είναι score <0,05 και Median Information Content <3,25.



Εικόνα 29. Αποτέλεσμα του προγράμματος SIFT για τη μετάλλαξη A161P

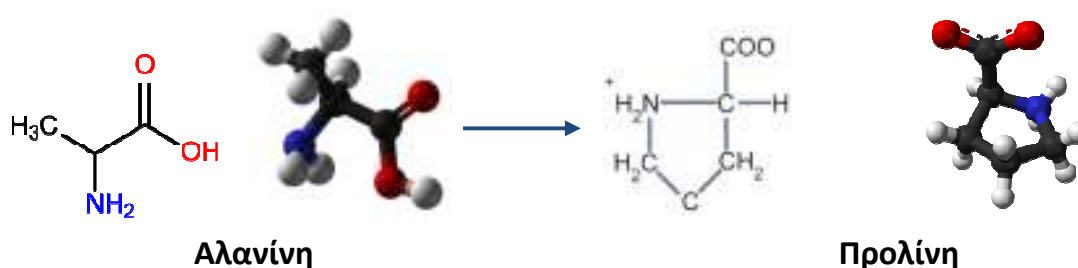
Παράλληλα πραγματοποιήθηκε και ανεξάρτητη μελέτη της συντήρησης του αμινοξέος μεταξύ διαφορετικών ειδών. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 30, στην θέση 161 της πρωτεΐνης ανευρίσκεται αλανίνη όχι μόνο στον άνθρωπο, αλλά και στον

χιμπατζή, τον σκύλο, τα βοοειδή, το ποντίκι, τον αρουραίο, την όρνιθα και το ψάρι zebrafish.

Homo sapiens	131	REVVDTTGLNQSHLSQHLNKGTPMKTQKRAALYTWYVRKQREVAQQFTHA	180
Pan troglodytes	131	REVVDTTGLNQSHLSQHLNKGTPMKTQKRAALYTWYVRKQREVAQQFTHA	180
Canis lupus familiaris	131	REVVDTTGLNQSHLSQHLNKGTPMKTQKRAALYTWYVRKQREVAQQFTHA	180
Bos taurus	133	REVVDTTGLNQSHLSQHLNKGTPMKTQKRAALYTWYVRKQREVAQQFTHA	182
Mus musculus	131	REVVDTTGLNQSHLSQHLNKGTPMKTQKRAALYTWYVRKQREVAQQFTHA	180
Rattus norvegicus	131	REVVDTTGLNQSHLSQHLNKGTPMKTQKRAALYTWYVRKQREVAQQFTHA	180
Gallus gallus	134	REVVDTTGLNQSHLSQHLNKGTPMKTQKRAALYTWYVRKQREVAQQFTHA	183
Danio rerio	120	REVVESTGLNQSHLSQHLNKGTPMKNQKRAALYSWYTKKQAEISQQFTNA	169

Εικόνα 30. Αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης HNF1A διαφόρων ειδών και απεικόνιση της συντήρησης του αμινοξέως Αλανίνη(A)161 (κίτρινο κουτί).

Παράλληλα το αμινοξύ προλίνη έχει ιδιαίτερη δομή που το κατατάσσει σε δευτεροταγή αμίνη. Παρά το ότι είναι μη πολωμένο, ουδέτερο αμινοξύ, όπως και το αμινοξύ αλανίνη, διαθέτει εντούτοις μία ιδιαίτερη κυκλική διάταξη, η οποία διαφέρει σημαντικά από αυτή της αλανίνης (Εικόνα 31). Η αλλαγή αυτή της δομής του αμινοξέος συνυπολογίζεται και στα προαναφερθέντα προγράμματα και οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η τελική πρωτεΐνη διαφέρει σημαντικά από την πρότυπη.



Εικόνα 31. Στεreoχημική δομή των αμινοξέων αλανίνη και προλίνη.

5.6.2.1.2 Χαρακτηριστικά της ασθενούς που φέρει τη μετάλλαξη c.481G>C, p.Ala161Pro

Η μετάλλαξη ανιχνεύθηκε σε μία ασθενή με διάγνωση ΣΔ από την ηλικία των 14 ετών καθώς και στην μητέρα της η οποία παρουσίαζε ήπια υπεργλυκαιμία και δεν έχριζε θεραπείας. Η ασθενής παρουσιάστηκε με υπεργλυκαιμία νηστείας (Γλυκόζη νηστείας: 220mg/dl), ενώ στην καμπύλη γλυκόζης είχε πολύ χαμηλές τιμές ινσουλίνης, χαρακτηριστικό του ΣΔτMODY3 (Πίνακας 17). Η ασθενής είχε τεθεί υπό θεραπεία με σουλφονουρίες (Daonil®: γλιβενκλαμίδα) με καλό γλυκαιμικό έλεγχο, παρά τον αρχικά αρνητικό έλεγχο του γονιδίου με τη μέθοδο DGGE. Η μετάλλαξη τελικά ανιχνεύθηκε με τη μέθοδο της αλληλούχησης και επιβεβαίωσε την αρχική κλινική υποψία για ΣΔτMODY3.

Χρόνος (λεπτά)	0	30'	60'	120'
Γλυκόζη (mg/dl)	90	191	234	187
Ινσουλίνη (ng/dl)	4	11	16	6

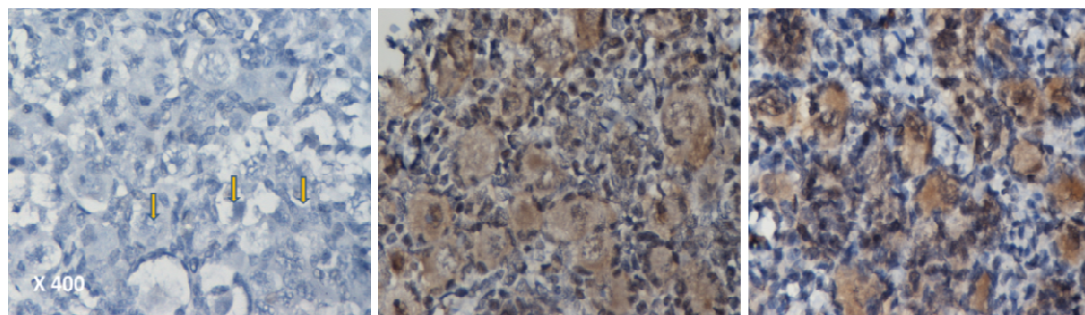
Πίνακας 17. Καμπύλη γλυκόζης της ασθενούς που φέρει τη μετάλλαξη A161P.

Η ίδια ασθενής παρουσίασε επίσης καθυστέρηση της ήβης σε ηλικία 14 ετών. Ο έλεγχος των ορμονών της ήβης (θυλακιοτρόπου-FSH και ωχρινοτρόπου-LH ορμόνης) ήταν συμβατός με πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια (FSH=121mIU/ml και LH=24mIU/ml). Ο καρύοτυπος της ασθενούς ήταν φυσιολογικός, 46XX, ενώ ο υπέρηχος των ωοθηκών ανέδειξε ωοθήκες πολύ μικρού μεγέθους για την ηλικία της ασθενούς.

Εφόσον η ασθενής δεν παρουσίαζε κάποια συνηθισμένη αιτία πρόωρης ωοθηκικής ανεπάρκειας με βάση τον αρχικό εργαστηριακό έλεγχο, υποθέσαμε ότι οι δύο παθήσεις δεν είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους και ότι η μετάλλαξη του γονιδίου *HNF1A* μπορεί να αποτελεί την αιτία της ωοθηκικής ανεπάρκειας.

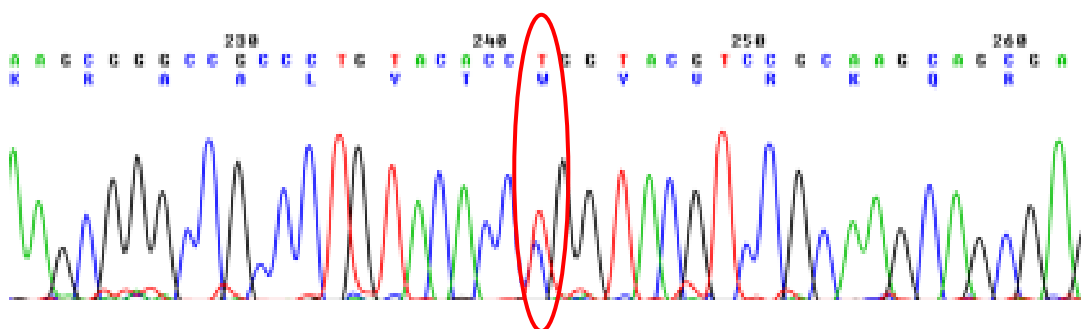
Για τη διερεύνηση της υπόθεσης αυτής, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική ανάλυση σε ιστούς φυσιολογικών ωοθηκών εμβρύων, με σκοπό να μελετηθεί αν η πρωτεΐνη εκφράζεται σε διάφορα στάδια ανάπτυξης των εμβρυϊκών ωοθηκών. Η ανάλυση απέδειξε ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται με αυξανόμενη ένταση σε φυσιολογικές ωοθήκες κατά την 23^η, 32^η και 40^η εβδομάδα κύησης (Εικόνα 32). Επομένως η

μετάλλαξη του γονιδίου *HNF1A* θα μπορούσε να αποτελεί την αιτία της ωοθηκικής ανεπάρκειας. Για την περαιτέρω διερεύνηση της υπόθεσης πρέπει να πραγματοποιηθούν μελέτες ενηλίκων ωοθηκών και ωοθηκικών ιστών με στοχευμένες μεταλλάξεις του γονιδίου.



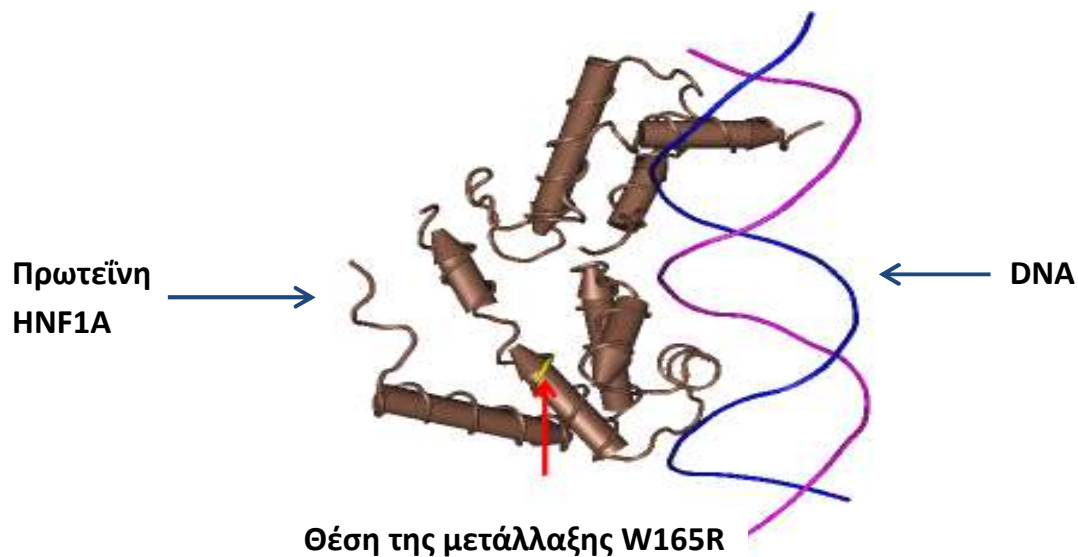
Εικόνα 32. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημείας για την ανίχνευση της πρωτεΐνης HNF1A σε ιστούς εμβρυικών ωοθηκών κατά την 23^η (Α), 32^η(Β) και 40^η(Γ) εβδομάδα κύησης.

5.6.2.2 c.493T>C, p.Trp165Arg



Εικόνα 33. Αποτέλεσμα αλληλούχησης του γονιδίου *HNF1A* της ασθενούς που φέρει τη μετάλλαξη c.493T>C, p.Trp165Arg (κόκκινος κύκλος)

Η μετάλλαξη c.493T>C, p.Trp165Arg (Εικόνα 33) οδηγεί στην αντικατάσταση του αμινοξέος Τρυπτοφάνη στη θέση 165 της πρωτεΐνης από το αμινοξύ Αργινίνη. Το αμινοξύ 165 βρίσκεται σε έλικα της πρωτεΐνης πλησίον της DNA-δεσμευτικής περιοχής (Εικόνα 34).



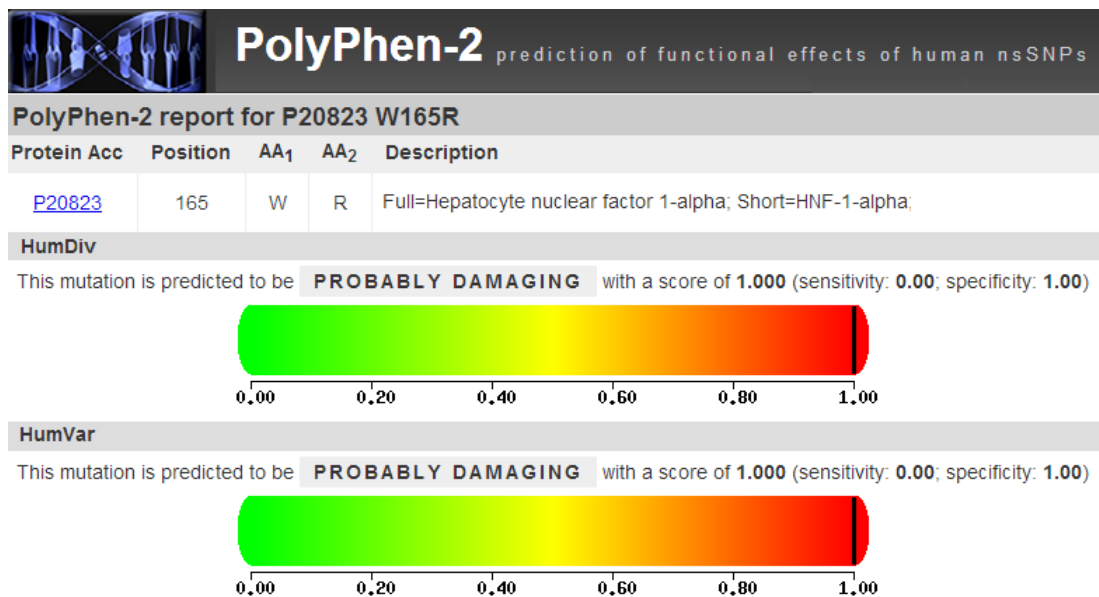
Εικόνα 34. Σχηματική παράσταση της DNA-δεσμευτικής περιοχής της πρωτεΐνης HNF1A, και της θέσης της μετάλλαξης W165R (κόκκινο βέλος).

5.6.2.2.1 Διερεύνηση της παθογονικότητας της μετάλλαξης

Η μετάλλαξη W165R έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία ως σωματική μετάλλαξη σε δείγμα ιστού ηπατικού αδενώματος. Δεν έχει όμως ανιχνευθεί ως γαμετική μετάλλαξη σε περιφερικό αίμα ασθενούς με σακχαρώδη διαβήτη και η συσχέτιση της μετάλλαξης με ΣΔτMODY3 δεν είναι διαπιστωμένη.

Για τη διερεύνηση της παθογονικότητας της μετάλλαξης πραγματοποιήθηκε ο ίδιος έλεγχος που αναφέρεται παραπάνω. Η αντικατάσταση του νουκεοτιδίου c.493T>C μελετήθηκε σε άλλα δείγματα περιφερικού αίματος και δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από αυτά. Παράλληλα η συγκεκριμένη αντικατάσταση μελετήθηκε *in silico*.

- **Πρόγραμμα PolyPhen-2:** Το πρόγραμμα προέβλεψε ότι η μετάλλαξη είναι **“Probably damaging”**-«Πιθανώς Παθογόνος» με HumVar score: 1.0 (Εικόνα 35).



Εικόνα 35. Αποτέλεσμα του προγράμματος PolyPhen-2 για τη μετάλλαξη W165R

- **Πρόγραμμα SIFT:** Το πρόγραμμα προέβλεψε ότι η μετάλλαξη είναι «Παθογόνος» (“**Damaging**”) με SIFT Score: 0 και Median Information Content: 2.83 (Εικόνα 36).



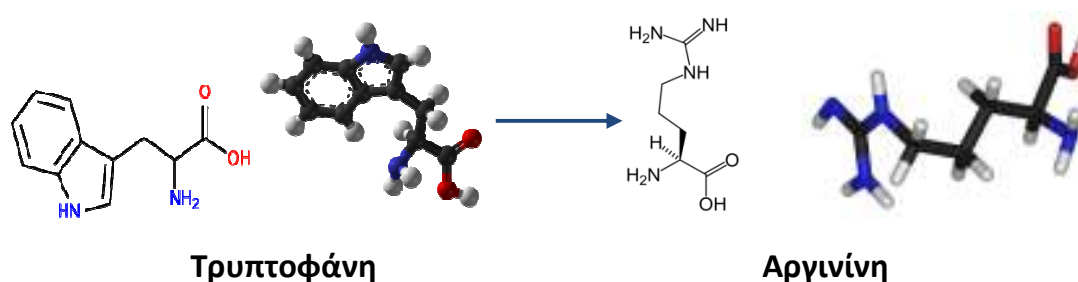
Εικόνα 36. Αποτέλεσμα του προγράμματος SIFT για τη μετάλλαξη W165R

Η μελέτη της συντήρησης του αμινοξέος 165 μεταξύ διαφόρων ειδών αποδεικνύει επίσης ότι το αμινοξύ Τρυπτοφάνη 165 είναι συντηρημένο μεταξύ διαφορετικών ειδών όπως φαίνεται και στην Εικόνα 37.

Homo sapiens	131	REVVDTTGLNQSHLSQHLNKGTPMKTQKRAALYTW	VVRKQREVAQQFTHA	180
Pan troglodytes	131	REVVDTTGLNQSHLSQHLNKGTPMKTQKRAALYTW	VVRKQREVAQQFTHA	180
Canis lupus familiaris	131	REVVDTTGLNQSHLSQHLNKGTPMKTQKRAALYTW	VVRKQREVAQQFTHA	180
Bos taurus	133	REVVDTTGLNQSHLSQHLNKGTPMKTQKRAALYTW	VVRKQREVAQQFTHA	182
Mus musculus	131	REVVDTTGLNQSHLSQHLNKGTPMKTQKRAALYTW	VVRKQREVAQQFTHA	180
Rattus norvegicus	131	REVVDTTGLNQSHLSQHLNKGTPMKTQKRAALYTW	VVRKQREVAQQFTHA	180
Gallus gallus	134	REVVDTTGLNQSHLSQHLNKGTPMKTQKRAALYTW	VVRKQREVAQQFTHA	183
Danio rerio	120	REVVESTGLNQSHLSQHLNKGTPMKNQKRAALYSW	VTKKQAEISQQFTNA	169

Εικόνα 37. Αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης HNF1A διαφόρων ειδών και απεικόνιση της συντήρησης του αμινοξέος Τρυπτοφάνη(W)165 (κίτρινο κουτί).

Επιπλέον το αμινοξύ τρυπτοφάνη ανήκει στα μη φορτισμένα, ουδέτερα, υδρόφοβα αμινοξέα σε αντίθεση με το αμινοξύ αργινίνη, το οποίο είναι θετικά φορτισμένο (Εικόνα 38). Η αλλαγή ενός μη φορτισμένου αμινοξέος από ένα θετικά φορτισμένο πιθανόν οδηγεί σε σημαντική αλλαγή της στερεοδιάταξης της πρωτεΐνης, γεγονός που συνυπολογίζεται στα προαναφερθέντα *in silico* προγράμματα.



Εικόνα 38. Στερεοχημική δομή των αμινοξέων τρυπτοφάνη και αργινίνη.

5.6.2.2.2 Χαρακτηριστικά της ασθενούς που φέρει τη μετάλλαξη c.493T>C, p.Trp165Arg

Η μετάλλαξη ανιχνεύθηκε σε μία ασθενή με διάγνωση ΣΔ τύπου 1 από την ηλικία των 8 ετών. Η ασθενής παρουσίαζε υπεργλυκαιμία νηστείας (Γλυκόζη νηστείας: 153mg/dl) και καμπύλη σακχάρου συμβατή με ΣΔ και ινσουλινοπενία, χαρακτηριστικό του ΣΔτMODY3 (Πίνακας 18). Η μητέρα της ασθενούς είχε επίσης σακχαρώδη διαβήτη, αλλά δυστυχώς δεν υπήρχε η δυνατότητα μοριακής ανάλυσης του αίματός της καθώς διέμενε στο εξωτερικό.

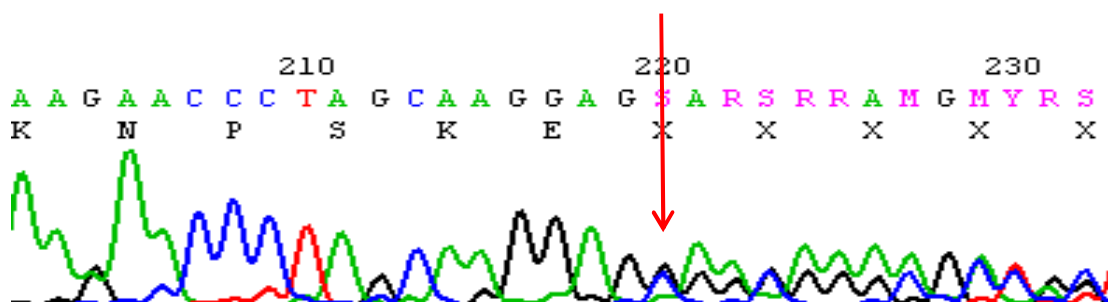
Χρόνος (λεπτά)	0	30'	60'	90'	120'
Γλυκόζη (mg/dl)	180	288	344	374	368
Ινσουλίνη (ng/dl)	7,5	26	26,7	17,8	9,6

Πίνακας 18. Καμπύλη γλυκόζης της ασθενούς που φέρει τη μετάλλαξη W165R.

