

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. lékařská fakulta



GENETIKA MODY DIABETU

RNDr. Petra Dušátková

Praha 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Současně dávám svolení k tomu, aby tato závěrečná práce byla archivována v Ústavu vědeckých informací 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a zde užívána ke studijním účelům. Za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou přednáškovou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v Digitálním repozitáři Univerzity Karlovy v Praze (<http://repozitar.cuni.cz>). Práce je zpřístupněna pouze v rámci Univerzity Karlovy v Praze.

Souhlasím – Nesouhlasím

V Praze, 18.1.2012

Petra Dušátková

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. MUDr. Ondřeji Cinkovi, Ph.D. za skvělé vedení mé práce, kamarádský přístup, podporu a cenné rady.

MUDr. Štěpánce Průhové, Ph.D. a Bc. Kláře Veselé děkuji za bezchybnou spolupráci, povzbuzení a přátelskou atmosféru.

Dík patří i celému kolektivu Laboratoře molekulární genetiky za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Prof. MUDr. Janu Leblovi, CSc. bych chtěla poděkovat za cenné rady a přátelský přístup. Lékařům endokrinologického oddělení Pediatrické kliniky 2. lékařské fakulty a FN v Motole a všem spolupracujícím diabetologům a endokrinologům z celé České republiky děkuji za neúnavné vyhledávání rodin s podezřením na MODY diabetes.

Dizertační práce vznikala za finančního přispění grantů norského království prostřednictvím finančního mechanismu (CZ0100), interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví (IGA MZ NT11402) a Grantové agentury Univerzity Karlovy (GA UK 840/2010).

Obsah

Seznam zkratk	6
1. Úvod	8
1.1 Cíle dizertační práce	8
2. Literární přehled	9
2.1 Diabetes mellitus	9
2.1.1 Klasifikace	9
2.2 Genetické aspekty diabetu	10
2.2.1 Polygenně podmíněný diabetes	10
2.2.2 Monogenně podmíněný diabetes	10
2.3 MODY	12
2.3.1 Historie	12
2.3.2 Charakteristika	13
2.3.3 Výskyt	15
2.3.4 Funkce β buňky	16
2.4 GCK-MODY	17
2.4.1 Klinická charakteristika	17
2.4.2 Gen GCK a funkce proteinu	18
2.5 HNF1A-MODY	20
2.5.1 Klinická charakteristika	20
2.5.2 Gen HNF1A a funkce proteinu	21
2.6 HNF4A-MODY	23
2.6.1 Klinická charakteristika	23
2.6.2 Gen HNF4A a funkce proteinu	24
2.7 IPF1-MODY	25
2.7.1 Klinická charakteristika	25
2.7.2 Gen <i>IPF1A</i> a funkce proteinu	25
2.8 HNF1B-MODY	26
2.8.1 Klinická charakteristika	26
2.8.2 Gen HNF1B a funkce proteinu	27
2.9 NEUROD1-MODY	28
2.9.1 Klinická charakteristika	28
2.9.2 Gen NEUROD1 a funkce proteinu	28
2.10 KLF11-MODY	29
2.10.1 Klinická charakteristika	29

2.10.2 Gen KLF11 a funkce proteinu	29
2.11 CEL-MODY	30
2.11.1 Klinická charakteristika	30
2.11.2 Gen CEL a funkce proteinu	31
2.12 PAX4-MODY	31
2.12.1 Klinická charakteristika	32
2.12.2 Gen PAX4 a funkce proteinu	32
2.13 INS-MODY	33
2.13.1 Klinická charakteristika	33
2.13.2 Gen INS a funkce proteinu	34
2.14 BLK-MODY	35
2.14.1 Klinická charakteristika	35
2.14.2 Gen BLK a funkce proteinu.....	36
2.15 ABCC8-MODY	36
2.15.1 Klinická charakteristika	36
2.15.2 Gen ABCC8 a funkce proteinu.....	37
2.16 MODYX.....	37
3. Shrnutí genetického vyšetřování MODY.....	39
4. Vlastní publikace a rukopisy s komentáři.....	41
4.1 GCK-MODY nejčastějším subtypem v českém MODY registru	41
4.2 Efekt zakladatele prevalentních mutací v GCK.....	50
4.3 HNF1A-MODY s makrosomií a hypoglykemií	62
4.4 Analýza genu PAX4 u českých MODYX.....	66
4.5 Mutace v genu ABCC8 způsobující hyperglykémii.....	70
4.6 Makrovaskulární komplikace u GCK-MODY	75
4.7 Modifikátor GCK-MODY	86
5. Závěr.....	95
5.1 Směry dalšího výzkumu	96
6. Seznam citované literatury	98