Πριν τα αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσης, η ασθενής ήταν υπό θεραπεία με ινσουλίνη, χωρίς καλό έλεγχο των επιπέδων του σακχάρου αίματος. Μετά τη διάγνωση ΣΔτMODY3, η ασθενής ξεκίνησε θεραπεία με σουλφονυρίες και παρουσίασε καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο (Γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη-HbA1c: 6%).

Η ίδια ασθενής ήταν η μοναδική υπέρβαρη ασθενής της ομάδας μας, με BMI (Body Mass Index): 24.3, που αντιστοιχεί σε > 85^η εκατοστιαία θέση για την ηλικία της ασθενούς.

5.6.2.3 c.682-684delGAG, Glu228del



Εικόνα 39. Αποτέλεσμα αλληλούχησης του γονιδίου *HNF1A* της ασθενούς που φέρει τη μετάλλαξη c.682-684delGAG, Glu228del (κόκκινο βέλος).

Η μετάλλαξη c.682-684delGAG, Glu228del (Εικόνα 39) οδηγεί στην απάλειψη ενός αμινοξέος από την πολυπεπδική αλυσίδα, του αμινοξέος γλουταμικό οξύ από τη θέση 228. Το αμινοξύ 228 βρίσκεται μέσα στη DNA-δεσμευτική περιοχή και σχηματίζει στροφή στην τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης (αμινοξέα 226-229).

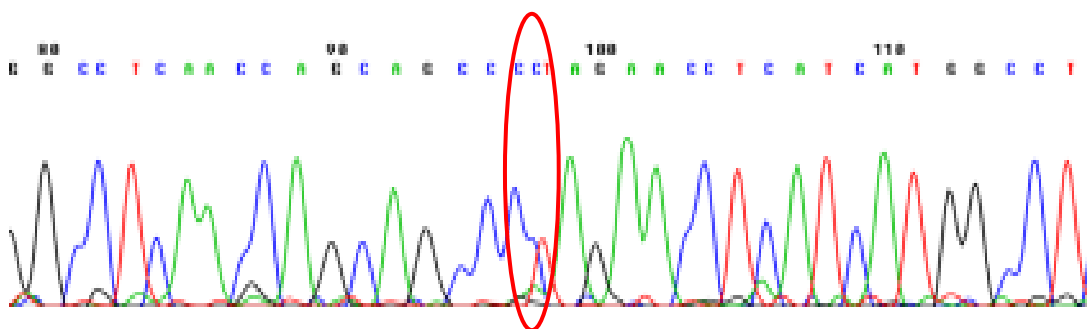
5.6.2.3.1 Χαρακτηριστικά της ασθενούς που φέρει τη μετάλλαξη c.682-684delGAG, Glu228del

Η μετάλλαξη ανιχνεύθηκε σε μία ασθενή με διάγνωση ΣΔ από την ηλικία των 16 ετών και τη μητέρα της που επίσης είχε ΣΔ από την ηλικία των 13 ετών. Η ασθενής παραπέμφθηκε στο εργαστήριό μας μετά από την ανίχνευση πολλαπλών ηπατικών αδενωμάτων σε υπέρηχο κοιλίας, που πραγματοποιήθηκε μετά από τυχαίο τραυματισμό. Η συνύπαρξη του ΣΔ με ηπατικά αδενώματα οδήγησε στην κλινική υποψία για ΣΔτMODY3.

Μετά από τον εντοπισμό της μετάλλαξης στο δείγμα περιφερικού αίματος της ασθενούς, ο έλεγχος επαναλήφθηκε και στο δείγμα DNA από τον ιστό ήπατος. Δεν ανιχνεύθηκε επιπλέον σημειακή αλλαγή με τη μέθοδο της αλληλούχησης ούτε μεγαλύτερη απάλειψη ή εισαγωγή με τη μέθοδο MLPA.

Η ασθενής λάμβανε θεραπεία με μετφορμίνη. Δυστυχώς δεν επέστρεψε για τον επανέλεγχο και τελικά δεν ήταν δυνατόν να παρακολουθήσουμε την περαιτέρω πορεία της νόσου της.

5.6.2.4 c.1201 C>T, Gln401X



Εικόνα 40. Αποτέλεσμα αλληλούχησης του γονιδίου *HNF1A* της ασθενούς που φέρει τη μετάλλαξη c.1201 C>T, Gln401X (κόκκινος κύκλος)

Η μετάλλαξη c.1201 C>T, Gln401X (Εικόνα 40), οδηγεί στον πρόωρο τερματισμό της πολυπεπτιδικής αλυσίδας στο αμινοξύ 401. Η μετάλλαξη επομένως οδηγεί στην απάλειψη 230 αμινοξέων από το καρβόξυ-τελικό άκρο της αλυσίδας που βρίσκονται στην περιοχή της μεταγραφικής δραστηριότητας.

5.6.2.4.1 Χαρακτηριστικά της ασθενούς που φέρει τη μετάλλαξη c.1201 C>T, Gln401X

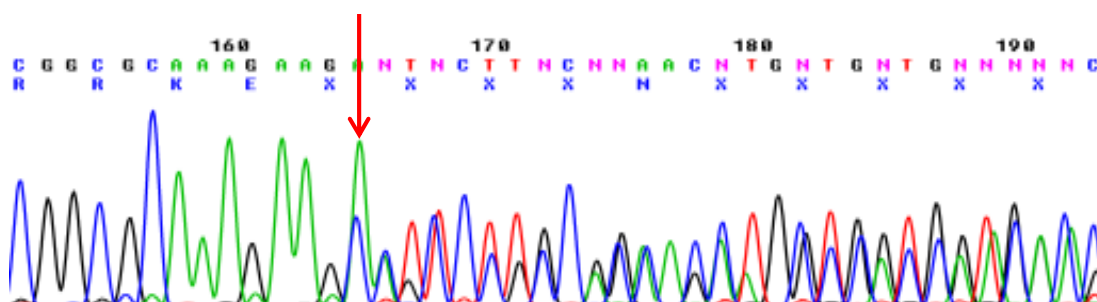
Η ασθενής παρουσίασε ΣΔ από την ηλικία των 11,5 ετών με γλυκόζη νηστείας 209mg/dl και ιδιαίτερα χαμηλές τιμές ινσουλίνης στην καμπύλη γλυκόζης (Πίνακας 19).

Χρόνος (λεπτά)	0	30'	60'	120'
Γλυκόζη (mg/dl)	133	215	295	322
Ινσουλίνη (ng/dl)	4	6	10	7

Πίνακας 19. Καμπύλη γλυκόζης της ασθενούς που φέρει τη μετάλλαξη c.1201 C>T, Gln401X.

Η ασθενής ελάμβανε αρχικά θεραπεία με μετφορμίνη. Μετά τη διάγνωση ΣΔτMODY3 συστήθηκε η χρήση υπογλυκαιμικού χαπιού της κατηγορίας των σουλφονουριών και ενδεχομένως και ινσουλίνης.

5.6.2.5 c.824-826delAAG, Glu275del



Εικόνα 41. Αποτέλεσμα αλληλούχησης του γονιδίου *HNF1A* της ασθενούς που φέρει τη μετάλλαξη c.824-826delAAG, Glu275del (κόκκινο βέλος)

Η μετάλλαξη c.824-826delAAG, Glu275del (Εικόνα 41) οδηγεί στην απάλειψη ενός αμινοξέος (Γλουταμικό οξύ, Glu) από τη θέση 275 της πρωτεΐνης. Το αμινοξύ 275 βρίσκεται στην DNA-δεσμευτική περιοχή.

5.6.2.5.1 Χαρακτηριστικά της ασθενούς που φέρει τη μετάλλαξη c.824-826delAAG, Glu275del

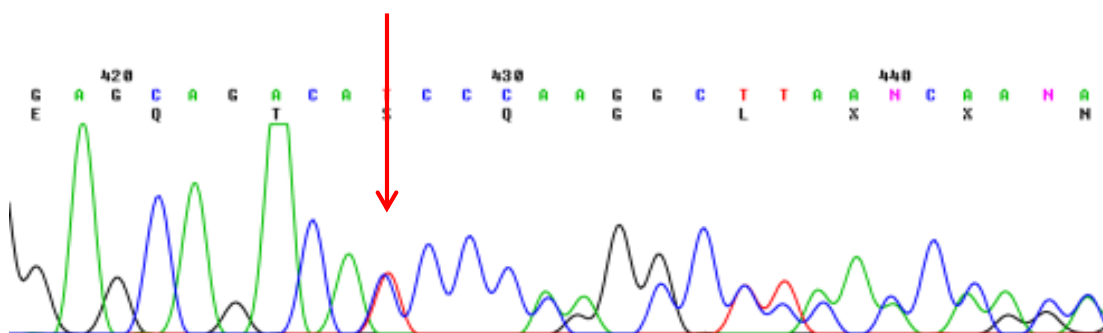
Η μετάλλαξη ανιχνεύθηκε σε μία ασθενή με ΣΔ που παραπέμφθηκε στο εργαστήριό μας όταν η κόρη της επίσης διεγνώσθη με υπεργλυκαιμία νηστείας. Ο αδερφός της ασθενούς είχε παραπεμθεί επίσης για διερεύνηση ΣΔτMODY παλαιότερα αλλά ο έλεγχος του δείγματος DNA με τη μέθοδο DGGE ήταν αρνητικός. Όταν η ασθενής παραπέμφθηκε, πραγματοποιήθηκε έλεγχος του δείγματος με αλληλούχηση του γονιδίου η οποία ανέδειξε την μετάλλαξη. Η ίδια μετάλλαξη ανιχνεύθηκε στην μητέρα, τον αδερφό και την κόρη της ασθενούς.

Χαρακτηριστικά η κόρη της ασθενούς, 10 ετών, παρουσίαζε γλυκόζη νηστείας στα ανώτερα φυσιολογικά επίπεδα-ήπια υπεργλυκαιμία νηστείας (108mg/dl), ενώ η καμπύλη γλυκόζης είναι συμβατή με διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη (Πίνακας 20). Πιθανώς η ασθενής βρίσκεται στα πρώτα στάδια ΣΔ όπου η έκκριση της ινσουλίνης είναι ακόμα αρκετή ώστε να μην εκδηλωθεί έντονη υπεργλυκαιμία.

Χρόνος (λεπτά)	0	30'	60'	90'	120'
Γλυκόζη (mg/dl)	85	138	187	193	188
Ινσουλίνη (ng/dl)	16,14	75	83	80	84,04

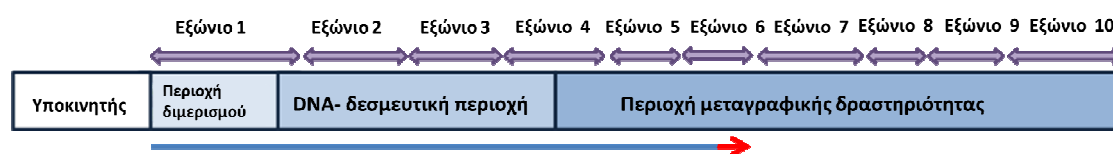
Πίνακας 20. Καμπύλη γλυκόζης της ασθενούς που φέρει τη μετάλλαξη Glu275del

5.6.2.6 c.1177delT, Ser393fs



Εικόνα 42. Αποτέλεσμα αλληλούχησης του γονιδίου *HNF1A* της ασθενούς που φέρει τη μετάλλαξη c.1177delT, Ser393fs (κόκκινο βέλος)

Η μετάλλαξη οδηγεί στην απάλειψη ενός αμινοξέος με αποτέλεσμα την αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης. Με τη μετάλλαξη αυτή προστίθενται 19 αμινοξέα στη θέση 393, δημιουργείται πρώιμο κωδικόνιο λήξης στη θέση 412, και συνεπώς παράγεται μία πρωτεΐνη 219 αμινοξέα μικρότερη της πρότυπης. Με τον τρόπο αυτό απουσιάζει μεγάλο μέρος της περιοχής της μεταγραφικής δραστηριότητας της πρωτεΐνης (Εικόνες 43 και 44).



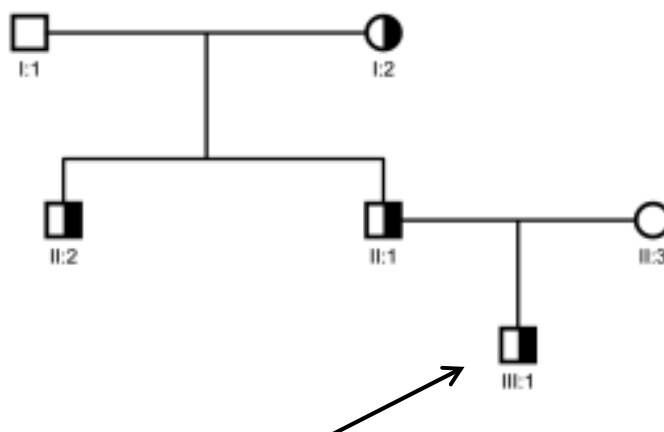
Εικόνα 43. Γραφική παράσταση της νέας πρωτεΐνης που παράγεται με βέλος. Το κόκκινο τμήμα αποτελεί το μέρος της πρωτεΐνης που διαφέρει από την πρότυπη.

...VSAAGGPLPPVSTLTALHSLEQTSPGLNQRPQNLIMASLPGVMTIGPGEPASLGPTFTNTGA...631
 ...VSAAGGPLPPVSTLTALHSLEQT**PQASTSSPRTSSWPHFLGS**Stop

Εικόνα 44. Η αλληλουχία των αμινοξέων της πρότυπης πρωτεΐνης (πάνω σειρά) και της πρωτεΐνης που παράγεται από την μετάλλαξη (κάτω σειρά). Με κόκκινο τα 19 αμινοξέα που προστίθενται.

5.6.2.6.1 Χαρακτηριστικά του ασθενή που φέρει τη μετάλλαξη c.1177delT, Ser393fs

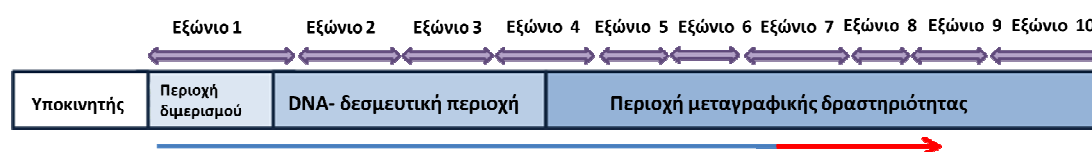
Η μετάλλαξη ανιχνεύθηκε σε έναν 23χρονο ασθενή με ΣΔ και οικογενειακό ιστορικό ΣΔ στον πατέρα και την πατρική γιαγιά του (Εικόνα 45). Ο ασθενής είχε χαρακτηριστικά πολύ χαμηλά επίπεδα ινσουλίνης στις 2 ώρες στην καμπύλη ανοχής της γλυκόζης. (Ινσουλίνη: 6ng/dl, Γλυκόζη: 207mg/dl).



Εικόνα 45. Οικογενειακό δέντρο του ασθενή με τη μετάλλαξη c.1177delT, Ser393fs (βέλος).

5.6.2.7 c.1331-1332delAG, Ser445fs

Η μετάλλαξη οδηγεί σε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης της πρωτεϊνικής αλυσίδας. Το αποτέλεσμα είναι να προστίθενται 102 νέα αμινοξέα μετά το αμινοξύ 444 και να δημιουργείται μία πρωτεΐνη με 546 αα, σε αντίθεση με την πρότυπη πρωτεΐνη των 631 αμινοξέων (Εικόνες 46 και 47). Με τον τρόπο αυτό αλλοιώνεται μεγάλο μέρος της περιοχής μεταγραφικής δραστηριότητας της πρωτεΐνης.



Εικόνα 46. Γραφική παράσταση της νέας πρωτεΐνης που παράγεται με βέλος. Το κόκκινο τμήμα αποτελεί το μέρος της πρωτεΐνης που διαφέρει από τη πρότυπη.

...LASTQAQSV PV I N SMG55L TT LQPVQFSQPLHPSYQQPLMPPVQSHVTQSPFMATMAQLQSPHALYS
...LASTQAQCAGHQHGGQPDHPAARPVLPAAAPLLPAAAHATCAE PC DPEPLHG HHGS AAEP RPLQP
H KPE VAQYTHTG LL PQTMLI T DTT N LSALA SL T PT KQVFTSDTEASSSEGLHTPASQATT LHVPSQD
QARGGPVHPHGPAADYA HHRHHQPERPGQPHAHQAGLHLRH Stop
PASIQHLQPAHRLSASPTVSSSSLVLYQSSDSSNGQSHLLPSNHNVIETFISTQMASSSQ Stop

Εικόνα 47. Η αλληλουχία των αμινοξέων της πρότυπης πρωτεΐνης (πάνω σειρά) και της πρωτεΐνης που παράγεται από την μετάλλαξη (κάτω σειρά). Με κόκκινο τα 102 αμινοξέα που προστίθενται.

5.6.2.7.1 Χαρακτηριστικά των ασθενών που φέρουν τη μετάλλαξη c.1331-1332delAG, Ser445fs

Η μετάλλαξη ανιχνεύθηκε σε μέλη τριών γενεών μίας οικογένειας (γιαγιά, μητέρα και κόρη). Η κόρη της ασθενούς ανιχνεύθηκε στην ηλικία των τριών ετών όταν παρουσίασε υπεργλυκαιμία νηστείας (μέχρι 189mg/dl) και διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη. (Πίνακας 21)

Χρόνος (λεπτά)	0	30'	60'	90'	120'
Γλυκόζη (mg/dl)	81	130	144	169	144
Ινσουλίνη (ng/dl)	3	13	17	27	18,6

Πίνακας 21. Καμπύλη γλυκόζης της ασθενούς που φέρει τη μετάλλαξη c.1331-1332delAG, Ser445fs

5.7 Σύνοψη των χαρακτηριστικών των ασθενών με ΣΔτMODY3 στον Ελληνικό πληθυσμό

Τα κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών που διεγνώσθησαν με ΣΔτMODY3 στον ελληνικό πληθυσμό συνοψίζονται στον Πίνακα 22.

Χαρακτηριστικό	Μέση τιμή ± ΣΑ	Διάμεση Τιμή	Εύρος
Ηλικία κατά τη διάγνωση σε έτη (n=16)	14.4 ± 6.7	15	0.3-24
Γλυκόζη νηστείας σε mg/dL (n=15)	177.5 ± 53.1	164	100-300
Γλυκόζη στις 2 ώρες σε OGTT σε mg/dL (n=9)	226.4 ± 77.9	192	144-368
Ινσουλίνη νηστείας σε ng/mL (n=6)	6.4 ± 3.4	5.75	3-12
Ινσουλίνη στις 2 ώρες σε OGTT σε ng/mL (n=6)	24.6 ± 31.3	14.1	6-87.4
HbA1c κατά τη διάγνωση σε % (n=7)	6.6 ± 1.9	6.7	4.1-9.1
Θεραπεία (n=13)	Ινσουλίνη: 2 Ινσουλίνη και αντιδιαβητικό χάπι: 1 Αντιδιαβητικό χάπι: 6 Καμία ή δίαιτα: 4		
Γένος	Άρρεν: 7 (44%) Θήλυ: 9 (56%)		
Γονέας με ΣΔ	Πατέρας: 5 (31%) Μητέρα: 10 (63%) De novo: 1 (6%)		
Βάρος γέννησης σε gr (n=12)	3555.8 ± 854.9	3525	1870-4900

Πίνακας 22. Σύνοψη των κλινικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών των ασθενών με ΣΔτMODY3 στον ελληνικό πληθυσμό. (ΣΑ: Σταθερή Απόκλιση)

Η μέση ηλικία διάγνωσης των ασθενών με ΣΔτMODY3 ήταν 14,4 έτη (εύρος: 4 μήνες έως 24 έτη). Κανένας από τους ασθενείς που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη λόγω του οικογενειακού ιστορικού αλλά με ηλικία διάγνωσης πάνω από 25 έτη, δεν διεγνώσθη με ΣΔ.

Ο νεαρότερος ασθενής που διεγνώσθη στη μελέτη μας ήταν 4 μηνών όταν εκδήλωσε υπεργλυκαιμία κατά τη διάρκεια λοίμωξης του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος. Τα επίπεδα γλυκόζης αίματος παρέμειναν σε επίπεδα που δεν

απαιτούσαν θεραπεία (κάτω από 150mg/dl) κατά τους επόμενους τακτικούς επανελέγχους μέχρι την ηλικία των 4 ετών οπότε παρατηρήθηκε πάλι άνοδος των επιπέδων γλυκόζης (μέχρι 180 mg/dL).

Η μέση τιμή γλυκόζης νηστείας κατά τη διάγνωση ήταν 177,5 mg/dL ($\pm$ 53,1), ενώ η μέση τιμή γλυκόζης 2 ώρες μετά την έναρξη καμπύλης γλυκόζης ήταν 226,4 mg/dL (12,4 mmol/L) ($\pm$ 77,9). Η μέση τιμή ινσουλίνης στις 2 ώρες ήταν 24,6 mIU/L ($\pm$ 31,3).

Η μέση τιμή της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c) κατά τη διάγνωση ήταν 6,6% ($\pm$ 1,9).

Το οικογενειακό ιστορικό των ασθενών ήταν θετικό για τρεις γενεές σε εννέα ασθενείς και για δύο γενεές σε επτά ασθενείς. Η ηλικία διάγνωσης των γονέων ήταν συνήθως μεγαλύτερη από αυτή των απογόνων τους, παρόλο που η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική (βλ. Στατιστική ανάλυση).

5.8 Στατιστική ανάλυση

Για τη διερεύνηση της συσχέτισης γονοτύπου-φαινοτύπου, πραγματοποιήθηκε στατιστική σύγκριση διαφόρων χαρακτηριστικών των ασθενών ανάλογα με τη μετάλλαξη που φέρουν.

5.8.1 Συσχέτιση ηλικίας διάγνωσης και γλυκόζης νηστείας με την λειτουργική περιοχή του γονιδίου

Αρχικά οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με την λειτουργική περιοχή του γονιδίου που επηρεάζεται από τη μετάλλαξη: αυτές που επηρεάζουν την DNA-δεσμευτική περιοχή, και αυτές που επηρεάζουν την περιοχή μεταγραφικής δραστηριότητας. Για τις δύο αυτές ομάδες συγκρίθηκε η ηλικία διάγνωσης της νόσου και η γλυκόζη νηστείας κατά τη διάγνωση. Κατά τον έλεγχο αυτό διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς που έφεραν μετάλλαξη που επηρεάζει την DNA-δεσμευτική περιοχή είχαν μέσο όρο ηλικίας διάγνωσης 13,9 έτη ($\pm$ 6,5) και γλυκόζη νηστείας κατά τη διάγνωση 185,6mg/dl ($\pm$ 59,1). Σε αντίθεση, οι ασθενείς που έφεραν μετάλλαξη στην περιοχή

μεταγραφικής δραστηριότητας είχαν μέση ηλικία διάγνωσης 15,4 έτη ($\pm 7,8$) και μέση γλυκόζη νηστείας 161,4mg/dL (± 39). Με την εφαρμογή της μη παραμετρικής μεθόδου Mann-Whitney και τη σύγκριση των διάμεσων τιμών των παραπάνω ομάδων, διαπιστώθηκε ότι και για την ηλικία διάγνωσης και για τη γλυκόζη οι τιμές δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά, με P-value=0,644 για την ηλικία διάγνωσης και P-value=0,594 για τη γλυκόζη νηστείας (Πίνακας 23). Αυτό σημαίνει είτε ότι η μηδενική υπόθεση δεν μπορεί να απορριφθεί και επομένως οι παραπάνω τιμές πιθανόν δε διαφέρουν μεταξύ τους, είτε ότι η ισχύς της μελέτης μας δεν είναι αρκετά μεγάλη ώστε να αναδείξει τυχόν διαφορά.

5.8.2 Συσχέτιση ηλικίας διάγνωσης και γλυκόζης νηστείας με τα ισομερή της πρωτεΐνης

Εν συνεχεία οι ασθενείς χωρίστηκαν ανάλογα με τα ισομερή της πρωτεΐνης που επηρεάζονται από την μετάλλαξη που φέρουν: τις μεταλλάξεις που επηρεάζουν μόνο τα ισομερή A και B, και αυτές που επηρεάζουν και τα τρία ισομερή (A, B και C). Κατά την ανάλυση της ηλικίας διάγνωσης και της γλυκόζης νηστείας διαπιστώθηκε ότι για τις μεταλλάξεις που επηρεάζουν τα ισομερή A και B, η μέση τιμή της ηλικίας διάγνωσης ήταν 11,5 έτη (± 12) και η μέση τιμή της γλυκόζης νηστείας ήταν 176,5mg/dL ($\pm 17,7$), ενώ για τις μεταλλάξεις που επηρεάζουν όλα τα ισομερή (A, B και C) η μέση ηλικία διάγνωσης ήταν 14,8 έτη ($\pm 6,3$) και η μέση γλυκόζη νηστείας 177,7mg/dL ($\pm 57,1$). Με τη μέθοδο Mann-Whitney η οποία συγκρίνει τις διάμεσες τιμές των παραπάνω ομάδων διαπιστώθηκε ότι οι τιμές δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά, με P-value=0,858 για την ηλικία και P-value=0,800 για τη γλυκόζη νηστείας (Πίνακας 23).

5.8.3 Συσχέτιση ηλικίας διάγνωσης και γλυκόζης νηστείας με τον τύπο της μετάλλαξης

Τέλος έγινε διαχωρισμός των ασθενών ανάλογα με τον τύπο της μετάλλαξης που φέρουν: μη νοηματικές, παρανοηματικές, μεταλλάξεις που οδηγούν σε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης και απαλείψεις ενός αμινοξέος. Η μέση ηλικία διάγνωσης των ασθενών ανάλογα με τον τύπο της μετάλλαξης ήταν 11,5($\pm 1,76$), 14,41($\pm 2,61$),

14,67(± 6) και 18 ($\pm 2,83$) έτη αντίστοιχα, ενώ η μέση γλυκόζη νηστείας ήταν 236,33($\pm 31,94$), 171,62($\pm 16,7$), 144,67($\pm 22,21$) και 147mg/dl. Δυστυχώς το μέγεθος της κάθε ομάδας δεν επέτρεπε τη στατιστική ανάλυση των τιμών αυτών με συνέπεια να μην μπορούμε να συμπεράνουμε αν οι τιμές είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά (Πίνακας 23).

		Ηλικία διάγνωσης σε έτη			Γλυκόζη νηστείας κατά τη διάγνωση σε mg/dL		
		Μέση τιμή	ΣΑ	P	Μέση τιμή	ΣΑ	P
Ισομερές που επηρεάζεται	A, B και C	14.8	1.7	0.858	177.7	57.1	0.800
	A και B	11.5	8.5		176.5	17.7	
Τύπος της μετάλλαξης	Παρανοηματικές	14.4	2.6	MA	171.6	47.2	MA
	Μη νοηματικές	11.5	1.8		236.3	55.3	
	Αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης	14.7	6.0		144.7	38.5	
	Απάλειψη	18.0	2.0		147.0	-	
Περιοχή του γονιδίου που επηρεάζεται	DNA-δεσμευτική περιοχή	13.9	2.0	0.644	185.6	59.1	0.594
	Περιοχή μεταγραφικής δραστηριότητας	15.4	3.5		161.4	39.0	

Πίνακας 23. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης των χαρακτηριστικών των ασθενών με ΣΔτMODY3 στον ελληνικό πληθυσμό με βάση την περιοχή και το ισομερές που επηρεάζεται καθώς και στατιστικά στοιχεία ανάλογα με τον τύπο της μετάλλαξης. (MA: Μη αναλύσιμο)

5.8.4 Συσχέτιση θεραπείας των ασθενών με ΣΔτMODY3 με την λειτουργική περιοχή του γονιδίου που επηρεάζεται

Επιπλέον διερευνήθηκε η συσχέτιση της περιοχής του γονιδίου στην οποία βρίσκεται κάθε μετάλλαξη (DNA-δεσμευτική ή μεταγραφικής δραστηριότητας) με τη βαρύτητα της νόσου, χρησιμοποιώντας ως κριτήριο βαρύτητας τη θεραπεία που ακολουθούν οι ασθενείς. Για το λόγο αυτό συγκρίθηκε το ποσοστό των ασθενών που ελάμβαναν θεραπεία με ινσουλίνη και έφεραν μετάλλαξη στην DNA-δεσμευτική περιοχή με το ποσοστό των ασθενών που ελάμβαναν θεραπεία με ινσουλίνη και έφεραν μετάλλαξη στην περιοχή μεταγραφικής δραστηριότητας με τη μέθοδο χ^2 . Κατά τη σύγκριση δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά, με P-value=0,497.(Πίνακας 24)

Αριθμός ασθενών			Ινσουλίνη		Σύνολο
			-	+	
Περιοχή της μετάλλαξης	DNA-δεσμευτική	Υπολογιζόμενος	6	3	9
	Περιοχή	Αναμενόμενος	6.9	2.1	9.0
	Περιοχή	Υπολογιζόμενος	4	0	4
	μεταγραφικής δραστηριότητας	Αναμενόμενος	3.1	.9	4.0
Σύνολο		Υπολογιζόμενο	10	3	13
		Αναμενόμενο	10.0	3.0	13.0

Πίνακας 24. Ανάλυση χ^2 για τη συσχέτιση της θεραπείας με την λειτουργική περιοχή του γονιδίου.

5.8.5 Συσχέτιση θεραπείας των ασθενών με ΣΔτMODY3 με τα ισομερή της πρωτεΐνης που επηρεάζονται

Ο ίδιος έλεγχος πραγματοποιήθηκε και με κριτήριο τα ισομερή της πρωτεΐνης που επηρεάζονται. Με βάση τη μέθοδο χ^2 , η σύγκριση του ποσοστού των ασθενών που ελάμβαναν ινσουλίνη και έφεραν μετάλλαξη που επηρεάζει τα ισομερή A και B δε διέφερε στατιστικά από το αντίστοιχο ποσοστό ασθενών που έφεραν μετάλλαξη

που επηρεάζει και τα τρία ισομερή, με $P=1,0$. (Πίνακας 25)

Αριθμός ασθενών			Ινσουλίνη		Σύνολο
			-	+	
Ισομερές που επηρεάζεται	Α, Β και C	Υπολογιζόμενος	9	3	12
		Αναμενόμενος	9.2	2.8	12.0
	Α και Β	Υπολογιζόμενος	1	0	1
		Αναμενόμενος	.8	.2	1.0
Σύνολο		Υπολογιζόμενο	10	3	13
		Αναμενόμενο	10.0	3.0	13.0

Πίνακας 25. Ανάλυση χ^2 για τη συσχέτιση της θεραπείας με το ισομερές της πρωτεΐνης.

5.8.6 Συσχέτιση ηλικίας διάγνωσης των ασθενών με αυτή των γονέων τους

Η παρατήρηση ότι οι γονείς των ασθενών παρουσίαζαν μεγαλύτερη ηλικία διάγνωσης της νόσου από αυτή των ασθενών διερευνήθηκε με τον μη-παραμετρικό έλεγχο Wilcoxon-signed rank test. Με το έλεγχο αυτό η διάμεση τιμή της ηλικίας διάγνωσης των ασθενών δε βρέθηκε να διαφέρει στατιστικά από τη διάμεση τιμή της ηλικίας διάγνωσης των γονέων τους με τιμή $P=0,438$.

5.8.7 Συσχέτιση ηλικίας διάγνωσης, γλυκόζης νηστείας και θεραπείας ανάλογα με την παρουσία ή όχι μετάλλαξης στο γονίδιο *HNFI4*

Τέλος έγινε σύγκριση της ηλικίας διάγνωσης και της γλυκόζης νηστείας των ασθενών που φέρουν μετάλλαξη του γονιδίου *HNFI4*, με τις αντίστοιχες τιμές των υπολοίπων ασθενών που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη αλλά δεν βρέθηκε να φέρουν μετάλλαξη. Η μέση ηλικία διάγνωσης της νόσου στους ασθενείς με ΣΔτMODY3, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ήταν $14,4 \pm 6,7$ ενώ η μέση γλυκόζη νηστείας ήταν $177,5 \pm 53,1$. Οι αντίστοιχες τιμές για τους υπολοίπους ασθενείς της μελέτης ήταν $16,3 (\pm 10,3)$ έτη και $223,6 (\pm 93,3)$ mg/dl. Κατά τη σύγκριση των διαμέσων τιμών των

δύο ομάδων δε διαπιστώθηκε στατιστική διαφορά με $P\text{-value}=0,761$ και $0,153$ αντίστοιχα. Επομένως κανένα από τα χαρακτηριστικά αυτά δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό των ασθενών.

Για να διερευνηθεί εάν η βαρύτητα της νόσου σχετίζεται με την ανεύρεση μετάλλαξης στο γονίδιο *HNF1A*, επιλέξαμε πάλι ως παράμετρο τη θεραπεία των ασθενών με ινσουλίνη, που πιθανόν αντιπροσωπεύει ασθενείς με σοβαρότερη νόσο, και συγκρίναμε το ποσοστό τους στον πληθυσμό των ασθενών με ΣΔτMODY3 και στους υπολοίπους ασθενείς της μελέτης στους οποίους δεν ανιχνεύθηκε κάποια μετάλλαξη. Με τη μέθοδο χ^2 διαπιστώθηκε ότι η τιμή $P=0,165$, και άρα δεν μπορούμε να απορρίψουμε τη μηδενική υπόθεση, ότι η θεραπεία με ινσουλίνη δε σχετίζεται με την παρουσία μετάλλαξης. (Πίνακας 26)

Αριθμός ασθενών			Ινσουλίνη		Σύνολο
			-	+	
Μετάλλαξη	-	Υπολογιζόμενος	12	12	24
		Αναμενόμενος	14.3	9.7	24.0
	+	Υπολογιζόμενος	10	3	13
		Αναμενόμενος	7.7	5.3	13.0
Σύνολο		Υπολογιζόμενο	22	15	37
		Αναμενόμενο	22.0	15.0	37.0

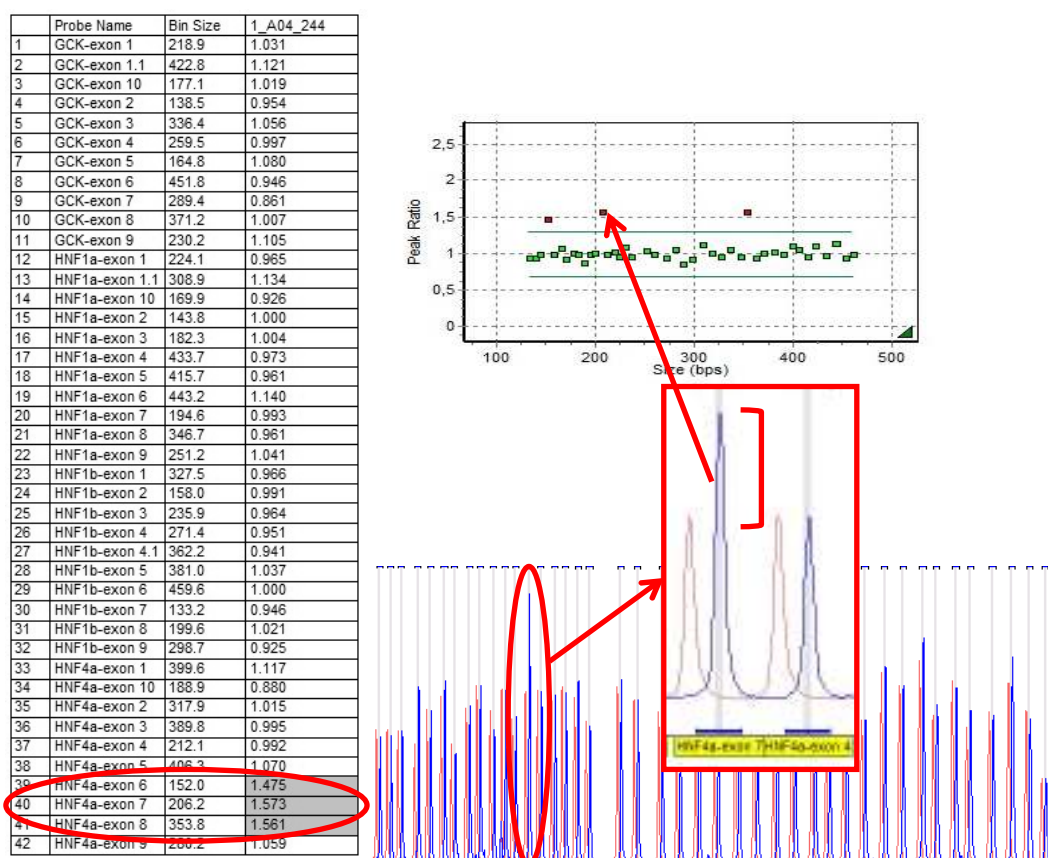
Πίνακας 26. Ανάλυση χ^2 για τη συσχέτιση της θεραπείας με την παρουσία μετάλλαξης στο γονίδιο *HNF1A*.

5.9 Λοιπά Αποτελέσματα

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου MLPA αναγνωρίστηκαν 2 ασθενείς με απάλειψη ολόκληρου του γονιδίου *HNF1B* και 1 ασθενής με διπλασιασμό των εξονίων 6,7 και 8 του γονιδίου *HNF4A* (Εικόνες 48 και 49).

5.9.1 Διπλασιασμός των εξωνίων 6,7, και 8 του γονιδίου *HNF4A* (Εικόνα 48)

Ο διπλασιασμός ανιχνεύθηκε σε μία ασθενή με ΣΔ από την ηλικία των 11 ετών και στον πατέρα της. Το βάρος γέννησης της ασθενούς ήταν 3,45 κιλά, ενώ δεν υπήρχε ιστορικό νεογνικής υπογλυκαιμίας. Η ασθενής εμφάνιζε μετρίως θετικά αντισώματα anti-GAD.



Εικόνα 48. Απεικόνιση αποτελεσμάτων MLPA, όπου αναδεικνύεται διπλασιασμός των εξωνίων 6-8 του γονιδίου *HNF4A*.

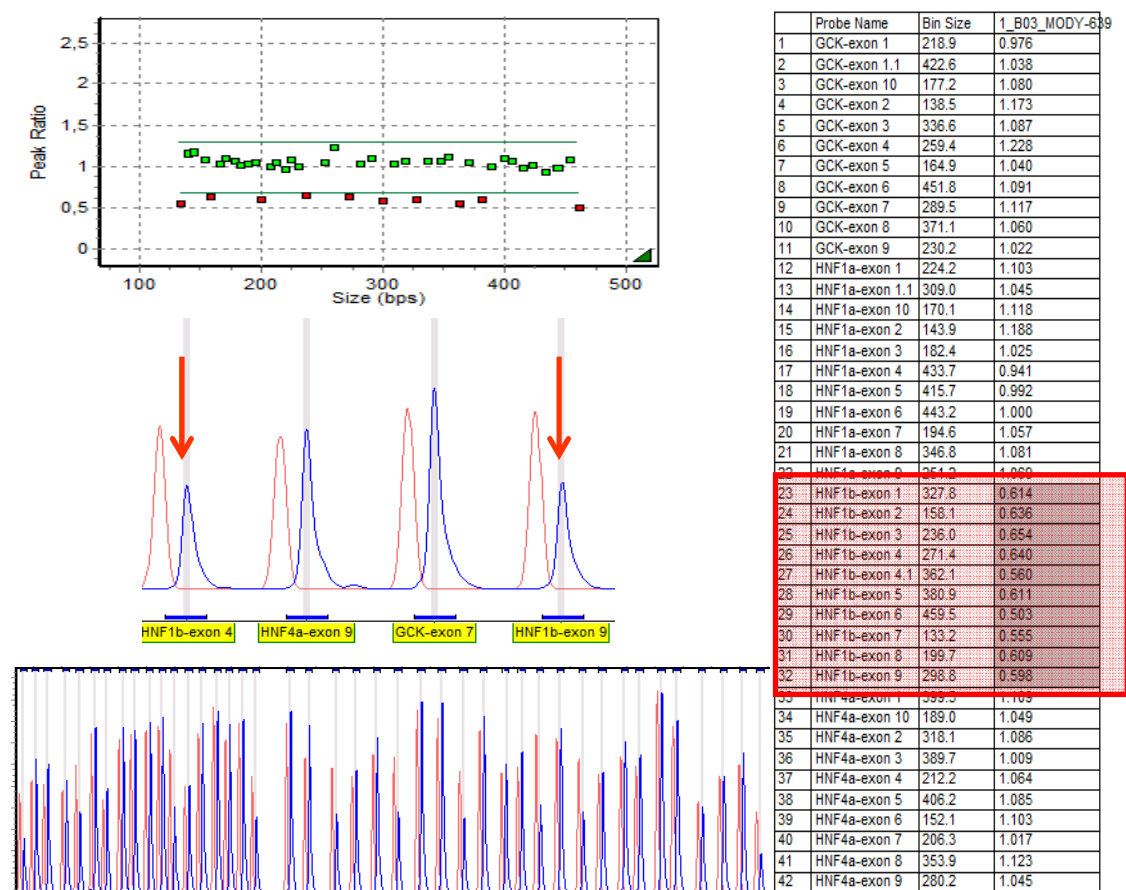
5.9.2 Απάλειψη του γονιδίου *HNF1B* (Εικόνα 49)

Δύο ασθενείς της μελέτης βρέθηκαν να φέρουν απάλειψη ολόκληρου του γονιδίου *HNF1B*.

Η πρώτη ασθενής και ο πατέρας της είχαν κλινικά έκδηλο ΣΔ που έχρηζε θεραπειάς από νεαρή ηλικία (7 και 23 ετών αντίστοιχα).

Η δεύτερη ασθενής και η αδερφή της επίσης διεγνώσθη με ΣΔ σε ηλικία 22 ετών και ήταν υπό θεραπεία με ινσουλίνη. Η ασθενής επίσης είχε οριακά θετικά αντισώματα IA2 κατά τη διάγνυσή της. Δυστυχώς δεν υπήρχε επανάληψη των τίτλων των αντισωμάτων.

Κανένας από τους ασθενείς δεν έφερε κάποια ανωμαλία του ουρογεννητικού συστήματος όπως συχνά συναντάται σε ασθενείς με ΣΔτMODY5.



Εικόνα 49. Απεικόνιση αποτελεσμάτων MLPA, όπου αναδεικνύεται απάλειψη ολόκληρου του γονιδίου *HNF1B*.

6. Συζήτηση

6.1 Συχνότητα του ΣΔτMODY3

Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη συστηματική ανάλυση της συχνότητας του ΣΔτMODY στον ελληνικό πληθυσμό. Η συχνότητα του ΣΔτMODY3 μεταξύ των ασθενών που πληρούν τα αυστηρά κλινικά κριτήρια για MODY είναι 12% (16/134), ενώ η αντίστοιχη συχνότητα για τον ΣΔτMODY2 είναι 55%. Επομένως για τον ελληνικό πληθυσμό, ο συχνότερος τύπος ΣΔτMODY είναι ο τύπος 2 που προκαλείται από μεταλλάξεις του γονιδίου της γλυκοκινάσης. Τόσο στην Ισπανία, όσο και στην Ιταλία, οι μελέτες ανάλυσης της συχνότητας του ΣΔτMODY ανέδειξαν τον τύπο 2 ως τον συχνότερο.[65, 69] Αντιθέτως σε πληθυσμούς της Β. Ευρώπης (Αγγλία, Γερμανία, Δανία) καθώς και σε άλλες περιοχές του κόσμου, ο ΣΔτMODY3 έχει περιγραφεί ότι αντιπροσωπεύει μέχρι και το 65% των περιπτώσεων ΣΔτMODY.[60-63, 68] Βασικό χαρακτηριστικό της μελέτης μας καθώς και των αντιστοίχων στην Ισπανία και την Ιταλία είναι ότι πραγματοποιήθηκαν σε παιδιατρικά νοσοκομεία. Το εργαστήριό στο οποίο πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη αποτελεί τμήμα της Α΄ Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών και συνεπώς τα άτομα της μελέτης ήταν κυρίως παιδιατρικοί ασθενείς. Είναι επίσης γεγονός ότι το εργαστήριο συνεργάστηκε άμεσα με όλα τα διαβητολογικά κέντρα της Ελλάδας και αποτελεί εθνικό κέντρο αναφοράς για την ανάλυση των γονιδίων που σχετίζονται με τον ΣΔτMODY. Ωστόσο δεν μπορούμε να απορρίψουμε και την υπόθεση ότι η άμεση συνεργασία με τον παιδιατρικό πληθυσμό μπορεί να δημιούργησε κάποιο συστηματικό σφάλμα (bias) των αποτελεσμάτων λόγω της επιλογής και συμμετοχής περισσότερων νεαρών ασθενών, καθώς σε νεαρή ηλικία πιθανόν ο ΣΔτMODY3 να μην έχει εκδηλωθεί ακόμα, σε αντίθεση με το ΣΔτMODY2 όπου η υπεργλυκαιμία νηστείας είναι έκδηλη από τη γέννηση.