Seznam zkratek

ABCC8	ATP-binding cassette C8
ATP	adenozin trifosfát
BETA2	beta-cell E-box transcriptional activator 2
BLK	B-lymfocyt kináza
BMI	body mass index
CEL	karboxyl ester lipáza
CELP	pseudogen karboxyl ester lipázy
CIMT	carotid intima-media thickness
CRE	cyclic AMP response element
CREB	cyclic AMP response element binding protein
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DEND	syndrom: nervové a vývojové opoždění, epilepsie a neonatální diabetes
dHPLC	denaturační vysokovýkonnostní kapalinová chromatografie
EIF2AK3	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3
EMQN	European molecular genetics quality network
FED	fecal elastase deficiency
FTO	fat mass and obesity-associated protein
G6PC2	katalytická glukóza 6 fostatáza
GCK	glukokináza
GCKR	regulátor glukokinázy
GLUT1	glukózový transportér 1
GLUT2	glukózový transportér 2
GWAS	genome wide association study
HbA _{1c}	glykovaný hemoglobin
HB-EGF	růstový faktor vázající heparin
HDL	high density lipoprotein
HLA	human leucocyte antigen, lidské leukocytární antigeny
HLH	helix loop helix
HNF1A	hepatocyte nuclear factor 1-alpha
HNF1B	hepatocyte nuclear factor 1-beta
HNF3B	hepatocyte nuclear factor 3-beta
HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4-alpha
IFCC	international federation of clinical chemistry

IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1
INS	inzulín
IPF1	insulin promoter factor 1
K _{ATP}	draselný ATP kanál
KCNJ11	ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 11
Kir6.2	inward rectifier channel
KLF11	krüppel-like factor 11
MELAS	myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke
MHC	major histocompatibility complex
MLPA	multiplex ligation probe-dependent amplification
MODY	maturity-onset diabetes of the young
MTNR1B	melatoninový receptor 1
NEUROD1	neurogenic differentiation 1, faktor neurogení diferenciací 1
Nkx6.1	NK homeobox, family 6, member A
oGTT	orální glukózový toleranční test
PAX4	paired box 4
PBX1	pre-B-cell leukemia homeobox 1
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDX1	pancreatic and duodenal homeobox 1
PNDM	permanentní neonatální diabetes
PPARG	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RCAD	renal cysts and diabetes, syndrom renálních cyst a diabetu
RW	Rinke-Wiegand
SD	směrodatná odchylka
SUR1	receptor sulfonylurey 1
T1DM	diabetes 1. typu
T2DM	diabetes 2. typu
TCF1	transcriptional factor 1
TCF7L2	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)
TGFβ	transforming growth factor beta
TMD0	transmembránový helix 0
TNDM	tranzientní neonatální diabetes
UTR	untranslated region, nepřekládaná oblast
VNTR	variable number tandem repeats
WFS1	wolframin

1. Úvod

Již několik desítek let je patrné, že diabetes mellitus není jedno onemocnění, ale zahrnuje v sobě celou řadu etiologicky i klinicky odlišných forem hyperglykémie. Nejběžnější formy diabetu mellitu, diabetes 1. typu a 2. typu, patří mezi multifaktoriální, polygenní onemocnění. Existují ovšem i další, mnohem vzácnější formy diabetu, které jsou způsobeny poruchou jediného genu a označují se proto termínem monogenní diabetes. Z forem monogenního diabetu je nejčastěji diagnostikován, zhruba u 1 až 2% všech pacientů s diabetem, MODY diabetes (Maturity-Onset Diabetes of the Young). MODY představuje heterogenní skupinu non inzulín-dependentního diabetu mellitu s časnou dobou diagnózy a autozomálně dominantním způsobem dědičnosti. Primární příčinou MODY je porucha funkce pankreatické β buňky.