Δυστυχώς μέχρι σήμερα στην Ελλάδα δεν υπάρχει εθνικό σύστημα καταγραφής όλων των περιπτώσεων ΣΔ. Επομένως η αναγωγή των δεδομένων της συγκεκριμένης μελέτης και η ανάδειξη της συχνότητας του ΣΔτMODY στον παιδιατρικό διαβήτη δεν είναι δυνατή. Στη βιβλιογραφία, η αντίστοιχη συχνότητα αναφέρεται ως <1-5% των περιπτώσεων παιδικού διαβήτη.[57, 132, 133] Πρόσφατα

σε μεγάλη μελέτη στις ΗΠΑ με συμμετοχή 2200 περίπου ασθενών <20 ετών με ΣΔ, η συχνότητα του ΣΔτMODY αναδείχθηκε ως 1,2% όλων των περιπτώσεων νεανικού ΣΔ, με τον τύπο 3 να αποτελεί τον συχνότερο τύπο. [68]

6.2 Είδος μεταλλάξεων - Ιδιωτικές μεταλλάξεις

Δεκαπέντε διαφορετικές μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν σε 16 μη συγγενείς ασθενείς. Επτά από τις μεταλλάξεις ήταν καινούριες μεταλλάξεις, που δεν είχαν προηγουμένως περιγραφεί στη βιβλιογραφία ως μεταλλάξεις της γαμετικής σειράς. Το γεγονός ότι μόνο 2 ασθενείς παρουσίασαν κοινή μετάλλαξη, καθώς και ο μεγάλος αριθμός καινούριων μεταλλάξεων, αποδεικνύει ότι οι περισσότερες μεταλλάξεις στο ΣΔτMODY3 είναι μοναδικές για κάθε οικογένεια. Οι μεταλλάξεις για το λόγο αυτό περιγράφονται ως «ιδιωτικές» μεταλλάξεις (private mutations). Η αυξημένη παρουσία «ιδιωτικών» μεταλλάξεων έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία και αφορά όλα τα γονίδια που σχετίζονται με το ΣΔτMODY. [95]

Η μετάλλαξη c.872dupC,Gly292fs, που αντιστοιχεί στην περιοχή του γονιδίου που είχε παλαιότερα περιγραφεί ότι είναι ιδιαίτερα επιρρεπής σε μεταλλάξεις, καθώς φέρει μία αλληλουχία 8 ή 9 βάσεων κυτοσίνης, ανιχνεύθηκε σε έναν μόνο ασθενή του δικού μας πληθυσμού (6%). Επομένως δεν αποτελεί διεθνή διαπίστωση ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη μπορεί να εξηγήσει το 15-20% των περιπτώσεων του ΣΔτMODY3. Επίσης μπορεί απλά να αντιπροσωπεύει το διαφορετικό γενετικό υπόστρωμα των ασθενών του ελληνικού πληθυσμού σε σχέση με τις άλλες μελέτες. Επομένως μέθοδοι ταχείας ανίχνευσης αυτής της μετάλλαξης δε θα βοηθούσαν ιδιαίτερα στην ταξινόμηση των ασθενών στο δικό μας πληθυσμό.

6.3 Μέθοδοι ανίχνευσης των μεταλλάξεων

Η αρχική μέθοδος ανίχνευσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η μέθοδος DGGE. Καθώς τα αποτελέσματα δεν ανέδειξαν τον αναμενόμενο αριθμό μεταλλάξεων, έγινε προσαρμογή του πρωτοκόλλου και τα δείγματα, στα οποία δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη με τη μέθοδο σάρωσης, υποβλήθηκαν σε αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδίου. Τελικά ανιχνεύθηκαν 7 επιπλέον μεταλλάξεις. Επομένως 47% των μεταλλάξεων διέφυγαν του αρχικού ελέγχου των δειγμάτων με τη μέθοδο DGGE.

Οι περιορισμοί της μεθόδου είναι γνωστοί. Πρόκειται για μέθοδο σάρωσης των δειγμάτων, αλλά η ευαισθησία της μεθόδου όπως έχει περιγραφεί ήδη στη βιβλιογραφία είναι περίπου 80-90%. [134-136] Στον πληθυσμό της παρούσας μελέτης, αν θεωρήσουμε ως βέλτιστη μέθοδο ανίχνευσης τη μέθοδο της αλληλούχησης, η ευαισθησία της μεθόδου είναι ακόμα χαμηλότερη (53%).

Ένα από τα μειονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι η μικρή της ευαισθησία σε μελέτη περιοχών του DNA που συμπλησιάζουν και σχηματίζουν διπλή έλικα (heteroduplex).[137] Επιπλέον, η μέθοδος DGGE δεν έχει την δυνατότητα ανίχνευσης μικρών απαλείψεων ή διπλασιασμών, πιθανώς επειδή αυτές δεν προκαλούν μεγάλες αλλαγές στις αποδιατακτικές ιδιότητες του μορίου.[136] Στο πληθυσμό της παρούσας μελέτης από τις 7 μεταλλάξεις που δεν ανιχνεύθηκαν αρχικά, 4 αποτελούσαν μικρές απαλείψεις/διπλασιασμούς (57%), ενώ με τη μέθοδο DGGE ανιχνεύθηκε μόλις 1 ανάλογη μετάλλαξη. Επομένως το 80% των μικρών απαλείψεων/διπλασιασμών διέφυγαν του αρχικού ελέγχου, γεγονός που επιβεβαιώνει τις αδυναμίες της μεθόδου και τις αρχικές μας υποψίες.

Επίσης δεν μπορεί να αποκλεισθεί η περίπτωση ανεπαρκούς σχεδιασμού και εκτέλεσης της μεθόδου. Είναι γνωστό ότι η μέθοδος παρουσιάζει μικρή επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, καθώς αφορά ιδιαίτερες παρασκευές και συνθήκες εκτέλεσης.[138] Προκειμένου να μειωθεί αυτή η πιθανότητα, σε κάθε ηλεκτροφόρηση γινόταν χρήση δείγματος θετικού μάρτυρα. Ελέγχουμε με τον τρόπο αυτό αν η αποδιάταξη του δείγματος του θετικού μάρτυρα ήταν επιτυχής, γεγονός που επιβεβαίωνε ότι η γέλη και η ηλεκτροφόρηση είχαν πραγματοποιηθεί με ακρίβεια.

Συνολικά, λαμβάνοντας υπόψη την ευαισθησία των μεθόδων και το κόστος τους, συστήνεται να ελέγχονται όλα τα δείγματα με τη μέθοδο της αλληλούχησης. Η μέθοδος της αλληλούχησης έχει πλέον χαμηλότερο κόστος σε σύγκριση με το παρελθόν και εφόσον θεωρείται μέθοδος αναφοράς, αξίζει όλα τα δείγματα να υποβάλλονται σε αλληλούχηση ώστε να εξασφαλισθούν ακριβέστερα αποτελέσματα.

6.4 Κλινικά χαρακτηριστικά

6.4.1 Ηλικία διάγνωσης της νόσου

Ο φαινότυπος των ασθενών με ΣΔτMODY3 παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία όπως έχει περιγραφεί ήδη στη βιβλιογραφία. Όσον αφορά την ηλικία διάγνωσης της νόσου για τον πληθυσμό της μελέτης μας, ποικίλει από 4 μηνών ως 24 έτη. Η ηλικία έναρξης της νόσου με βάση τα κριτήρια του ΣΔτMODY είναι <25 έτη. Ωστόσο, μελέτες έχουν περιγράψει ασθενείς με MODY3 και έναρξη της νόσου σε ηλικία >25 έτη. Συγκεκριμένα, οι Bellanne-Chantelot και συν. περιέγραψαν ότι 40% των ασθενών με ΣΔτMODY3 εκδήλωσε ΣΔ σε ηλικία >25 ετών.[102] Στην παρούσα μελέτη, κανένας από τους ασθενείς που συμπεριελήφθησαν με βάση το οικογενειακό ιστορικό τους, και ηλικία διάγνωσης >25 έτη, δεν έφερε μετάλλαξη του γονιδίου. Επομένως η ηλικία έναρξης της νόσου αποτελεί ένα καλό κριτήριο αναγνώρισης της νόσου με βάση τα στοιχεία της συγκεκριμένης μελέτης.

Ωστόσο, η ηλικία έναρξης της νόσου ποικίλει σημαντικά ακόμα και για ασθενείς στην ίδια οικογένεια με την ίδια μετάλλαξη. Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε μία τάση προς μικρότερη ηλικία έναρξης της νόσου για τους ασθενείς σε σύγκριση με την αντίστοιχη των γονέων τους. Η διαφορά αυτή δεν ήταν ωστόσο στατιστικά σημαντική. Βεβαίως η παρατήρηση αυτή είναι αναμενόμενη δεδομένης της ευαισθητοποίησης και της αυξημένης ανησυχίας των γονέων και της πρώιμης εξέτασης των παιδιών τους, ακόμα και πριν την εκδήλωση χαρακτηριστικών της νόσου. Λιγότερο πιθανό φαίνεται το ενδεχόμενο αύξησης της σοβαρότητας της νόσου σε επόμενες γενεές (anticipation), καθώς ο μηχανισμός αυτός παρατηρείται σε νόσους που προκαλούνται από αύξηση του αριθμού επαναλαμβανόμενων τριπλετών νουκλεοτιδίων, πχ νόσος Huntington, νόσος του Εύθραυστου Χ κα.[139, 140]

Ο ασθενής με έναρξη της νόσου σε ηλικία 4 μηνών αποτελεί τον νεαρότερο ασθενή με ΣΔτMODY3 που έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία μέχρι σήμερα. Ο ασθενής διεγνώσθη κατά τη διάρκεια λοίμωξης του αναπνευστικού, κατά την οποία ο έλεγχος αίματος αποκάλυψε αυξημένες τιμές γλυκόζης αίματος (256mg/dl). Εξαιτίας του οικογενειακού ιστορικού ΣΔ στην μητέρα του ασθενή και τη μητρική γιαγιά, τέθηκε η υπόνοια ΣΔτMODY3 και επιβεβαιώθηκε με την περιγραφή της μετάλλαξης R200Q. Η εκδήλωση του ΣΔ συνήθως λαμβάνει χώρα σε περιόδους αυξημένων αναγκών για ινσουλίνη. Για το ΣΔτMODY3 έχει περιγραφεί ότι μία

αντίστοιχη περίοδος είναι η εφηβεία, οπότε και οι περισσότερες περιπτώσεις διαβήτη διαγιγνώσκονται. Κατά την εφηβεία η φυσιολογικά εμφανιζόμενη αύξηση της ινσουλinoαντίστασης λόγω της αύξησης των στεροειδών ορμονών του φύλου και της αυξητικής ορμόνης, αυξάνουν τις συνολικές ανάγκες του οργανισμού για ινσουλίνη και καθιστούν τους ασθενείς επιρρεπείς στην εκδήλωση διαβήτη.[141-143] Επομένως η διάγνωση σε τόσο νεαρή ηλικία, όσο στον ασθενή της μελέτης μας, είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα. Βεβαίως είναι πιθανό ο ασθενής να παρουσίαζε αυξημένα επίπεδα γλυκόζης αίματος εξαιτίας του στρες και της ασθένειας που διένυε. Επιπλέον δεν είναι γνωστές οι θεραπευτικές παρεμβάσεις κατά τη διάρκεια της νοσηλείας του, και εάν έγινε χορήγηση στεροειδών ή άλλων φαρμάκων που επηρέασαν τα επίπεδα γλυκόζης αίματος. Σε μία παλαιότερη μελέτη περιγράφηκε βρέφος που διεγνώσθη με ΣΔτMODY3 μετά από την εμφάνιση υπεργλυκαιμίας, που εκδηλώθηκε επίσης κατά τη διάρκεια λοίμωξης.[144]

Εναλλακτικά θα μπορούσαμε να εικάσουμε ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη προκαλεί μεγαλύτερη βλάβη στην πρωτεΐνη και συνεπώς πρόωμη εξάντληση της παραγωγικής ικανότητας των β-κυττάρων του παγκρέατος. Η μετάλλαξη του ασθενή έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία, αλλά δεν αναφέρονται αρκετά στοιχεία για τους ασθενείς που την έφεραν.[63, 145] Δεν γίνεται αναφορά για ιδιαίτερα στοιχεία που να διαφοροποιούν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη, αν και οι ασθενείς που την έφεραν διεγνώσθηκαν σε ηλικία >10 ετών. Ο ασθενής της παρούσας μελέτης παρουσίασε ομαλοποίηση των επιπέδων σακχάρου αίματος μετά τη λοίμωξη και δεν έχρηζε θεραπείας μέχρι την ηλικία των 4 ετών. Παρακολουθούνταν τακτικά από ειδικό παιδοενδοκρινολόγο και τα επίπεδα σακχάρου αίματος άρχισαν ξανά να αυξάνονται όταν ο ασθενής ήταν περίπου 4 ετών σε επίπεδα γλυκόζης νηστείας 180 mg/dl. Προφανώς η προοδευτική εξάντληση των β κυττάρων του παγκρέατος οδήγησε σε κλινικά έκδηλο διαβήτη σε αυτή την περίοδο, ενώ σε περιόδους αυξημένων αναγκών το β-κύτταρο ανεπαρκούσε επίσης να αντεπεξέλθει στις ανάγκες του οργανισμού. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ηλικία έναρξης ΣΔ της μητέρας του ασθενή ήταν 17 έτη, ενώ για την μητρική γιαγιά 31 έτη.

6.4.2 Γλυκόζη νηστείας στη διάγνωση της νόσου

Όπως και για την ηλικία έναρξης της νόσου, τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας κατά τη διάγνωση των ασθενών παρουσίαζαν επίσης μεγάλη διακύμανση από φυσιολογικά μέχρι 300 mg/dL. Το μεγάλο εύρος υποδεικνύει ποικίλο βαθμό βλάβης των β-κυττάρων του παγκρέατος. Αυτό είναι αναμενόμενο καθώς οι ασθενείς συνήθως δεν παρουσιάζουν σημεία κετοξέωσης αλλά διαγιγνώσκονται σε προληπτικούς ελέγχους και η διάγνωσή τους μπορεί να πραγματοποιηθεί σε οποιοδήποτε στάδιο της νόσου, από την αρχική διαταραχή ανοχής στη γλυκόζη μέχρι την υπεργλυκαιμία νηστείας.

6.4.3 Αυτοαντισώματα

Δυστυχώς τα επίπεδα των αυτοαντισωμάτων δεν ήταν διαθέσιμα για το μεγαλύτερο μέρος των ασθενών της μελέτης. Εφόσον η μελέτη συμπεριέλαβε αναδρομικά ασθενείς που παραπέμφθηκαν στο εργαστήριο από το 1996, είναι λογικό σε πολλούς από αυτούς τους ασθενείς να μην έχουν ελεγχθεί τα αυτοαντισώματα. Επίσης η επανάκληση των ασθενών ή των θεραπόντων ιατρών τους για τη μέτρηση των αντισωμάτων την περίοδο της μελέτης, θεωρήθηκε ότι δε θα ήταν δυνατή για να συλλεχθούν αρκετά δείγματα ώστε να οδηγήσουν σε σημαντικά συμπεράσματα. Επίσης όπως είναι γνωστό τα επίπεδα των αντισωμάτων και στο ΣΔτ1 μειώνονται σημαντικά μετά τη διάγνωση της νόσου με την πάροδο του χρόνου.[36, 146] Επομένως η ανεύρεση αρνητικών αντισωμάτων χρόνια μετά την αρχική διάγνωση του ΣΔ δε θα οδηγούσε σε ασφαλές συμπέρασμα ότι οι ασθενείς δεν έφεραν ποτέ στοιχεία αυτοανοσίας.

Ενδιαφέρον εύρημα ωστόσο της μελέτης ήταν η αναγνώριση ασθενών με μετάλλαξη γονιδίων για ΣΔτMODY και θετικό τίτλο αντισωμάτων. Αντίστοιχες περιπτώσεις ασθενών με ΣΔτMODY και θετικά αντισώματα έχουν προηγουμένως περιγραφεί στη βιβλιογραφία, αλλά η γενική διαπίστωση είναι ότι ο ΣΔτMODY παρατηρείται σε ασθενείς με αρνητικά αντισώματα.[147, 148] Έχει περιγραφεί ότι τα αυτοαντισώματα δεν έχουν 100% ευαισθησία ή ειδικότητα για τη διάγνωση ΣΔτ1, καθώς θετικά αντισώματα έχουν περιγραφεί και στο γενικό πληθυσμό.[149, 150] Επομένως η μελέτη μας επιβεβαιώνει το συμπέρασμα προηγούμενων μελετών ότι τα

αυτοαντισώματα μπορεί να είναι θετικά σε ασθενείς με ΣΔτMODY όπως και σε υγιή άτομα .[151] Χαρακτηριστικά στις δύο ασθενείς με θετικά αντισώματα και ΣΔτMODY1 και 5 (GADA και IA2 αντίστοιχα), ο τίτλος των αντισωμάτων ήταν οριακά αυξημένος σε σύγκριση με το ανώτερο όριο του εργαστηρίου, ενώ δεν έγινε ποτέ επανάληψη των εξετάσεων. Επομένως ο θετικός τίτλος των αυτοαντισωμάτων, ιδιαίτερα όταν αφορά οριακά αυξημένο τίτλο, δεν πρέπει να αποτρέπει τον περαιτέρω μοριακό έλεγχο των δειγμάτων για ΣΔτMODY, ιδίως όταν υπάρχει έντονο οικογενειακό ιστορικό. Αντιθέτως η ανεύρεση περισσότερων από δύο θετικών αντισωμάτων, είναι ενδεικτική ΣΔτ1 και περαιτέρω έλεγχος για ΣΔτMODY δε συνίσταται εκτός αν συνυπάρχουν άλλα στοιχεία που να στηρίζουν αυτή την υπόθεση. [151, 152]

6.4.4 Θεραπεία

Αν και δεν υπήρχαν στοιχεία για τη θεραπευτική αγωγή όλων των ασθενών που παραπέμφθηκαν στο εργαστήριο, ωστόσο υπήρχε μεγάλη διαφοροποίηση όσον αφορά τη θεραπεία που ακολουθούσαν οι ασθενείς. Υπήρξαν ασθενείς που δεν έχριζαν καμίας θεραπείας, άλλοι που λάμβαναν θεραπεία με αντιδιαβητικό δισκίο και άλλοι με ινσουλίνη. Δυστυχώς λίγοι μόνο ασθενείς λάμβαναν την κατάλληλη θεραπεία με σουλφονουλιδίες πριν τη διάγνωση της νόσου. Επίσης αρκετοί ασθενείς παραδέχτηκαν ότι δεν ακολουθούσαν τη συνιστώμενη θεραπεία λόγω της δυσκολίας χορήγησης (ενέσιμη ινσουλίνη) ή των πολλαπλών δισκίων που απαιτούνταν. Με τη διάγνωση της γονιδιακής βλάβης και την αλλαγή της θεραπείας των ασθενών σε σουλφονουλιδίες ελπίζουμε ότι θα επιτευχθεί καλύτερος έλεγχος των επιπέδων γλυκόζης πλάσματος και καλύτερη συμμόρφωση των ασθενών, όπως έχει καταδειχθεί σε προηγούμενες μελέτες.

6.4.5 Πάσχουσες Γενεές

Η αρχική επιλογή των ασθενών για τη συμμετοχή τους στη μελέτη στηρίχθηκε στο θετικό οικογενειακό ιστορικό. Επομένως όλοι οι ασθενείς μας είχαν οικογενειακό ιστορικό διαβήτη τουλάχιστον για μία γενεά. Από τους 16 πάσχοντες με

ΣΔτMODY3, 9 έφεραν θετικό οικογενειακό ιστορικό σε 3 γενεές και οι υπόλοιποι 7 μόνο σε 2, άρα δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στον αριθμό των πασχουσών γενεών. Επομένως, αν και η ύπαρξη θετικού οικογενειακού ιστορικού είναι σημαντική, ο αριθμός των πασχουσών γενεών δεν έχει σημασία για την πρόβλεψη. Είναι πιθανό βεβαίως ότι ακόμα και οι ασθενείς που ανέφεραν ότι μόνο οι γονείς τους είχαν διαβήτη, να αφορούν περιπτώσεις όπου οι γονείς των γονέων τους δεν είχαν ποτέ ελεγχθεί και η νόσος τους διέφυγε της διάγνωσης. Επίσης υπάρχει η πιθανότητα οι μεταλλάξεις να αφορούν de novo μεταλλάξεις, γεγονός λιγότερο πιθανό.