Přesná diagnóza MODY je možná pouze na základě vyšetření genů zodpovědných za tento typ diabetu. Rychlý rozvoj molekulárně-genetických technik v minulých desetiletích umožnil nejen objev kauzálních genů pro MODY, ale rovněž dovolil zavedení přesného, relativně rychlého a levného rutinního testování genů u pacientů splňujících klinická kritéria MODY diabetu.

Tato dizertační práce je součástí projektu zabývajícího se komplexním studiem MODY v České republice, který zahrnuje vyhledávání českých rodin s MODY, genetickou diagnostiku, hodnocení klinických aspektů onemocnění, hlubší genetickou analýzu, vyšetřování a charakterizaci raritních forem MODY a podílí se na odhalení nových genů zodpovědných za MODY. Součástí dizertace je pět prací přijatých k publikaci a dva rukopisy, které jsou v současné době v recenzním řízení.

1.1 Cíle dizertační práce

Cíle dizertační práce byly:

- optimalizovat metodiku molekulárně-genetického vyšetřování genů způsobujících MODY pomocí metod přímého sekvenování a multiplex ligation probe-dependent amplification (MLPA)
- zavést molekulárně-genetickou diagnostiku raritních forem MODY a posoudit jejich výskyt v České republice s ohledem na genetické vyšetřování
- zkoumat příčiny vzniku prevalentních mutací v MODY genech
- analyzovat některé aspekty nejčastějšího subtypu MODY v České republice – GCK-MODY.

2. Literární přehled

2.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus označuje heterogenní skupinu chronických metabolických onemocnění, která jsou charakteristická hyperglykemií. Hyperglykémie je způsobena nedostatečnou až chybějící sekrecí inzulínu nebo jeho nedostatečným působením na okolní tkáň, popřípadě může být přítomna kombinace obou příčin. Mimo akutních komplikací je diabetes závažný zejména pro chronické komplikace, tj. následky hyperglykémie zahrnující mikrovaskulární komplikace (retinopatii, nefropatii a neuropatii) a makrovaskulární komplikace (progrese ischemické choroby srdeční, ischemická choroba dolních končetin) (shrnuto v ADA, 2011).

2.1.1 Klasifikace

Dřívější klasifikace diabetu byla založena především na způsobu léčby (ADA, 1979). Postupující vědecké poznání ukázalo, že jednotlivé typy diabetu se od sebe výrazně odlišují ve své patogenezi dané genetickými i environmentálními faktory, což vedlo ke změně rozdělení podtypů diabetu shrnutých v tabulce 1.

Tabulka 1. Klasifikace diabetu dle etiologie (upraveno dle ADA, 2011).

I. diabetes 1. typu	a. imunologicky podmíněný b. idiopatický
II. diabetes 2. typu	
III. ostatní specifické typy	a. genetické defekty funkce β buňky b. genetické defekty působení inzulínu c. nemoci exokrinního pankreatu d. endokrinopatie e. chemicky indukovaný diabetes f. infekce g. vzácné formy imunologicky podmíněného diabetu h. další genetické syndromy asociované s diabetem
IV. gestační diabetes	

Autoimunitní destrukce β buněk pankreatu vedoucí až k absolutní absenci inzulínu způsobuje diabetes 1. typu (T1DM), nejběžnější typ diabetu diagnostikovaný v dětství. U dospělých výrazně převažuje, celosvětově až z 90% (Rodriguez, 2002), diabetes 2. typu (T2DM). Diabetes 2. typu je charakteristický kombinací oslabení nebo porušení inzulínové sekrece a snížení citlivosti okolních tkání k inzulínu. Ostatní specifické typy diabetu zahrnují i genetické defekty funkce β buňky, tzn. monogenně podmíněné formy diabetu. Gestační diabetes je zařazen do zvláštní, čtvrté kategorie klasifikace. Jedná se o jakýkoli typ glukózové intolerance poprvé detekované během těhotenství (shrnutí v Škrha, 2009; Porter, 2005; ADA, 2011).

2.2 Genetické aspekty diabetu

2.2.1 Polygenně podmíněný diabetes

Diabetes 1. a 2. typu se řadí mezi multifaktoriální, polygenní onemocnění. Vliv genetické složky byl potvrzen na studiích monozygotních a dizygotních dvojčat s T1DM i T2DM (Kaprio, 1992).

Nejsilnější genetická asociace byla nalezena mezi T1DM a variantami v genech hlavního histokompatibilního komplexu (MHC), přesněji v genech pro lidské leukocytární antigeny (HLA) (Risch, 1989). Byla prokázána asociace i s polymorfizmy v okolí genu pro inzulín (Todd, 1995) a v dalších genech zapojených svými produkty například do diferenciaci β buňky (*NEUROD1*) (Davies, 1994), regulace signalizace T lymfocytů (*CTLA4*) (Nistico, 1996), regulace odpovědi na zánět pomocí T lymfocytů (*PTPN22*) (Bottini, 2006), nebo nově do rozpoznání virové RNA (*IFIH1*) (Smyth, 2006).

Celogenomové asociční studie (GWAS) výraznou měrou přispěly k objasnění významné části dědičnosti T2DM: v současné době je známo více než 20 genetických variant (například v genech *PPARG*, *TCF7L2*, *FTO*, *KCNJ11*, *HNF1A*, *HNF1B*, *HNF4A*) ovlivňujících především schopnost β buňky reagovat na vyšší nároky na sekreci inzulínu v důsledku nadváhy či inzulínové rezistence (shrnutí v Groop, 2009). Má se za to, že známé geny vysvětlují jen 10% genetického rizika T2DM.

2.2.2 Monogenně podmíněný diabetes

Existuje mnoho syndromů zahrnujících diabetes, které jsou způsobeny poruchou jediného genu. Odhaduje se, že přibližně 5% diabetu je monogenně podmíněno (Barrett, 2001). Nejčastěji se jedná o MODY diabetes (viz kapitola 2.3).

Dalšími subtypy monogenního diabetu jsou neonatální diabetes, mitochondriální diabetes a další syndromy.

Neonatální diabetes se projevuje hyperglykemií a nízkou hladinou inzulínu do 6 měsíců věku, i když se aktuálně diskutuje o posunutí věkové hranice na 9 měsíců (Rubio-Cabezas, 2011b). Britská studie (Shield, 1997) ve shodě s německou studií (von Muhlendahl, 1995) stanovily incidenci neonatálního diabetu na 1 z 400 000 živě narozených dětí. Přibližně 50% případů této diagnózy připadá na tranzientní neonatální diabetes (TNDM) (Polak, 2004), typ diabetu, který se obvykle objevuje spolu s intrauterinní růstovou retardací a zhruba do roka vymizí, aby se u většiny pacientů znovu manifestoval zejména v období puberty (Temple, 2000). Nejčastější příčinou TNDM je porucha imprintingu: byly detekovány paternální isodizomie chromozómu 6 a paternální duplikace regionu 6q24 (Temple, 1996). Druhým typem neonatálního diabetu je permanentní neonatální diabetes (PNDM). Příčinou onemocnění jsou u jedné třetiny až poloviny pacientů (Polak, 2004) heterozygotní mutace v genu *KCNJ11* kódujícího podjednotku draselného kanálu (Kir6.2), který je esenciální pro správné fungování β buňky (viz dále, kapitola 2.3.4). Fenotyp pacientů se odvíjí od konkrétní mutace v *KCNJ11*: u některých pacientů byl popsán tzv. DEND syndrom, komplexní onemocnění zahrnující nervové a vývojové opoždění, epilepsii a PNDM (Gloyn, 2004). PNDM může být způsoben i heterozygotními mutacemi v genu kódujícího druhou podjednotku draselného kanálu (*SUR1*) *ABCC8* (Babenko, 2006), heterozygotními nebo homozygotními mutacemi v genu pro inzulín (*INS*) (Stoy, 2007), homozygotními mutacemi v genu pro glukokinázu (*GCK*) (Njolstad, 2001), v genu pro transkripční faktory IPF1 (Stoffers, 1997b), Neurogenin3 (Rubio-Cabezas, 2011a) a *NEUROD1* (Rubio-Cabezas, 2010). Byly popsány i případy složených heterozygotů (Rubio-Cabezas, 2011a). Na případu neonatálního diabetu byl elegantně demonstrován přínos genetické diagnostiky k úspěšné farmakologické léčbě (farmakogenetika): u pacientů s mutacemi v genech kódujících podjednotky draselného kanálu (*KCNJ11* a *ABCC8*) se ukázal převod z léčby inzulínem na podávání perorálních antidiabetik derivátů sulfonylurey jako vysoce efektivní a bezpečný (Pearson, 2006).