6.5 Κριτήρια διάγνωσης

Η διάγνωση του ΣΔτMODY είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς με τη διάγνωση και την εφαρμογή της κατάλληλης θεραπείας μπορεί να βελτιωθεί η συμμόρφωση των ασθενών, ο γλυκαιμικός έλεγχος και η πρόγνωση της νόσου. Το κύριο ερώτημα που τίθεται είναι πώς θα γίνει ο διαχωρισμός των ασθενών με ΣΔτMODY και η επιλογή τους για μοριακό έλεγχο μέσα από τον πληθυσμό των διαβητικών ασθενών. Τα κριτήρια διάγνωσης που χρησιμοποιούνται συνήθως δεν λαμβάνουν υπόψη όλα τα χαρακτηριστικά των ασθενών. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η ηλικία διάγνωσης της νόσου <25 έτη φαίνεται αρχικά να είναι ισχυρό διαφοροποιητικό κριτήριο, καθώς κανένας από τους 6 ασθενείς που συμπεριελήφθησαν με βάση το θετικό οικογενειακό ιστορικό διαβήτη και διεγνώσθησαν σε ηλικία > 25 ετών δε διεγνώσθη με ΣΔτMODY3. Παρά ταύτα με βάση την υπολογιζόμενη συχνότητα του ΣΔτMODY3 (12%), χρειάζεται πιθανότατα μεγαλύτερη ομάδα ελέγχου για να υποστηρίξουμε την ηλικία διάγνωσης ως ακριβές κριτήριο ελέγχου. Επιπλέον με βάση τα κριτήρια επιλογής των ασθενών, έπρεπε να υπάρχει θετικό οικογενειακό ιστορικό διαβήτη σε τουλάχιστον 2 γενεές. Από τα τελικά αποτελέσματα ίδιος περίπου αριθμός ασθενών παρουσίαζε 2 και 3 γενεές πάσχουσες. Επομένως, αν και το οικογενειακό ιστορικό αποτελεί εξ ορισμού βασικό κριτήριο επιλογής των ασθενών, ο αριθμός των πάσχουσων γενεών δεν αποτελεί επιπλέον υποστηρικτικό στοιχείο. Τέλος τα αυτοαντισώματα μπορούν να αποτελέσουν βασικό στοιχείο διαχωρισμού των ασθενών, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ιδιαίτερα όταν αφορά περισσότερα από 1 θετικά αντισώματα.

Βεβαίως αρκετές μελέτες προσπάθησαν να βελτιώσουν τα παραπάνω κριτήρια. Βασικό μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι τα κριτήρια αυτά περιλαμβάνουν συνήθως αυστηρά όρια, πχ ηλικία διάγνωσης <25 έτη, και δεν λαμβάνουν υπόψη την διαφορετική πιθανότητα που προκύπτει όταν η κάθε παράμετρος λαμβάνει ένα φάσμα τιμών. Για το λόγο αυτό δημιουργήθηκαν μοντέλα πρόβλεψης της πιθανότητας ΣΔτMODY3 από δύο διαφορετικές ομάδες. Το πρώτο προέκυψε από την Bellanne-Chantelot και συν. από τους οποίους προέκυψε η εξίσωση της Εικόνας 13. Το δεύτερο μοντέλο περιγράφηκε από τους Shields και συν, οι οποίοι δημιούργησαν ένα διαθέσιμο στο διαδίκτυο σύστημα πρόβλεψης της πιθανότητας για ΣΔτMODY με βάση το οικογενειακό ιστορικό, την ηλικία διάγνωσης, τη θεραπεία και το BMI του ασθενή (Εικόνα 14). Αν και τα μοντέλα αυτά είναι ιδιαίτερος χρήσιμα για την πρώτη προσέγγιση του ασθενή, δεν μπορούμε να στηριχτούμε απόλυτα σε αυτά, και συνεχείς βελτιώσεις πραγματοποιούνται ώστε με τον συνυπολογισμό επιπλέον παραμέτρων να αυξηθεί η ευαισθησία και η ειδικότητά τους, και επίσης να διευρυνθεί η χρήση τους σε άλλες φυλές, καθώς η περιγραφή τους έγινε σε καυκάσιο πληθυσμό.

6.6 Συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου

Η προσπάθεια ανεύρεσης συσχέτισης γονοτύπου-φαινοτύπου δεν απέδωσε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Βεβαίως αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς αρκετές μελέτες στο παρελθόν δεν κατάφεραν να περιγράψουν ιδιαίτερες συσχετίσεις. Η σημαντικότερη συσχέτιση που έχει περιγραφεί είναι η συσχέτιση των μεταλλάξεων των αρχικών εξωνίων (1-6) με πρωιμότερη ηλικία έναρξης της νόσου, ως έμμεσο μέτρο της σοβαρότητας της νόσου.[94] Στην παρούσα μελέτη δεν αναδείχτηκε αντίστοιχη συσχέτιση, ούτε όταν συγκρίθηκε η ηλικία διάγνωσης της νόσου με τη λειτουργική περιοχή όπου βρίσκεται η μετάλλαξη, ούτε με το ισομερές του γονιδίου που επηρεάζεται. Είναι βεβαίως πιθανόν να απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός ασθενών προκειμένου να αυξηθεί η ισχύς της ανάλυσης και να αναδειχθούν τυχόν διαφορές.

6.7 Όφελος διάγνωσης ΣΔτMODY3

Ο μοριακός έλεγχος και η διάγνωση ΣΔτMODY3 μπορεί να αποφέρει ποικίλα οφέλη για τον ασθενή. Η θεραπευτική προσέγγιση της νόσου, όπως αναφέρεται και παραπάνω, αποτελεί τη σημαντικότερη ίσως ωφέλεια της διάγνωσης. Η αλλαγή της θεραπείας σε χαμηλές δόσεις σουλφονυλουρίας επιτυγχάνει καλό γλυκαιμικό έλεγχο και μεγαλύτερη συμμόρφωση με τη θεραπευτική αγωγή. Ακόμα και η αποτυχία ή η αδυναμία λήψης σουλφονυλουρίας (λόγω πχ αλλεργίας, ανεπιθύμητων ενεργειών κα) μπορεί να αντικατασταθεί με νέα κατηγορία φαρμάκων που κυκλοφορούν και έχουν αποδεδειγμένη δράση στο ΣΔτMODY3.[153] Βεβαίως βελτιώνει και την ποιότητα ζωής των ασθενών πολλοί από τους οποίους καταφέρνουν να ανεξαρτητοποιηθούν από τις καθημερινές ενέσεις και να νιώσουν πιο «φυσιολογικοί».

Μειώνεται επίσης ο κίνδυνος μακροπρόθεσμων μικροαγγειακών και μακροαγγειακών επιπλοκών της νόσου που σχετίζονται άμεσα με τα επίπεδα υπεργλυκαιμίας του ασθενή. Επιπλέον η περιγραφή στη βιβλιογραφία περιπτώσεων με ηπατικά αδενώματα, οδηγεί στον προληπτικό έλεγχο των ασθενών για αυτά με τακτικό υπερηχογράφημα άνω κοιλίας. Με την πρόωμη ανακάλυψή τους πριν την εκδήλωση συμπτωμάτων, μπορούν να προληφθούν σοβαρές επιπλοκές όπως ρήξη ή κακοήθης μετάλλαξή τους.

Επιπλέον η ακριβής ονομασία της νόσου που φέρει ο ασθενής οδηγεί σε καλύτερη επικοινωνία μαζί του. Έχοντας την απάντηση στην ερώτηση του ασθενή "Τί έχω;", αυξάνει την εμπιστοσύνη από την πλευρά του ασθενή και οδηγεί σε πιο επιτυχή συμμόρφωση με το θεραπευτικό πλάνο.

Τέλος οι εξελίξεις της γενετικής, έχουν βελτιώσει και την γενετική συμβουλευτική των ασθενών. Τα άτομα που φέρουν τη μετάλλαξη μπορεί να δεχθούν συμβουλές όσον αφορά την πιθανότητα μετάδοσης της νόσου στα παιδιά τους, και τον ενωρίς προληπτικό έλεγχό τους για την αναγνώριση των ασθενών πριν την εκδήλωση σημείων της νόσου.

7. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, μεταλλάξεις του γονιδίου *HNF1A* αποτελούν συχνή αιτία παιδικού οικογενή ΣΔ στον ελληνικό πληθυσμό. Η συχνότητα είναι περίπου 12 % για τους ασθενείς που πληρούν τα κριτήρια για ΣΔτMODY. Ο αρχικός έλεγχος με τη μέθοδο DGGE είχε αρκετά ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, άρα συστήνεται όλα τα δείγματα να υποβάλλονται σε έλεγχο με αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδίου.

Οι μεταλλάξεις που προκαλούν ΣΔτMODY3 αφορούν συχνά νέες μεταλλάξεις. Επτά καινούριες μεταλλάξεις περιγράφηκαν στο δικό μας πληθυσμό.

Οι ασθενείς παρουσιάζουν μεγάλο εύρος φαινοτύπων, γεγονός που είναι συμβατό με τη βιβλιογραφία. Επίσης περιγράφουμε ορισμένα χαρακτηριστικά με ιδιαίτερο ενδιαφέρον, όπως πολύ πρόωμη ηλικία έναρξης της νόσου. Τέλος, η αναγνώριση της νόσου φέρει πολλαπλά οφέλη για τον ασθενή, καθώς μεταξύ άλλων μπορεί να αλλάξει την μακροπρόθεσμη θεραπεία και πρόγνωση της νόσου.

8. Βιβλιογραφία

1. Carpenter S, Rigaud M, Barile M, Priest TJ, Perez L, Ferguson JB: **An Interlinear Transliteration and English Translation of Portions of THE EBERS PAPYRUS. Possibly Having to Do With Diabetes Mellitus** *Bard College* 1998.
2. Ahmed AM: **History of diabetes mellitus.** *Saudi Med J* 2002, **23**(4):373-378.
3. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H: **Global Prevalence of Diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030.** *Diabetes Care* 2004, **27**:1047-1953.
4. <http://www.who.int/diabetes/en/>. 2013.
5. Hossain P, Kavar B, Nahas ME: **Obesity and Diabetes in the Developing World-A Growing Challenge.** *N Engl J Med* 2007, **356**(3):213-215.
6. CDC: **National Diabetes Fact Sheet: national estimates and general information on diabetes and prediabetes in the United States.** *Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention* 2011.
7. Gikas A SA, Panagiotakos D, Pastromas V, Paraskevopoulou E, Skliros E, Pappas S.: **Rising prevalence of diabetes among Greek adults: findings from two consecutive surveys in the same target population.** *Diabetes Res Clin Pract* 2008 **79**(2):325-329.
8. Gikas A, Sotiropoulos A, Panagiotakos D, Peppas T, Skliros E, Pappas S: **Prevalence, and associated risk factors, of self-reported diabetes mellitus in a sample of adult urban population in Greece: MEDICAL Exit Poll Research in Salamis (MEDICAL EXPRESS 2002).** *BMC Public Health* 2004, **4**:2.
9. http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/index4.html.
10. Henquin JC: **Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation.** *Diabetologia* 2009, **52**(5):739-751.
11. Ashcroft FM: **ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion.** *Journal of Clinical Investigation* 2005, **115**(8):2047-2058.
12. Lang J: **Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion.** *Eur J Biochem* 1999, **259**:3-17.
13. Tarasov A, Dusonchet J, Ashcroft F: **Metabolic Regulation of the Pancreatic β -Cell ATP-Sensitive K⁺ Channel: A Pas de Deux.** *DIABETES* 2004, **53**(Sup3):S113-122.
14. Quan Y, Barszcyk A, Feng Z-p, Sun H-s: **Current understanding of KATP channels in neonatal diseases: focus on insulin secretion disorders.** *Acta Pharmacologica Sinica* 2011, **32**(6):765-780.
15. McTaggart JS, Clark RH, Ashcroft FM: **The role of the KATP channel in glucose homeostasis in health and disease: more than meets the islet** *J Physiol* 2010, **588**(17):3201–3209.
16. Gribble FM, Reimann F: **Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era.** *Diabetologia* 2003, **46**(7):875-891.
17. Moreau C, Prost A, Derand R, Vivaudou M: **SUR, ABC proteins targeted by K channel openers.** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2005, **38**(6):951-963.
18. Gloyn A, Pearson ER, Antcliff JF, Proks P, Bruining GJ, Slingerland AS, Howard N, Srinivasan S, Silva JMCL, Molnes J *et al*: **Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes.** *NEJM* 2004, **350**(18):1838-1849.
19. Thomas PM, Cote GJ, Wohlk N, Haddad B, Mathew PM, Rabl W, Aguilar-Bryan L, Gagel RF, Bryan J: **Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy.** *Science* 1995, **268**(5209):426-429.

20. Freeman JS: **Insulin Analog Therapy: Improving the Match With Physiologic Insulin Secretion** *J Am Osteopath Assoc* 2009, **109**:26-36.
21. Tengholm A: **Cyclic AMP dynamics in the pancreatic β -cell.** *Upsala Journal of Medical Sciences* 2012, **117**(4):355-369.
22. Rorsman P, Renstrom E: **Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells.** *Diabetologia* 2003, **46**(8):1029-1045.
23. Polonsky KS, Given BD, Van Cauter E: **Twenty-Four-Hour Profiles and Pulsatile Patterns of Insulin Secretion in Normal and Obese Subjects.** *J Clin Invest* February 1988, **81**:442-448.
24. ADA: **Standards of Medical Care in Diabetes--2013.** *Diabetes Care* 2013, **36**(Supplement_1):S11-S66.
25. ADA: **Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.** *Diabetes Care* 2010, **33**(Supplement_1):S62-S69.
26. Cowie CC, Rust KF, Byrd-Holt DD, Gregg EW, Ford ES, Geiss LS, Bainbridge KE, Fradkin JE: **Prevalence of Diabetes and High Risk for Diabetes Using A1C Criteria in the U.S. Population in 1988-2006.** *Diabetes Care* 2010, **33**(3):562-568.
27. Olson DE, Rhee MK, Herrick K, Ziemer DC, Twombly JG, Phillips LS: **Screening for Diabetes and Pre-Diabetes With Proposed A1C-Based Diagnostic Criteria.** *Diabetes Care* 2010, **33**(10):2184-2189.
28. Tang S, Zhang Q, Wang CJ, Tang HQ, Wu TX: **Glycosylated hemoglobin A1c for the diagnosis of diabetes mellitus: a meta-analysis.** *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2013, **52**(1):21-25.
29. * TECOTDACODM: **Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.** *Diabetes Care* 2003, **26**(S1):S5-S20.
30. Dabelea D, Pihoker C, Talton J, D'Agostino R, Fujimoto W, Klingensmith G, Lawrence JM, Linder B, Marcovina SM, Mayer-Davis E *et al*: **Etiological Approach to Characterization of Diabetes Type.** *Diabetes Care* 2011, **34**:1628-1633.
31. Atkinson M, Eisenbarth GS: **Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment.** *Lancet* 2001, **358**(9277):221-229.
32. Redondo MJ, Eisenbarth GS: **Genetic control of autoimmunity in Type I diabetes and associated disorders.** *Diabetologia* 2002, **45**:605-622.
33. Michael P. Morran, Omenn GS, Pietropaolo M: **Immunology and Genetics of Type 1 Diabetes.** *MOUNT SINAI JOURNAL OF MEDICINE* 2008, **75**:314-327.
34. Roep BO, Peakman M: **Antigen Targets of Type 1 Diabetes Autoimmunity.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2012, **2**(4):a007781-a007781.
35. Batstra MR, Pina M, Quan J, Mulder P, de Beaufort CE, Bruining GJ, Aanstoot HJ: **Fluctuations in GAD65 antibodies after clinical diagnosis of IDDM in young children.** *Diabetes Care* 1997, **20**(4):642-644.
36. Kobayashi T, Sawano S, Sugimoto T, Itoh T, Kosaka K, Tanaka T, Suwa S: **Islet-Cell Antibodies in IDDM and NIDDM in a Japanese Population.** *Tohoku J exp Med* 1983, **141**:271-274.
37. Dirice E, Kulkarni RN: **Pathways Underlying β -Cell Regeneration in Type 1, Type 2 and Gestational Diabetes.** *Chapter Category: Endocrine From the book Islet Cell Growth Factors.*
38. Gregory JM, Moore DJ, Simmons JH: **Type 1 Diabetes Mellitus.** *Pediatrics in Review* 2013, **34**:203-215.
39. Weir GC, Bonner-Weir S: **Five Stages of Evolving B-Cell Dysfunction During Progression to Diabetes.** *DIABETES* 2004, **53**(S3):S16-S21.
40. Pinhas-Hamiel O ZP: **Clinical presentation and treatment of type 2 diabetes in children.** *Pediatric Diabetes* 2007, **8**(Suppl. 9):16-27.

41. Harris MI KR, Welborn TA, Knuiman MW.: **Onset of NIDDM occurs at least 4-7 yr before clinical diagnosis.** *Diabetes Care* 1992, **15**(7):815-819.
42. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW: **Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy.** *Lancet* 2005, **365**(9467):1333-1346.
43. Song SH: **Emerging type 2 diabetes in young adults.** *Adv Exp Med Biol* 2012, **771**:51-61.
44. Cizza G, Brown RJ, Rothe KI: **Rising incidence and challenges of childhood diabetes. A mini review.** *J Endocrinol Invest* 2012, **35**(5):541-546.
45. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, Zinman B: **Medical Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Consensus Algorithm for the Initiation and Adjustment of Therapy: A consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes.** *Diabetes Care* 2009, **32**(1):193-203.
46. Collaboration TERF: **Diabetes Mellitus, Fasting Glucose, and Risk of Cause-Specific Death.** *N Engl J Med* 2011, **364**:829-841.
47. ADA: **Gestational Diabetes Mellitus.** *Diabetes Care* 2004, **27**(S1):S88-S90.
48. Simmons D: **"Epidemiology of diabetes in pregnancy," in Practical Management of Diabetes in Pregnancy.** McCance and M Maresh, Eds Blackwell Publishing, London, UK 2010.
49. Dabelea D: **The Predisposition to Obesity and Diabetes in Offspring of Diabetic Mothers.** *Diabetes Care* 2007, **30**(Supplement_2):S169-S174.
50. Vrachnis N, Antonakopoulos N, Iliodromiti Z, Dafopoulos K, Siristatidis C, Pappa KI, Deligeoroglou E, Vitoratos N: **Impact of Maternal Diabetes on Epigenetic Modifications Leading to Diseases in the Offspring.** *Experimental Diabetes Research* 2012, **2012**:1-6.
51. Cammidge PJ: **DIABETES MELLITUS AND HEREDITY.** *The British Medical Journal* 1928, **2**:738-741.
52. Fajans SS, Conn JW: **Tolbutamide-induced improvement in carbohydrate tolerance of young people with mild diabetes mellitus.** *Diabetes* 1960, **9**:83-88.
53. Tattersall RB: **Mild familial diabetes with dominant inheritance.** *Quarterly Journal of Medicine* 1974, **43**(2):339-357.
54. Tattersall RB, Fajans SS: **A difference between the inheritance of classical juvenile-onset and maturity-onset type diabetes of young people.** *Diabetes* 1975, **24**(1):44-53.
55. Murphy R, Ellard S, Hattersley AT: **Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes.** *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008, **4**(4):200-213.
56. Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS: **Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young.** *N Engl J Med* 2001, **345**(13):971-980.
57. Ledermann HM: **Is maturity onset diabetes at young age (MODY) more common in Europe than previously assumed?** *Lancet* 1995, **345**:648.
58. Velho G, Froguel P: **Genetic, metabolic and clinical characteristics of maturity onset diabetes of the young.** *Eur J Endocrinol* 1998 Mar, **138**(3):233-239.
59. Frayling TM, Evans JC, Bulman MP, Pearson E, Allen L, Owen K, Bingham C, Hannemann M, Shepherd M, Ellard S *et al*: **beta-cell genes and diabetes: molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors.** *Diabetes* 2001, **50 Suppl 1**:S94-100.
60. Frayling TM, Bulamn MP, Ellard S, Appleton M, Dronsfield MJ, Mackie AD, Baird JD, Kaisaki PJ, Yamagata K, Bell GI *et al*: **Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene are a common cause of maturity-onset diabetes of the young in the U.K.** *Diabetes* 1997, **46**(4):720-725.

61. Johansen A, Ek J, Mortensen HB, Pedersen O, Hansen T: **Half of Clinically Defined Maturity-Onset Diabetes of the Young Patients in Denmark Do Not Have Mutations in HNF4A, GCK, and TCF1.** *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2005, **90**(8):4607-4614.
62. Lopez AP, Foscaldi SA, Perez MS, Rodriguez M, Traversa M, Puchulu FM, Bergada I, Frechtel GD: **HNF1 alpha gene coding regions mutations screening, in a Caucasian population clinically characterized as MODY from Argentina.** *Diabetes Research and Clinical Practice* 2011, **91**(2):208-212.
63. Toaima D, Nake A, Wendenburg J, Praedicow K, Rohayem J, Engel K, Galler A, Gahr M, Lee-Kirsch MA: **Identification of novel GCK and HNF1A/TCF1 mutations and polymorphisms in German families with maturity-onset diabetes of the young (MODY).** *Human Mutation* 2005, **25**(5):503-504.
64. Furuzawa GK, Giuffrida FM, Oliveira CS, Chacra AR, Dib SA, Reis AF: **Low prevalence of MODY2 and MODY3 mutations in Brazilian individuals with clinical MODY phenotype.** *Diabetes Res Clin Pract* 2008, **81**(3):e12-14.
65. Lorini R, Klersy C, d'Annunzio G, Massa O, Minuto N, Iafusco D, Bellanne-Chantelot C, Frongia AP, Toni S, Meschi F *et al*: **Maturity-Onset Diabetes of the Young in Children With Incidental Hyperglycemia:: A multicenter Italian study of 172 families.** *Diabetes Care* 2009, **32**(10):1864-1866.
66. Skupien J, Gorczynska-Kosiorz S, Klupa T, Cyganek K, Wanic K, Borowiec M, Sieradzki J, Malecki MT: **Molecular background and clinical characteristics of HNF1A MODY in a Polish population.** *Diabetes & Metabolism* 2008, **34**(5):524-528.
67. Eide SA, Raeder H, Johansson S, Midthjell K, Sovik O, Njolstad PR, Molven A: **Prevalence of HNF1A (MODY3) mutations in a Norwegian population (the HUNT2 Study).** *Diabet Med* 2008, **25**(7):775-781.
68. Gilliam LK, Pihoker C, Ellard S, Hattersley AT, Dabelea D, Davis C, Dolan LM, Greenbaum CJ, Imperatore G, Lawrence JM *et al*: **Prevalence, Characteristics and Clinical Diagnosis of Maturity Onset Diabetes of the Young Due to Mutations in HNF1A, HNF4A, and Glucokinase: Results from the SEARCH for Diabetes in Youth.** *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2013.
69. Estalella I, Rica I, Perez de Nanclares G, Bilbao JR, Vazquez JA, San Pedro JJ, Busturia MA, Castano L: **Mutations in GCK and HNF-1alpha explain the majority of cases with clinical diagnosis of MODY in Spain.** *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007, **67**(4):538-546.
70. Yorifuji T, Fujimaru R, Hosokawa Y, Tamagawa N, Shiozaki M, Aizu K, Jinno K, Maruo Y, Nagasaka H, Tajima T *et al*: **Comprehensive molecular analysis of Japanese patients with pediatric-onset MODY-type diabetes mellitus.** *Pediatric Diabetes* 2012 Feb, **13**(1):26-32.
71. Xu JY, Dan QH, Chan V, Wat NMS, Tam S, Tiu SC, Lee KF, Siu SC, Tsang MW, Fung LM *et al*: **Genetic and clinical characteristics of maturity-onset diabetes of the young in Chinese patients.** *European Journal of Human Genetics* 2004, **13**(4):422-427.
72. Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, Fajans SS, Signorini S, Stoffel M, Bell GI: **Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1).** *Nature* 1996, **384**(6608):458-460.
73. Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF: **Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1.** *Nat Genet* 1997, **17**(2):138-139.
74. Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN, Lindner T, Yamagata K, Ogata M, Tomonaga O *et al*: **Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY.** *Nat Genet* 1997, **17**(4):384-385.
75. Malecki MT, Jhala US, Antonellis A, Fields L, Doria A, Orban T, Saad M, Warram JH, Montminy M, Krolewski AS: **Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus.** *Nat Genet* 1999, **23**(3):323-328.

76. Neve B, Fernandez-Zapico ME, Ashkenazi-Katalan V, Dina C, Hamid YH, Joly E, Vaillant E, Benmezroua Y, Durand E, Bakaher N *et al*: **Role of transcription factor KLF11 and its diabetes-associated gene variants in pancreatic beta cell function.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(13):4807-4812.
77. Raeder H, Johansson S, Holm PI, Haldorsen IS, Mas E, Sbarra V, Nermoen I, Eide SA, Grevle L, Bjorkhaug L *et al*: **Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction.** *Nat Genet* 2006, **38**(1):54-62.
78. Plengvidhya N, Kooptiwut S, Songtawee N, Doi A, Furuta H, Nishi M, Nanjo K, Tantibhedhyangkul W, Boonyasrisawat W, Yenchitsomanus PT *et al*: **PAX4 mutations in Thais with maturity onset diabetes of the young.** *J Clin Endocrinol Metab* 2007, **92**(7):2821-2826.
79. Molven A, Ringdal M, Nordbo AM, Raeder H, Stoy J, Lipkind GM, Steiner DF, Philipson LH, Bergmann I, Aarskog D *et al*: **Mutations in the insulin gene can cause MODY and autoantibody-negative type 1 diabetes.** *Diabetes* 2008, **57**(4):1131-1135.
80. Borowiec M, Liew CW, Thompson R, Boonyasrisawat W, Hu J, Mlynarski WM, El Khattabi I, Kim SH, Marselli L, Rich SS *et al*: **Mutations at the BLK locus linked to maturity onset diabetes of the young and beta-cell dysfunction.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(34):14460-14465.
81. Online Mendelian Inheritance in Man O: **Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: {606391}: {09/21/2010}: . World Wide Web URL: <http://omim.org/>.**
82. Stride A, Vaxillaire M, Tuomi T, Barbetti F, Njolstad PR, Hansen T, Costa A, Conget I, Pedersen O, Sovik O *et al*: **The genetic abnormality in the beta cell determines the response to an oral glucose load.** *Diabetologia* 2002, **45**(3):427-435.
83. Ellard S, Bellanné-Chantelot C, Hattersley AT: **Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young.** *Diabetologia* 2008, **51**(4):546-553.
84. Velho PFA: **Molecular Genetics of Maturity-onset Diabetes of the Young.** *TEM* 1999, **10**(4):142-146.
85. Winter WE, Silverstein JH: **Molecular and genetic bases for maturity onset diabetes of youth.** *Current Opinion in Pediatrics* 2000, **12**:388-393.
86. Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, Southam L, Cox RD, Lathrop GM, Boriraj VV *et al*: **Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3).** *Nature* 1996, **384**(6608):455-458.
87. Vaxillaire M: **Anatomy of a Homeoprotein Revealed by the Analysis of Human MODY3 Mutations.** *Journal of Biological Chemistry* 1999, **274**(50):35639-35646.
88. Ryffel GU: **Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences.** *J Mol Endocrinol* 2001 Aug, **27**(1):11-29.
89. Kuo CJ, Conley PB, Hsieh CL, Francke U, Crabtree GR: **Molecular cloning, functional expression, and chromosomal localization of mouse hepatocyte nuclear factor 1.** *Proc Naid Acad Sci USA* December 1990, **87**:9838-9842.
90. Baumhueter S, Mendel DB, Conley PB, Kuo CJ, Turk C, Graves MK, Edwards CA, Courtois G, Crabtree GR: **HNF-1 shares three sequence motifs with the POU domain proteins and is identical to LF-B1 and APF** *Genes & Development* 1990, **4**:372-379.
91. Awa WL, Thon A, Raile K, Grulich-Henn J, Meissner T, Schober E, Holl RW: **Genetic and clinical characteristics of patients with HNF1A gene variations from the German-Austrian DPV database.** *European Journal of Endocrinology* 2011, **164**(4):513-520.

92. Odom DT: **Control of Pancreas and Liver Gene Expression by HNF Transcription Factors.** *Science* 2004, **303**(5662):1378-1381.
93. Bach I, Yaniv M: **More potent transcriptional activators or a transdominant inhibitor of the HNF1 homeoprotein family are generated by alternative RNA processing.** *EMBO J* 1993, **12**(11):4229-4242.
94. Harries LW, Ellard S, Stride A, Morgan NG, Hattersley AT: **Isomers of the TCF1 gene encoding hepatocyte nuclear factor-1 alpha show differential expression in the pancreas and define the relationship between mutation position and clinical phenotype in monogenic diabetes.** *Hum Mol Genet* 2006, **15**(14):2216-2224.
95. Ellard S, Colclough K: **Mutations in the genes encoding the transcription factors hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1A) and 4 alpha (HNF4A) in maturity-onset diabetes of the young.** *Hum Mutat* 2006 Sep, **27**(9):854-869.
96. Ellard S, Thomas K, Edghill EL, Owens M, Ambye L, Cropper J, Little J, Strachan M, Stride A, Ersoy B *et al*: **Partial and whole gene deletion mutations of the GCK and HNF1A genes in maturity-onset diabetes of the young.** *Diabetologia* 2007, **50**(11):2313-2317.
97. Kaisaki P, Menzel S, Lindner T, Oda N, Rjasanowski I, Sahm J, Meincke G, Schulze J, Schmechel H, Petzold C *et al*: **Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in MODY and early-onset NIDDM: evidence for a mutational hotspot in exon 4.** *Diabetes* 1997, **46**(3):528-535.
98. Yamagata K, Yang Q, Yamamoto K, Iwahashi H, Miyagawa J, Okita K, Yoshiuchi I, Miyazaki J, Noguchi T, Nakajima H *et al*: **Mutation P291fsinsC in the Transcription Factor Hepatocyte Nuclear Factor- 1 is Dominant Negative.** *Diabetes* 1998, **47**:1231-1235.
99. Harries LW, Hattersley AT, Ellard S: **Messenger RNA Transcripts of the Hepatocyte Nuclear Factor-1 α Gene Containing Premature Termination Codons Are Subject to Nonsense-Mediated Decay.** *Diabetes* 2004, **53**:500-504.
100. Thomas H, Badenbergh B, Bulman M, Lemm I, Lausen J, Kind L, Roosen S, Ellard S, Hattersley A, Ryffel G: **Evidence for haploinsufficiency of the human HNF1alpha gene revealed by functional characterization of MODY3-associated mutations.** *Biol Chem* 2002, **383**(11):1691-1700.
101. Pearson ER VG, Clark P, Stride A, Shepherd M, Frayling TM, Bulman MP, Ellard S, Froguel P, Hattersley AT.: **beta-cell genes and diabetes: quantitative and qualitative differences in the pathophysiology of hepatic nuclear factor-1alpha and glucokinase mutations.** *Diabetes* 2001, **50**(Suppl 1):101-107.
102. Bellanne-Chantelot C, Levy DJ, Carette C, Saint-Martin C, Riveline JP, Larger E, Valero R, Gautier JF, Reznik Y, Sola A *et al*: **Clinical characteristics and diagnostic criteria of maturity-onset diabetes of the young (MODY) due to molecular anomalies of the HNF1A gene.** *J Clin Endocrinol Metab* 2011, **96**(8):E1346-1351.
103. Pontoglio M PD, Cheret C, Doyen A, Leroy C, Froguel P, Velho G, Yaniv M, Friedlander G.: **HNF1alpha controls renal glucose reabsorption in mouse and man.** *EMBO Rep* 2000, **4**:359-365.
104. Menzel R, Kaisaki PJ, Rjasanowski I, Heinke P, Kerner W, Menzel S: **A low renal threshold for glucose in diabetic patients with a mutation in the hepatocyte nuclear factor-1alpha (HNF-1alpha) gene.** *Diabet Med* 1998, **15**(10):816-820.
105. Yagihashi S, Gloyn AL, Faber JH, Malmodyn D, Thanabalasingham G, Lam F, Ueland PM, McCarthy MI, Owen KR, Baunsgaard D: **Metabolic Profiling in Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) and Young Onset Type 2 Diabetes Fails to Detect Robust Urinary Biomarkers.** *PLoS One* 2012, **7**(7):e40962.
106. Freitas HS, Anhe GF, Melo KFS, Okamoto MM, Oliveira-Souza M, Bordin S, Machado UF: **Na⁺-Glucose Transporter-2 Messenger Ribonucleic Acid Expression in Kidney of**

- Diabetic Rats Correlates with Glycemic Levels: Involvement of Hepatocyte Nuclear Factor-1 Expression and Activity.** *Endocrinology* 2007, **149**(2):717-724.
107. Lambert AP, Ellard S, Allen LI, Gallen IW, Gillespie KM, Bingley PJ, Hattersley AT: **Identifying hepatic nuclear factor 1alpha mutations in children and young adults with a clinical diagnosis of type 1 diabetes.** *Diabetes Care* 2003, **26**(2):333-337.
 108. Møller AM, Dalgaard LT, Pociot F, Nerup J, Hansen T, Pedersen O: **Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in Caucasian families originally classified as having Type I diabetes.** *Diabetologia* 1998, **41**(12):1528-1531.
 109. Velho G, Vaxillaire M, Boccio V, Charpentier G, Froguel P: **Diabetes complications in NIDDM kindreds linked to the MODY3 locus on chromosome 12q.** *Diabetes Care* 1996, **19**(9):915-919.
 110. Isomaa B, Henricsson M, Lehto M, Forsblom C, Karanko S, Sarelin L, Häggblom M, Groop L: **Chronic diabetic complications in patients with MODY3 diabetes.** *Diabetologia* 1998, **41**:467-473.
 111. Chiche L, Dao T, Salame E, Galais MP, Bouvard N, Schmutz G, Rousselot P, Bioulac-Sage PB, Segol P, Gignoux M: **Liver Adenomatosis: Reappraisal, Diagnosis, and Surgical Management: Eight New Cases and Review of the Literature.** *ANNALS OF SURGERY* 2000, **231**(1):74-81.
 112. Bluteau O, Jeannot E, Bioulac-Sage P, Marqués JM, Blanc JF, Bui H, Beaudoin JC, Franco D, Balabaud C, Laurent-Puig P *et al*: **Bi-allelic inactivation of TCF1 in hepatic adenomas.** *Nature Genetics* 2002, **32**:312-315.
 113. Foster JH, Donohue TA, Berman MM: **Familial Liver-Cell Adenomas and Diabetes Mellitus.** *N Engl J Med* 1978, **299**:239-241.
 114. Bacq Y, Jacquemin E, Balabaud C, Jeannot E, Scotto B, Branchereau S, Laurent C, Bourlier P, Pariente D, De Muret A *et al*: **Familial Liver Adenomatosis Associated With Hepatocyte Nuclear Factor 1α Inactivation.** *GASTROENTEROLOGY* 2003, **125**:1470-1475.
 115. Lerario AM, Brito LP, Mariani BM, Fragoso MCBV, Machado MACM, Teixeira R: **A missense TCF1 mutation in a patient with mody-3 and liver adenomatosis.** *CLINICS* 2010, **65**(10):1059-1060.
 116. Reznik Y DT, Coutant R, Chiche L, Jeannot E, Clauin S, Rousselot P, Fabre M, Oberti F, Fatome A, Zucman-Rossi J, Bellanne-Chantelot C.: **Hepatocyte Nuclear Factor-1α Gene Inactivation: Cosegregation between Liver Adenomatosis and Diabetes Phenotypes in Two Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY)3 Families.** *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004, **89**(3):1476-1480.
 117. Nakamura A, Ishidu K, Tajima T: **Early Onset of Liver Steatosis in a Japanese Girl with Maturity-Onset Diabetes of the Young Type 3 (MODY3)** *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2012 2012, **4**(2):104-106.
 118. Pelletier L, Rebouissou S, Paris A, Rathahao-Paris E, Perdu E, Bioulac-Sage P, Imbeaud S, Zucman-Rossi J: **Loss of hepatocyte nuclear factor 1α function in human hepatocellular adenomas leads to aberrant activation of signaling pathways involved in tumorigenesis.** *Hepatology* 2010, **51**(2):557-566.
 119. Jeannot E, Mellottee L, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Scoazec J, Tran Van Nhieu J, Bacq Y, Michalak S, Buob D, Laurent-Puig P *et al*: **Spectrum of HNF1A somatic mutations in hepatocellular adenoma differs from that in patients with MODY3 and suggests genotoxic damage.** *Diabetes* 2010 Jul, **59**(7):1826-1844.
 120. Bellanne-Chantelot C, Carette C, Riveline JP, Valero R, Gautier JF, Larger E, Reznik Y, Ducluzeau PH, Sola A, Hartemann-Heurtier A *et al*: **The type and the position of HNF1A mutation modulate age at diagnosis of diabetes in patients with maturity-onset diabetes of the young (MODY)-3.** *Diabetes* 2008, **57**(2):503-508.

121. Shields BM, McDonald TJ, Ellard S, Campbell MJ, Hyde C, Hattersley AT: **The development and validation of a clinical prediction model to determine the probability of MODY in patients with young-onset diabetes.** *Diabetologia* 2012, **55**(5):1265-1272.
122. Pearson ER, Liddell WG, Shepherd M, Corral RJ, Hattersley AT: **Sensitivity to sulphonylureas in patients with hepatocyte nuclear factor-1alpha gene mutations: evidence for pharmacogenetics in diabetes.** *Diabet Med* 2000, **17**(7):543-545.
123. Sovik O, Njolstad P, Folling I, Sagen J, Cockburn BN, Bell GI: **Hyperexcitability to sulphonylurea in MODY3.** *Diabetologia* 1998, **41**(5):607-608.
124. Pearson ER, Starkey BJ, Powell RJ, Gribble FM, Clark PM, Hattersley AT: **Genetic cause of hyperglycaemia and response to treatment in diabetes.** *Lancet* 2003, **362**(9392):1275-1281.
125. Shepherd M, Pearson ER, Houghton J, Salt G, Ellard S, Hattersley AT: **No deterioration in glycemic control in HNF-1alpha maturity-onset diabetes of the young following transfer from long-term insulin to sulphonylureas.** *Diabetes Care* 2003, **26**(11):3191-3192.
126. Shepherd M, Shields B, Ellard S, Rubio-Cabezas O, Hattersley AT: **A genetic diagnosis of HNF1A diabetes alters treatment and improves glycaemic control in the majority of insulin-treated patients.** *Diabet Med* 2009, **26**(4):437-441.
127. Shepherd M, Hattersley AT: **'I don't feel like a diabetic any more': the impact of stopping insulin in patients with maturity onset diabetes of the young following genetic testing.** *Clin Med* 2004, **4**(2):144-147.
128. **DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis.** *Applied Biosystems Chemistry Guide Second Edition.*
129. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR: **A method and server for predicting damaging missense mutations.** *Nat Methods* 2010, **7**(4):248-249.
130. Kumar P, Henikoff S, Ng PC: **Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm.** *Nat Protoc* 2009, **4**(7):1073-1081.
131. Sunyaev SR: **Inferring causality and functional significance of human coding DNA variants.** *Hum Mol Genet* 2012, **21**(R1):R10-17.
132. Galler A, Stange T, Muller G, Nake A, Vogel C, Kapellen T, Bartelt H, Kunath H, Koch R, Kiess W *et al*: **Incidence of childhood diabetes in children aged less than 15 years and its clinical and metabolic characteristics at the time of diagnosis: data from the Childhood Diabetes Registry of Saxony, Germany.** *Horm Res Paediatr* 2010, **74**(4):285-291.
133. Schober E, Rami B, Grabert M, Thon A, Kapellen T, Reinehr T, Holl RW: **Phenotypical aspects of maturity-onset diabetes of the young (MODY diabetes) in comparison with Type 2 diabetes mellitus (T2DM) in children and adolescents: experience from a large multicentre database.** *Diabetic Medicine* 2009, **26**(5):466-473.
134. Sancak O, Nellist M, Goedbloed M, Elfferich P, Wouters C, Maat-Kievit A, Zonnenberg B, Verhoef S, Halley D, van den Ouweland A: **Mutational analysis of the TSC1 and TSC2 genes in a diagnostic setting: genotype--phenotype correlations and comparison of diagnostic DNA techniques in Tuberous Sclerosis Complex.** *Eur J Hum Genet* 2005, **13**(6):731-741.
135. Khoo KL, van Acker P, Defesche JC, Tan H, van de Kerkhof L, Heijnen-van Eijk SJ, Kastelein JJ, Deslypere JP: **Low-density lipoprotein receptor gene mutations in a Southeast Asian population with familial hypercholesterolemia.** *Clin Genet* 2000, **58**(2):98-105.

136. Morelli A, Falchetti A, Martinetti V, Becherini L, Mark M, Friedman E, Brandi ML: **MEN1 gene mutation analysis in Italian patients with multiple endocrine neoplasia type 1.** *Eur J Endocrinol* 2000, **142**(2):131-137.
137. Westburg: **Chemical gradients such as those used in DGGE are not asreproducible, are difficult to establish and often do not completely resolveheteroduplexes.** 2001.
138. Sivagurunathan.P: **Temperature gradient gel electrophoresis.** 2009.
139. Ranen NG, Stine OC, Abbott MH, Sherr M, Codori AM, Franz ML, Chao NI, Chung AS, Pleasant N, Callahan C *et al*: **Anticipation and instability of IT-15 (CAG)_n repeats in parent-offspring pairs with Huntington disease.** *Am J Hum Genet* 1995, **57**(3):593-602.
140. Tsuji S: **Molecular genetics of triplet repeats: unstable expansion of triplet repeats as a new mechanism for neurodegenerative diseases.** *Intern Med* 1997, **36**(1):3-8.
141. Smith CP, Dunger DB, Williams AJ, Taylor AM, Perry LA, Gale EA, Preece MA, Savage MO: **Relationship between insulin, insulin-like growth factor I, and dehydroepiandrosterone sulfate concentrations during childhood, puberty, and adult life.** *J Clin Endocrinol Metab* 1989, **68**(5):932-937.
142. Hindmarsh P, Di Silvio L, Pringle PJ, Kurtz AB, Brook CG: **Changes in serum insulin concentration during puberty and their relationship to growth hormone.** *Clin Endocrinol (Oxf)* 1988, **28**(4):381-388.
143. Livingstone C, Collison M: **Sex steroids and insulin resistance.** *Clin Sci (Lond)* 2002, **102**(2):151-166.
144. Homan Y, Schober E, Rami B: **Infantile presentation of MODY 3 diabetes.** *J Pediatr Endocrinol Metab* 2006 Nov, **19**(11):1359-1362.
145. Hattersley AT: **Maturity-onset diabetes of the young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity.** *Diabet Med* 1998, **15**(1):15-24.
146. Borg H, Marcus C, Sjoblad S, Fernlund P, Sundkvist G: **Islet cell antibody frequency differs from that of glutamic acid decarboxylase antibodies/IA2 antibodies after diagnosis of diabetes.** *Acta Paediatr* 2000, **89**(1):46-51.
147. Bowden SA, Hoffman RP: **Triple diabetes: coexistence of type 1 diabetes mellitus and a novel mutation in the gene responsible for MODY3 in an overweight adolescent.** *Pediatr Diabetes* 2008, **9**(2):162-164.
148. Urbanova J, Rypackova B, Kucera P, Andel M, Heneberg P: **Should the negativity for islet cell autoantibodies be used in a prescreening for genetic testing in maturity-onset diabetes of the young? The case of autoimmunity-associated destruction of pancreatic beta-cells in a family of HNF1A-MODY subjects.** *Int Arch Allergy Immunol* 2013, **161**(3):279-284.
149. Kimpimaki T, Kulmala P, Savola K, Kupila A, Korhonen S, Simell T, Ilonen J, Simell O, Knip M: **Natural history of beta-cell autoimmunity in young children with increased genetic susceptibility to type 1 diabetes recruited from the general population.** *J Clin Endocrinol Metab* 2002, **87**(10):4572-4579.
150. Knip M, Korhonen S, Kulmala P, Veijola R, Reunanen A, Raitakari OT, Viikari J, Akerblom HK: **Prediction of type 1 diabetes in the general population.** *Diabetes Care* 2010, **33**(6):1206-1212.
151. McDonald TJ, Colclough K, Brown R, Shields B, Shepherd M, Bingley P, Williams A, Hattersley AT, Ellard S: **Islet autoantibodies can discriminate maturity-onset diabetes of the young (MODY) from Type 1 diabetes.** *Diabet Med* 2011 Sept, **28**(9):1028-1033.
152. LaGasse JM, Brantley MS, Leech NJ, Rowe RE, Monks S, Palmer JP, Nepom GT, McCulloch DK, Hagopian WA: **Successful prospective prediction of type 1 diabetes in schoolchildren through multiple defined autoantibodies: an 8-year follow-up of**

- the Washington State Diabetes Prediction Study.** *Diabetes Care* 2002, **25**(3):505-511.
153. Docena MK, Faiman C, Stanley CM, Pantalone KM: **MODY-3: Novel HNF1A Mutation and the Utility of Glucagon-Like Peptide (GLP)-1 Receptor Agonist Therapy.** *Acta Diabetol* 2012 Oct, **49**(5):349-354.

9. Περίληψη

Το φάσμα των μεταλλάξεων του γονιδίου *HNF1A* στον ελληνικό πληθυσμό με MODY3: σχετική συχνότητα και περιγραφή επτά καινούριων μεταλλάξεων

Εισαγωγή: Ο ΣΔτMODY είναι ο συχνότερος τύπος μονογονιδιακού διαβήτη και αφορά το 1-2 % όλου του διαβητικού πληθυσμού. Η σχετική συχνότητα του ΣΔτMODY3 είναι υψηλή στις Ευρωπαϊκές χώρες, αν και στοιχεία για τον ελληνικό πληθυσμό δεν είναι διαθέσιμα. Ο στόχος της μελέτης ήταν ο καθορισμός της σχετικής συχνότητας του ΣΔτMODY3 στην Ελλάδα, του είδους των μεταλλάξεων που παρατηρούνται και της συσχέτισής τους με το φαινότυπο των ασθενών.

Σχεδιασμός και Μέθοδοι: Τριακόσιοι ενενήντα πέντε (395) ασθενείς παραπέμφθηκαν στο εργαστήριό μας σε διάρκεια 15 ετών. Με τη εφαρμογή της μεθόδου DGGE σε δείγματα πολλαπλασιασμένα με PCR, ανιχνεύθηκαν 72 ασθενείς με μεταλλάξεις του γονιδίου *GCK* (MODY2) και 8 με μετάλλαξη του γονιδίου *HNF1A* (MODY3). Με την χρήση αυστηρών κριτηρίων, 54 επιπλέον ασθενείς επιλέχθηκαν για περαιτέρω διερεύνηση του γονιδίου *HNF1A* με τη μέθοδο της απευθείας αλληλούχησης ή της μεθόδου MLPA.

Αποτελέσματα: Σε 16 μη συγγενείς ασθενείς και 13 συγγενείς τους, ανιχνεύθηκαν 15 διαφορετικές μεταλλάξεις του γονιδίου *HNF1A*. Οκτώ από αυτές έχουν περιγραφεί προηγουμένως, ενώ οι επτά ήταν καινούριες. Τα κλινικά χαρακτηριστικά, όπως η ηλικία διάγνωσης του διαβήτη ή η σοβαρότητα της νόσου, δεν σχετίζονταν με το είδος της μετάλλαξης ή τη θέση της στο γονίδιο.

Συμπεράσματα: Στην ομάδα των ασθενών μας που πληρούσαν τα αυστηρά κλινικά κριτήρια για MODY, 12% έφεραν μετάλλαξη του γονιδίου *HNF1A*, υποδεικνύοντας ότι διαταραχές του γονιδίου είναι υπεύθυνες για σημαντικό ποσοστό μονογονιδιακού διαβήτη στον ελληνικό πληθυσμό. Δεν διαπιστώθηκε σαφής συσχέτιση φαινοτύπου-γονοτύπου.

10. Αγγλική Περίληψη

Objective: Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) is the most common type of monogenic diabetes accounting for 1–2% of the population with diabetes. The relative incidence of HNF1A-MODY (MODY3) is high in European countries; however, data are not available for the Greek population. The aims of this study were to determine the relative frequency of MODY3 in Greece, the type of the mutations observed, and their relation to the phenotype of the patients.

Design and methods: Three hundred ninety-five patients were referred to our center because of suspected MODY during a period of 15 yr. The use of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of polymerase chain reaction amplified DNA revealed 72 patients carrying Glucokinase gene mutations (MODY2) and 8 patients carrying HNF1A gene mutations (MODY3). After using strict criteria, 54 patients were selected to be further evaluated by direct sequencing or by multiplex ligation probe amplification (MLPA) for the presence of HNF1A gene mutations.

Results: In 16 unrelated patients and 13 of their relatives, 15 mutations were identified in the HNF1A gene. Eight of these mutations were previously reported, whereas seven were novel. Clinical features, such as age of diabetes at diagnosis or severity of hyperglycemia, were not related to the mutation type or location.

Conclusions: In our cohort of patients fulfilling strict clinical criteria for MODY, 12% carried an HNF1A gene mutation, suggesting that defects of this gene are responsible for a significant proportion of monogenic diabetes in the Greek population. No clear phenotype–genotype correlations were identified.

Original Article

The spectrum of *HNF1A* gene mutations in Greek patients with MODY3: relative frequency and identification of seven novel germline mutations

Tatsi C, Kanaka-Gantenbein C, Vazeou-Gerassimidi A, Chrysis D, Delis D, Tentolouris N, Dacou-Voutetakis C, Chrousos GP, Sertedaki A.
The spectrum of *HNF1A* gene mutations in Greek patients with MODY3: relative frequency and identification of seven novel germline mutations. *Pediatric Diabetes* 2013.

Objective: Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) is the most common type of monogenic diabetes accounting for 1–2% of the population with diabetes. The relative incidence of *HNF1A*-MODY (MODY3) is high in European countries; however, data are not available for the Greek population. The aims of this study were to determine the relative frequency of MODY3 in Greece, the type of the mutations observed, and their relation to the phenotype of the patients.

Design and methods: Three hundred ninety-five patients were referred to our center because of suspected MODY during a period of 15 yr. The use of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of polymerase chain reaction amplified DNA revealed 72 patients carrying Glucokinase gene mutations (MODY2) and 8 patients carrying *HNF1A* gene mutations (MODY3). After using strict criteria, 54 patients were selected to be further evaluated by direct sequencing or by multiplex ligation probe amplification (MLPA) for the presence of *HNF1A* gene mutations.

Results: In 16 unrelated patients and 13 of their relatives, 15 mutations were identified in the *HNF1A* gene. Eight of these mutations were previously reported, whereas seven were novel. Clinical features, such as age of diabetes at diagnosis or severity of hyperglycemia, were not related to the mutation type or location.

Conclusions: In our cohort of patients fulfilling strict clinical criteria for MODY, 12% carried an *HNF1A* gene mutation, suggesting that defects of this gene are responsible for a significant proportion of monogenic diabetes in the Greek population. No clear phenotype–genotype correlations were identified.

Christina Tatsi^a, Christina Kanaka-Gantenbein^a, Adriani Vazeou-Gerassimidi^b, Dionysios Chrysis^c, Dimitrios Delis^b, Nikolaos Tentolouris^d, Catherine Dacou-Voutetakis^a, George P Chrousos^a and Amalia Sertedaki^a

^aDivision of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, First Department of Pediatrics, Athens University School of Medicine, 'Agia Sophia' Children's Hospital, Athens, Greece; ^bDiabetes Center, P. & A. Kyriakou Children's Hospital, Athens, Greece; ^cDepartment of Pediatrics, Division of Endocrinology, University of Patras School of Medicine, Rio, Greece; and ^dFirst Department of Propaedeutic and Internal Medicine, Athens University Medical School, Laiko General Hospital, Athens, Greece

Key words: MODY diabetes – monogenic diabetes – MODY3 – *HNF1A* gene

Corresponding author: Amalia Sertedaki, PhD, Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, First Department of Pediatrics, University of Athens School of Medicine, 'Agia Sophia' Children's Hospital, Thivon & Livadias Street, 11527-Athens, Greece.
Tel: +30 210 7467475,
+306932-416686;
fax: +30 211 7700062;
e-mail: aserted@med.uoa.gr

Introduction

Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY), first described in 1973 by Tattersall and Fajans, is considered the most frequent form of monogenic diabetes (1–3). It is estimated that approximately 1–2% of the population with diabetes has MODY (4). The basic criteria for the diagnosis of MODY are as follows: early onset of symptoms (<25 yr), non-insulin dependence, autosomal dominant inheritance, and absence of pancreatic autoantibodies (5, 6). According to the Online Mendelian Inheritance in Man database (MIM No 606391), pathologic mutations in 11 genes have been described in various MODY subtypes (*HNF4A*-MODY1, *GCK*-MODY2, *HNF1A*-MODY3, *PDX1*-MODY4, *HNF1B*-MODY5, *NEUROD1*-MODY6, *KLF11*-MODY7, *CEL*-MODY8, *PAX4*-MODY9, *INS*-MODY10, and *BLK*-MODY11), whereas cases of as yet unknown genetic derangement have been classified as MODY-X (7). The relative frequency of each type varies among different studies, mainly because of different recruitment criteria used. *HNF1A* mutations have been identified in 7–52% of MODY patients, with an estimated highest prevalence in Great Britain (8–13).

HNF1A gene mutations were first identified as the cause of MODY3 in 1996 (14). The *HNF1A* gene resides in chromosome 12, and encodes a 631 amino acid protein, which acts as a homeodomain-containing transcription factor expressed in pancreatic islet β -cells, liver, intestine and kidney. In pancreatic β -cells, the *HNF1A* gene plays an important role in the transcription of genes involved in insulin secretion, glucose (GLUT2) and amino acid transport and synthesis of some mitochondrial enzymes (15). The exact molecular defect in *HNF1A* deficient β -cells has not been fully elucidated. It is rather the result of failure of a broad cell-specific program than an abnormality of a specific biological pathway (16).

While the rodent *Hnf1a* gene encodes a single isoform of the protein, the human gene encodes three isoforms (A, B, and C) produced by differential splicing and alternate poly-adenylation sites (17, 18). Studies have shown that the products of transcripts B and C have fivefold greater activity than that of transcript A. Although all three isoforms are usually concurrently expressed in different tissues, isoform A is predominant in fetal pancreas, liver, and kidneys, whereas isoform B is highly expressed in adult pancreas (18, 19).

More than 200 mutations of the *HNF1A* gene causing impaired β -cell function have been described so far (20). The age at onset and the severity of the disease

vary widely, even among members of the same family, carrying the same mutation (21–23). The variable expression has been attributed to environmental mechanisms and/or additional genetic defects (24–26).

Despite the plethora of data concerning MODY3 patients and the efforts to establish screening methods to distinguish these patients from the population with diabetes, such as inappropriate glycosuria, C-peptide, and CRP levels, as well as the absence of specific islet autoantibodies (27–31), patients with MODY3 are frequently misdiagnosed as type 1 (T1D) or type 2 (T2D) diabetes mellitus, leading to inappropriate treatment and reduced quality of life of the affected individuals (32–34).

In Greece, there is no study on the prevalence of MODY. In this study, we provide data on the relative frequency of MODY3 and the spectrum of mutations in Greek patients with a phenotype indicative of MODY. A possible genotype–phenotype correlation was also investigated.

Patients and methods

Patients

Three hundred ninety-five patients were referred for genetic analysis to the Laboratory of Molecular Endocrinology, Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, First Department of Pediatrics, University of Athens School of Medicine, ‘Agia Sophia’ Children’s Hospital, for suspected MODY over a period of 15 yr (from January 1996 to June 2011). The criteria for referral by the caring physician were primarily mild hyperglycemia at an early age.

Initially all patients were screened for MODY2 and MODY3 by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). Through this process eight patients were identified as MODY3. Since this number was small, compared to other European population data, it was suspected that our screening technique was giving false-negative results. Consequently, the available medical records of our patients were re-examined and, after excluding the patients with a glucokinase (GCK) mutation ($n = 72$), 54 patients were found to fulfill the following criteria in order to be further investigated: (i) diabetes mellitus (DM) [fasting glucose > 126 mg/dL (6.99 mmol/L) or a 2 h-value > 200 mg/dL (11.1 mmol/L) on an oral glucose tolerance test (OGTT)], (ii) family history of diabetes (one parent with DM or impaired glucose tolerance), and (iii) patient or at least one of the affected family members had early onset of diabetes <25 yr. Six of the 54 patients

were included based mainly on their family history and glucose values, although the age at diagnosis was higher than that specified by the criteria set above (26–50 yr old). Since the autoantibody status of the patients was only available for a few patients ($n = 14$), this characteristic was not included in the selection criteria for genetic testing. One patient was referred to the laboratory after the incidental detection of hepatic adenomas (HA) along with hereditary diabetes and, as she fulfilled the criteria for MODY3, she was included in the study.

The study was approved by the 'Aghia Sophia' Children's Hospital Committee on the Ethics of Human Research and informed consent to carry out genetic analysis was obtained from each patient or his legal guardian.

Methods

DNA extraction

DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes employing either the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) or the Maxwell[®] 16 Instrument for automated DNA extraction (Promega, Madison, WI, USA).

Screening for HNF1A gene mutations by DGGE and Sequencing

The 10 exons of the *HNF1A* gene were polymerase chain reaction amplified and screened for the presence of mutations by DGGE. The samples exhibiting abnormal electrophoretic pattern compared to control samples underwent sequencing of the exon in which this pattern was observed. The samples of patients with a negative DGGE result, fulfilling the strict criteria for MODY, were further studied by sequencing the 10 exons, exon–intron boundaries, and the promoter region (707 nucleotides upstream from the first start codon) of the *HNF1A* gene. Sequencing was performed employing the Big Dye Terminator V1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on an ABI 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems). The sequencing results were analyzed using the program CHROMAS 2.33 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia).

Multiplex ligation probe amplification

When no mutation was detected by sequencing, the samples were subsequently submitted to multiplex ligation probe amplification (MLPA) analysis. For the MLPA analysis, the commercially available SALSA MLPA KIT P241-B1 MODY (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands) was used. This kit

contains 42 probes specific for *HNF4A*, *GCK*, *HNF1A*, and *HNF1B* genes. The MLPA results were analyzed employing the program GENEMARKER[®] V1.95 (SoftGenetics, LLC, State College, PA, USA).

In silico prediction programs

For the novel missense mutations, two *in silico* programs were used to predict the impact of the amino acid change on the protein function: POLYPHEN-2 (Polymorphism Phenotyping v2) and SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant). The POLYPHEN-2 program assumes that a substitution is not tolerated when the HumVar score is close to 1, and the SIFT program predicts that a substitution is damaging when the SIFT score is ≤ 0.05 and the Median Information Content is between 2.75 and 3.5 (35, 36).

Statistical analysis

The statistical analysis was performed employing the IBM SPSS v.20 program (IBM Corporation, USA). Because of the small size of the sample, the relation of the age and the glucose levels at diagnosis with the location of the mutation was analyzed with the nonparametric Mann–Whitney *U* test, which does not require normal distribution of the data. The same test was also used to compare the age and glucose levels at diagnosis of the patients diagnosed as MODY3, with the remaining patients of our cohort without a recognized molecular defect. The comparison of the treatment regimen of the patients according to the localization of the mutation was performed with the chi-squared test. The nonparametric Wilcoxon-signed rank test was used to compare the age at diagnosis of the patients with MODY3 with the respective value of their parents. The values are reported as mean $\pm$ SD, unless otherwise indicated. It is worth noting that because of the small size of the sample in most cases the results were not statistically significant. However, this could be explained by either the true absence of any difference or by the fact that the power of our sample was not sufficient to reveal it.

Results

Fifteen different mutations of the *HNF1A* gene were identified in 16 unrelated patients and 13 of their relatives (parents, grandparents, and offspring). When all patients fulfilling the clinical and biochemical criteria of MODY (72 patients recognized as MODY2 and 62 patients of this study, total number of patients $n = 134$) were included, the relative frequency of MODY3 was 12%.

The characteristics of the patients with *HNF1A* mutations are summarized in Table 1. The mean

age at diagnosis ($\pm$ SD) was 14.4 yr ($\pm$ 6.7), (range: 4 months to 24 yr). Mean fasting glucose at diagnosis was 177.5 mg/dL (9.9 mmol/L) ($\pm$ 53.1), while the mean 2 h values for glucose and insulin after OGTT were 226.4 mg/dL (12.4 mmol/L) ($\pm$ 77.9) and 24.6 mIU/L ($\pm$ 31.3), respectively. The mean hemoglobin A1c (HbA1c) value at diagnosis was 6.6% ($\pm$ 1.9). A positive diabetes family history was present in three ($n=9$) or two ($n=7$) consecutive generations. The age at diagnosis of the parents was usually older than that of their offspring. However, these values showed no statistically significant difference. One patient, although included because of her family history, was found to have a *de novo* mutation. None of the six patients included in this study because of their family history of diabetes, older than 25 yr at onset, carried an *HNF1A* mutation. The youngest patient of our cohort presented at the age of 4 months during a respiratory infection. On follow-up, his blood glucose values subsequently fell below 150 mg/dL (8.3 mmol/L) for 4 yr, with progressive deterioration later on, reaching again high glucose measurements (up to 180 mg/dL to 10 mmol/L).

Out of the 15 mutations detected, 8 were identified by DGGE and 7 after sequencing the *HNF1A* gene. Three of the mutations missed by DGGE were missense and four were small deletions/insertions. The mutations detected in the Greek population, seven of which were novel, are illustrated in Fig. 1 and summarized in Table 2.

Overall, there were eight missense mutations, two nonsense, two in-frame deletions, and three small deletions/insertions resulting in frameshifts. The mutation G292fs, the most frequently encountered mutation in other populations (37), was detected only once in this study (6%). No gross deletion/insertion of the *HNF1A* gene was detected by MLPA, although deletions and duplications of either *HNF1B* or *HNF4A* genes were detected in three patients.

The majority of the mutations ($n=10$) detected was located in the DNA-binding domain, whereas five were in the transactivation domain. No mutation was detected in the promoter region of the gene or in exon 1, which encodes the dimerization domain. Eleven of the 15 mutations were located in exons 2, 3, and 4. No mutation was detected in exons 8–10, which encode only isoform A. Only two mutations were detected in exon 7, encoding specifically isoforms A and B, without affecting isoform C, while the 13 remaining mutations were in exons 2–6 encoding all three isoforms (Fig. 1).

The two novel missense mutations, p.A161P and p.W165R, are located in exon 2. These mutations were not detected in 50 control samples. The detection of these mutations in the diabetic parents of our patients strengthened the possibility that their phenotype was due to the mutation detected.

The mutation p.A161P is novel; however, another substitution on the same amino acid (p.A161W) was reported earlier and was also detected in one of our patients (11). The p. A161P was detected in a female patient with diabetes since the age of 14 and her mother. The patient has been treated with low doses of sulfonylureas with good glycemic control. She also presented with premature ovarian failure. The possible connection between these two rare entities is under investigation (38).

The substitution p.W165R has been reported previously as a somatic mutation detected in a tumor sample of a patient with HA (39). It was detected in a female patient classified as T1D since the age of 8 and placed on insulin treatment with poor glycemic control before the molecular diagnosis of MODY3. Subsequently, she was switched to sulfonylureas and achieved good glycemic control (HbA1c: 6%). This patient was also overweight, with a body mass index (BMI) of 24.3 at the age of 14 (>85th percentile). Her diabetic mother was unavailable for genetic testing.

The mutations p.A161P and p.W165R underwent *in silico* analysis and were found to be 'Probably Damaging' by the POLYPHEN-2 program (HumVar scores: 0.997 and 1.0, respectively) and as 'Damaging' by the SIFT program (score: 0.01 and 0, respectively, Median Information Content: 2.83 for both). The conservation analysis among species suggested that Ala161 and Trp165 are highly conserved amino acids. The same conclusion was presented by Ryffel (40), who studied the conservation of the *HNF1A* protein among different species, and described that the aminoacids A161 and W165 are located in a highly conserved region of the *HNF1A* gene (40).

The novel nonsense mutation p.Q401X is probably leading to mRNA transcripts containing a premature stop codon. Such transcripts are probable to be subjected to nonsense-mediated decay, an mRNA surveillance mechanism that detects and degrades transcripts containing premature stop codon (41, 42). The index case was a female patient with DM since the age of 13, originally presented with mild fasting hyperglycemia but markedly increased 2 h-OGTT blood glucose levels (322 mg/dL to 17.9 mmol/L) and decreased serum insulin levels (maximum value 10 mIU/L). This mutation was not detected in her mother, who reportedly had elevated fasting glucose levels, or her father, who was euglycemic, and was therefore considered as *de novo* mutation.

Two novel small deletions were detected, the p.E228del and the p.E275del, both resulting in an in-frame deletion, disrupting the DNA-binding domain. The first was detected in a female diabetic patient who had also multiple HA and her diabetic mother (43).

MODY3 characteristics in the Greek population

Table 1. Clinical and biochemical characteristics of the 16 patients with *HNF1A* mutations

Characteristic	Mean $\pm$ SD	Median	Range
Age at diagnosis, yr (n = 16)	14.4 $\pm$ 6.7	15	0.3–24
Fasting glucose at diagnosis, mg/dL (n = 15)	177.5 $\pm$ 53.1	164	100–300
Glucose 2 h after an OGTT, mg/dL (n = 9)	226.4 $\pm$ 77.9	192	144–368
Fasting Insulin at diagnosis, ng/mL (n = 6)	6.4 $\pm$ 3.4	5.75	3–12
Insulin 2 h after an OGTT in ng/mL (n = 6)	24.6 $\pm$ 31.3	14.1	6–87.4
Hemoglobin A1c at diagnosis, % (n = 7)	6.6 $\pm$ 1.9	6.7	4.1–9.1
Treatment (n = 13)	Insulin: 2 Insulin and OHA: 1 OHA: 6 None or diet: 4		
Gender	Male: 7 (44%) Female: 9 (56%)		
Parent affected	Father: 5 (31%) Mother: 10 (63%) <i>De novo</i> : 1 (6%)		
Birth weight, g (n = 12)	3555.8 $\pm$ 854.9	3525	1870–4900

n, the number of affected patients for whom the described variable is available; OGTT, oral glucose tolerance test; OHA, oral hypoglycemic agent.

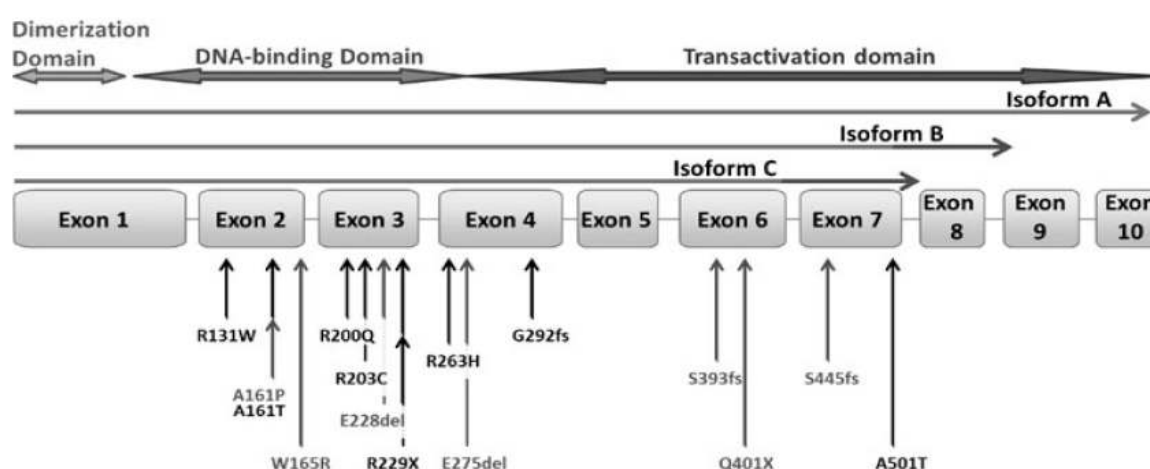


Fig. 1. Illustration of the *HNF1A* gene showing the 10 exons of the gene, the isoforms and the domains of the protein, and the 15 mutations detected in the Greek population. Boxes denote the exons of the gene. Lines above exons denote the isoforms of the protein, red part of the line indicates different amino acid sequence. Arrows above isoform lines denote the domains of the protein. Black and red arrows indicate the location of the 15 mutations detected in the Greek patients (black arrows indicate mutations previously reported, red arrows indicate novel mutations).

Finally two novel small deletions causing frameshifts were detected; the p.S393fs and the p.S445fs, both disrupting the transactivation domain.

To study the genotype–phenotype correlations, we compared the age of diabetes onset and the fasting glucose at diagnosis, with the domain and the isoform affected. When the age and the mean fasting glucose at diagnosis were compared to the position of the mutation, it was found that patients with a mutation in the DNA-binding domain had a mean age of diabetes onset of 13.9 y (± 6.5) and a mean glucose level at onset of 185.6 mg/dL (10.3 mmol/L) (± 59.1), whereas patients with a mutation in the transactivation domain had a mean age at onset of 15.4 yr (± 7.8) and a mean glucose level at onset of 161.4 mg/dL (8.96 mmol/L) (± 39). No statistically significant difference was found between these values (*p*-value = 0.644 and 0.594, respectively). Patients with mutations affecting all three isoforms had a mean age at diagnosis of 14.8 yr (± 6.3) and a mean glucose level of 177.7 mg/dL (9.9 mmol/L)

(± 57.1), whereas patients with mutations affecting only isoforms A and B had a younger mean age at diagnosis of 11.5 yr (± 12) and a mean glucose level of 176.5 mg/dL (9.8 mmol/L) (± 17.7). These values, however, did not differ significantly (*p*-value = 0.858 and 0.800, respectively). The patients' age at diagnosis for nonsense, missense, and frame shift mutations and deletions were 11.5 (± 1.76), 14.41 (± 2.61), 14.67 (± 6), and 18 (± 2.83) yr, respectively, while the corresponding glucose values at diagnosis were 236.33 (± 31.94), 171.62 (± 16.7), 144.67 (± 22.21), and 147 mg/dL. This could not be statistically analyzed, because of the small size of the respective groups (Table 3).

The age and the glucose levels at diagnosis of the patients, who were not found to carry a mutation of the *HNF1A* gene, were also compared with the respective values of the patients diagnosed as MODY3. The three patients recognized as MODY1 and MODY5 were excluded. The mean age and glucose value at diagnosis for the remaining patients of our cohort were

Table 2. Mutations detected in the Greek population

Nucleotide change	c.391C>T	c.481G>A	c.481G>C	c.493T>C	c.599G>A	c.607C>T	c.682-684 delGAG	c.685C>T	c.788G>A	c.824-826 delAAG	c.872dupC	c.1177delT	c.1201C>T	c.1331-1332 delAG	c.1501G>A
AA change	R131W	A161T	A161P*	W165R*	R200Q	R203C	E228del*	R229X	R263H	E275del	G292fs	S393fs*	Q401X*	S445fs*	A501T
Type of mutation	Missense	Missense	Missense	Missense	Missense	Missense	Deletion	Nonsense	Missense	Deletion	Frameshift	Frameshift	Nonsense	Frameshift	Missense
Domain affected	DB	DB	DB	DB	DB	DB	DB	DB	DB	DB	TD	TD	TD	TD	TD
Isoforms affected	A, B, C	A, B, C	A, B, C	A, B, C	A, B, C	A, B, C	A, B, C	A, B, C	A, B, C	A, B, C	A, B, C	A, B, C	A, B, C	A, B	A, B
Age (yr) at diagnosis	18	14	14	8	0.3	17	16	8/13.5	24	20	18	23	13	3	20
Fasting glucose (mg/dL) at diagnosis	150	160	220	153	256	170	NR	300/254	100	147	200	125	209	189	164
No. of patients	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
Method of detection	Sequencing	DGGE	Sequencing	DGGE	DGGE	DGGE	DGGE	DGGE	Sequencing	Sequencing	Sequencing	Sequencing	DGGE	Sequencing	DGGE

*Novel mutation.

16.3 (± 10.3) yr and 223.6 (± 93.3) mg/dL, respectively. These values were not significantly different (p -value = 0.761 and 0.153, respectively).

Discussion

This study is the first to investigate the spectrum of MODY3 mutations among clinically suspected cases of MODY in the Greek population. Among patients fulfilling strict clinical criteria for MODY, the frequency of MODY3 was 12% (16/134), underscoring the importance of ascertaining the phenotype of suspected cases based on criteria set prior to genetic analysis. Fifteen different mutations were identified, 7 of which were novel. This is in accordance with the large number of different mutations in MODY3 patients that have been detected in various populations, a fact that allows their description as 'private mutations' (20). The location of the mutation on the gene was related neither to the age at diagnosis nor the initial fasting glucose levels.

The relative frequency of MODY3 in our cohort of MODY diabetics (12%) is close to that found in the French (21%) and Italian (6.9-14%) populations, but low compared to the UK MODY3 frequency (52%) (8–11, 13–15).

The phenotype of MODY3 patients is variable with regard to the age at diagnosis, and the clinical progress of the disease, frequently leading to misdiagnosis. It has also been reported that patients even within the same family may present with variable phenotypes. In our cohort, the age at onset ranged from 4 months to 24 yr, the younger person affected in a family being usually diagnosed at an earlier age than the affected parent, although the difference was not statistically significant. This observation could be explained either by a more severe phenotype in subsequent generations (anticipation) or, more probably, by the increased awareness and concern of the parents leading to the earlier evaluation of their children, even when asymptomatic.

The age at onset of MODY in general is <25 yr, but for MODY3 specifically, the clinical manifestations usually appear during puberty, a state of inherent insulin resistance and increased insulin needs due to the elevation of sex steroids and growth hormone (44). The patient described in our cohort diagnosed at the age of 4 months during a respiratory tract infection, is to our knowledge the youngest patient ever diagnosed with MODY3. This very young patient presented with diabetes at the age of 4 months during a respiratory infection. However, the patient's blood glucose values subsequently normalized post-infection for at least 4 yr, before becoming raised again. It is therefore possible that the initial presentation was stress-induced hyperglycemia caused by the infection

MODY3 characteristics in the Greek population

Table 3. Age and blood glucose values at diagnosis according to the type and the location of the causative mutation (statistical analysis with Mann–Whitney *U* test)

		Age at diagnosis (yr)			Glucose at diagnosis (mg/dL)		
		Mean	SD	p-Value	Mean	SD	p-Value
Isoform affected	A, B and C	14.8	1.7	0.858	177.7	57.1	0.800
Type of mutation	A and B	11.5	8.5	NA	176.5	17.7	NA
	Missense	14.4	2.6		171.6	47.2	
	Nonsense	11.5	1.8		236.3	55.3	
	Frameshift	14.7	6.0		144.7	38.5	
	Deletion	18.0	2.0		147.0	—	
Domain affected	DNA-binding domain	13.9	2.0	0.644	185.6	59.1	0.594
	Transactivation domain	15.4	3.5		161.4	39.0	

NA, not analyzed.

and in the absence of a positive family history for MODY he would probably not be checked for MODY in such a young age. Hence, either the mutation he carried (p.R200Q) was responsible for a more severe defect or the increased metabolic needs during the concurrent infection disclosed the underlying β -cell dysfunction earlier. Interestingly, the only other infant with MODY3 described in the literature also presented at the age of 1, during an upper respiratory tract infection (45). It is noteworthy, that the mother of our patient was diagnosed with diabetes at the age of 17, and his maternal grandmother at the age of 31.

The fasting glucose levels at diagnosis in our patients varied greatly from normal to 300 mg/dL (16.7 mmol/L), suggesting variable degree of β -cell impairment, which was not age-related. As in other reports, variability was also observed with respect to the treatment regimens of our patients. Although information on treatment schedule was not available for all our patients, some of them achieved good glycemic control on insulin therapy, while others received only oral insulin secretagogues or no medical treatment at all. Some of the patients on insulin therapy admitted non-compliance with insulin doses.

Genetic diagnosis of MODY3 is of utmost importance, since upon diagnosis several patients can be switched to sulfonylureas thus improving their compliance, preventing microvascular complications which are common in MODY3, and most importantly ameliorating their quality of life (32, 46). The critical question in patients with non-autoimmune DM is how to select candidates for genetic testing and hence identify the type of MODY, which is crucial for appropriate diabetes management. In our cohort, only a small minority of patients had their islet autoantibody status tested. The criteria thus far applied for the diagnosis are primarily the age at onset and the autosomal dominant inheritance. Two studies reported predictive models based on age, BMI, number of affected generations, presence of diabetes symptoms, and geographical region (47, 48). A more recent study revealed

that widening the diagnostic criteria for MODY genetic testing doubled the number of MODY cases identified in young adult-onset type 2 diabetes (31). A study of 196 patients with *HNF1A* mutations, 40% of the patients presented at age >25 yr and 45% of them reported diabetes in two or three generations (47). In our cohort, none of the six patients with age at diabetes onset >25 yr carried a mutation and all of them had a positive family history of two or three generations. Given the predicted frequency of MODY3 of 12% in our Greek population it is not surprising that none of the six tested patients with age at diabetes onset of >25 yr and a positive family history was found to bear an *HNF1A* mutation. Certainly larger cohorts of patients with positive family history even with age at diabetes onset of >25 yr have to be tested in order to provide a better estimate of the real incidence of MODY3 among such cases. Therefore, family history irrespective of age at diagnosis remains an important criterion.

Although phenotype–genotype correlation has been investigated in several studies, a small number of them reported statistically significant correlations. Harries et al. found that patients bearing mutations located in exons 8–10 (affecting only isoform A) presented with diabetes 12 yr later than the remaining patients, while Bellane-Chantelot et al. reported that mutations' type and location could affect the age of diabetes presentation (18, 49). However, in a recent study, age at onset and fasting glucose levels at diagnosis did not show differences according to the type of mutation, the isoform, or the domain affected, whereas the mode of treatment was influenced by the type of the mutation and the domain affected (23). However, it has to be retained that therapeutic regimen can also be influenced by other factors, such as preferential treatment options of the prescribing physician or adherence to the treatment of the patient.

Thus such an investigation of phenotype–genotype correlation according to the therapeutic regimen was not performed in our population. In our study, we could not demonstrate any statistically significant

phenotype–genotype correlation. However, this might be due to the relatively small number of patients examined.

In summary, we present a study on *HNF1A* gene mutations – MODY3 – in a cohort of Greek patients suspected to have MODY. The initial screening was undertaken by DGGE, but this method had a significantly high false-negative rate. Sequencing analysis is therefore the best method for screening large cohorts for disease causing mutations in MODY genes. Of our patients categorized by strict criteria as MODY, 12% carried an *HNF1A* gene mutation, suggesting that the possibility of identifying MODY3 is significant with appropriate selection of patients. Seven novel germline mutations of the *HNF1A* gene were identified. Our patients had a wide spectrum of phenotypes, which is consistent with the literature, as well as specific characteristics, like very early age of onset. The identification of the molecular defect is of outmost importance for long-term treatment and prognosis.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr Eleni Anastasiou and Dr Konstantinos Makrilakis for referring patients for molecular testing and to Dr Evangelia Charmandari for reviewing the manuscript and for suggesting additional statistical analysis. This work was supported by the Bodossaki Foundation, Athens, Greece.

Disclosure Statement

The authors have nothing to disclose.

References

1. TATTERSALL RB, FAJANS SS. A difference between the inheritance of classical juvenile-onset and maturity-onset type diabetes of young people. *Diabetes* 1975; 24: 44–53.
2. TATTERSALL RB. Mild familial diabetes with dominant inheritance. *Q J Med* 1974; 43: 339–357.
3. LEDERMANN HM. Is maturity onset diabetes at young age (MODY) more common in Europe than previously assumed? *Lancet* 1995; 345: 648.
4. MURPHY R, ELLARD S, HATTERSLEY AT. Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008; 4: 200–213.
5. FAJANS SS, BELL GI, POLONSKY KS. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med* 2001; 345: 971–980.
6. ELLARD S, BELLANNÉ-CHANTELLOT C, HATTERSLEY AT. Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia* 2008; 51: 546–553.
7. Online Mendelian Inheritance in Man O. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 606391; 09/21/2010. World Wide Web (available from <http://omim.org/>).

8. LORINI R, KLERSY C, D'ANNUNZIO G et al. Maturity-onset diabetes of the young in children with incidental hyperglycemia: a multicenter Italian study of 172 families. *Diabetes Care* 2009; 32: 1864–1866.
9. TOAIMA D, NAKE A, WENDENBURG J et al. Identification of novel GCK and HNF1A/TCF1 mutations and polymorphisms in German families with maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Hum Mutat* 2005; 25: 503–504.
10. JOHANSEN A, EK J, MORTENSEN HB, PEDERSEN O, HANSEN T. Half of clinically defined maturity-onset diabetes of the young patients in Denmark do not have mutations in HNF4A, GCK, and TCF1. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 4607–4614.
11. CHEVRE JC, HANI EH, BOUTIN P et al. Mutation screening in 18 Caucasian families suggest the existence of other MODY genes. *Diabetologia* 1998; 41: 1017–1023.
12. SHIELDS BM, HICKS S, SHEPHERD MH, COLCLOUGH K, HATTERSLEY AT, ELLARD S. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing? *Diabetologia* 2010; 53: 2504–2508.
13. FRAYLING TM, BULAMN MP, ELLARD S et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene are a common cause of maturity-onset diabetes of the young in the U.K. *Diabetes* 1997; 46: 720–725.
14. YAMAGATA K, ODA N, KAISAKI PJ et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* 1996; 384: 455–458.
15. ODOM DT. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 2004; 303: 1378–1381.
16. SERVITJA JM, PIGNATELLI M, MAESTRO MA et al. Hnf1alpha (MODY3) controls tissue-specific transcriptional programs and exerts opposed effects on cell growth in pancreatic islets and liver. *Mol Cell Biol* 2009 Jun; 29: 2945–2959.
17. HARRIES LW, BROWN JE, GLOYN AL. Species-specific differences in the expression of the HNF1A, HNF1B and HNF4A genes. *PLoS One* 2009; 4: e7855.
18. HARRIES LW, ELLARD S, STRIDE A, MORGAN NG, HATTERSLEY AT. Isoforms of the TCF1 gene encoding hepatocyte nuclear factor-1 alpha show differential expression in the pancreas and define the relationship between mutation position and clinical phenotype in monogenic diabetes. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 2216–2224.
19. BACH I, YANIV M. More potent transcriptional activators or a transdominant inhibitor of the HNF1 homeoprotein family are generated by alternative RNA processing. *EMBO J* 1993; 12: 4229–4242.
20. ELLARD S, COLCLOUGH K. Mutations in the genes encoding the transcription factors hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1A) and 4 alpha (HNF4A) in maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mutat* 2006 Sep; 27: 854–869.
21. MIEDZIBRODZKA Z, HATTERSLEY AT, ELLARD S et al. Non-penetrance in a MODY 3 family with a mutation in the hepatic nuclear factor 1alpha gene: implications for predictive testing. *Eur J Hum Genet* 1999; 7: 729–732.
22. FRAYLING TM, EVANS JC, BULMAN MP et al. beta-cell genes and diabetes: molecular and clinical

- characterization of mutations in transcription factors. *Diabetes* 2001; 50 (Suppl. 1): S94–S100.
23. AWA WL, THON A, RAILE K et al. Genetic and clinical characteristics of patients with HNF1A gene variations from the German-Austrian DPV database. *Eur J Endocrinol* 2011; 164: 513–520.
24. KLUPA T, WARRAM JH, ANTONELLIS A et al. Determinants of the development of diabetes (maturity-onset diabetes of the young-3) in carriers of HNF-1alpha mutations: evidence for parent-of-origin effect. *Diabetes Care* 2002 Dec; 25: 2292–2301.
25. LANGO ALLEN H, JOHANSSON S, ELLARD S et al. Polygenic risk variants for type 2 diabetes susceptibility modify age at diagnosis in monogenic HNF1A diabetes. *Diabetes* 2009; 59: 266–271.
26. STRIDE A, SHEPHERD M, FRAYLING TM, BULMAN MP, ELLARD S, HATTERSLEY AT. Intrauterine hyperglycemia is associated with an earlier diagnosis of diabetes in HNF-1alpha gene mutation carriers. *Diabetes Care* 2002 Dec; 25: 2287–2291.
27. McDONALD TJ, COLCLOUGH K, BROWN R et al. Islet autoantibodies can discriminate maturity-onset diabetes of the young (MODY) from type 1 diabetes. *Diabet Med* 2011; 28: 1028–1033.
28. MENZEL R, KAISAKI PJ, RJASANOWSKI I, HEINKE P, KERNER W, MENZEL S. A low renal threshold for glucose in diabetic patients with a mutation in the hepatocyte nuclear factor-1alpha (HNF-1alpha) gene. *Diabet Med* 1998; 15: 816–820.
29. STRIDE A, ELLARD S, CLARK P et al. Beta-cell dysfunction, insulin sensitivity, and glycosuria precede diabetes in hepatocyte nuclear factor-1alpha mutation carriers. *Diabetes Care* 2005; 28: 1751–1756.
30. BESSER RE, SHEPHERD MH, McDONALD TJ et al. Urinary C-peptide creatinine ratio is a practical outpatient tool for identifying hepatocyte nuclear factor 1-{alpha}/hepatocyte nuclear factor 4-{alpha} maturity-onset diabetes of the young from long-duration type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2011; 34: 286–291.
31. THANABALASINGHAM G, SHAH N, VAXILLAIRE M et al. A large multi-centre European study validates high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) as a clinical biomarker for the diagnosis of diabetes subtypes. *Diabetologia* 2011; 54: 2801–2810.
32. SHEPHERD M, SHIELDS B, ELLARD S, RUBIO-CABEZAS O, HATTERSLEY AT. A genetic diagnosis of HNF1A diabetes alters treatment and improves glycaemic control in the majority of insulin-treated patients. *Diabet Med* 2009; 26: 437–441.
33. LAMBERT AP, ELLARD S, ALLEN LI et al. Identifying hepatic nuclear factor 1alpha mutations in children and young adults with a clinical diagnosis of type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 333–337.
34. MÖLLER AM, DALGAARD LT, POCIOT F, NERUP J, HANSEN T, PEDERSEN O. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in Caucasian families originally classified as having type I diabetes. *Diabetologia* 1998; 41: 1528–1531.
35. ADZHUBEI IA, SCHMIDT S, PESHKIN L et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010; 7: 248–249.
36. KUMAR P, HENIKOFF S, NG PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 2009; 4: 1073–1081.
37. KAISAKI PJ, MENZEL S, LINDNER T et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in MODY and early-onset NIDDM: evidence for a mutational hotspot in exon 4. *Diabetes* 1997; 46: 528–535.
38. TATSI C, SERTEDAKI A, VOUTETAKIS A, KONSTANTINIDOU A, KANAKA-GANTENBEIN C, DACOU-VOUTETAKIS C. Premature ovarian failure (POF) and diabetes caused by mutation in HNF1A gene in an adolescent. Related or coincidental events? *Horm Res* 2011; 76 (Suppl. 2): 72.
39. JEANNOT E, MELLOTTÉE L, BIOULAC-SAGE P et al. Spectrum of HNF1A somatic mutations in hepatocellular adenoma differs from that in patients with MODY3 and suggests genotoxic damage. *Diabetes* 2010 Jul; 59: 1826–1844.
40. RYFFEL GU. Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. *J Mol Endocrinol* 2001; 27: 11–29.
41. HARRIES LW, HATTERSLEY AT, ELLARD S. Messenger RNA transcripts of the hepatocyte nuclear factor-1α gene containing premature termination codons are subject to nonsense-mediated decay. *Diabetes* 2004; 53: 500–504.
42. HARRIES LW, BINGHAM C, BELLANNE-CHANTELOT C, HATTERSLEY AT, ELLARD S. The position of premature termination codons in the hepatocyte nuclear factor –1 beta gene determines susceptibility to nonsense-mediated decay. *Hum Genet* 2005; 118: 214–224.
43. VRYONIS E, SERTEDAKI A, TSAOUSIS G et al. HNF1A mutations in patient with MODY3, liver adenomatosis and uterine leiomyomas. *Horm Res* 2008; 70 (Suppl. 1): 54.
44. GIUFFRIDA FM, REIS AF. Genetic and clinical characteristics of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes Obes Metab* 2005; 7: 318–326.
45. HOMAN Y, SCHÖBER E, RAMI B. Infantile presentation of MODY 3 diabetes. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2006 Nov; 19: 1359–1362.
46. PEARSON ER, STARKEY BJ, POWELL RJ, GRIBBLE FM, CLARK PM, HATTERSLEY AT. Genetic cause of hyperglycaemia and response to treatment in diabetes. *Lancet* 2003; 362: 1275–1281.
47. BELLANNE-CHANTELOT C, LEVY DJ, CARETTE C et al. Clinical characteristics and diagnostic criteria of maturity-onset diabetes of the young (MODY) due to molecular anomalies of the HNF1A gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: E1346–E1351.
48. NJØLSTAD PR, MØLVEN A. To test, or not to test: time for a MODY calculator? *Diabetologia* 2012 May; 55: 1231–1234.
49. BELLANNE-CHANTELOT C, CARETTE C, RIVELINE JP et al. The type and the position of HNF1A mutation modulate age at diagnosis of diabetes in patients with maturity-onset diabetes of the young (MODY)-3. *Diabetes* 2008; 57: 503–508.