Mitochondriální diabetes, často způsobený mutací A3243G v mitochondriální DNA, se projevuje mezi třetí a pátou dekadou života mírnou hyperglykemií s tendencí k progresi (Maassen, 2002). Stejná mutace může zapříčinit i závažnější onemocnění MELAS projevující se malou postavou, oboustrannou hluchotou a později pak diabetem, epizodami podobnými mrtvici a encefalopatií.

Mezi další syndromy řadíme Wolframův syndrom způsobený recesivně přenášenými mutacemi v genu pro wolframin (*WFS1*), který je charakteristický

přítomností diabetu mellitu a atrofií optiku. Mutace v genu *EIF2AK3* kódujícího faktor, který udržuje integritu β buňky a kontroluje buněčný růst a buněčnou smrt, způsobují vzácný Wolcott-Rallison syndrom. Tento syndrom je rovněž přenášen autozomálně recesivně a projevuje se zejména malou postavou, epifyzární dysplázií, renální a hepatocytární dysfunkcí a permanentním neonatálním diabetem.

2.3 MODY

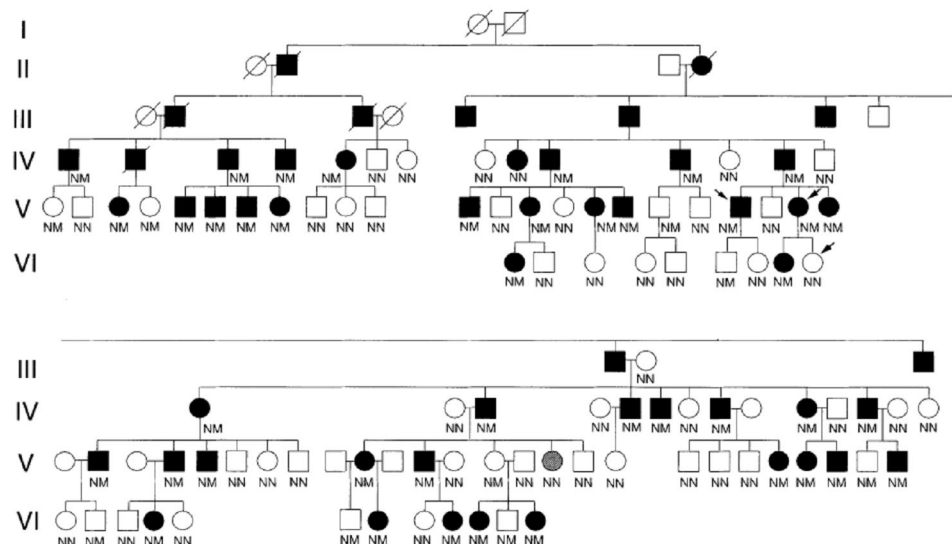
2.3.1 Historie

Základy výzkumu monogenního diabetu položil Stefan S. Fajans roku 1949 zahájením systematické prospektivní studie pacientů s diabetem a jejich zdravých prvostupňových příbuzných (Fajans, 1954). V rámci studie byla popsána rozsáhlá rodina s mnohočetným výskytem diabetu v několika generacích (obrázek 1), u níž bylo onemocnění doprovázeno častým výskytem vážných mikro- a makrovaskulárních komplikací (Fajans, 1989). Tato rodina označovaná zkratkou RW (Rinke-Wiegand) sehrála významnou roli v následujících letech výzkumu dědičného diabetu. S. S. Fajans použil jako první označení „Maturity-onset type diabetes of childhood or of the young“ roku 1964 na 5. mezinárodním kongresu diabetologie v Torontu (Fajans, 1965). Robert Tattersall poté, roku 1974, jako první popsal autozomálně dominantní způsob dědičnosti u tří rodin s mírnou formou diabetu (Tattersall, 1991). Označení MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young) se pak poprvé objevilo ve společné práci Fajanse a Tattersalla publikované roku 1975 (Tattersall, 1975).

Éra genetických studií začala v 80. letech minulého století (shrnutí ve Fajans, 2011), ovšem až o deset let později publikovali Graeme I. Bell a kolektiv nález polymorfizmu (Alu variabilní polyA) ležícího na dlouhém raménku 20. chromozómu, který segregoval s diabetem u výše popsané RW rodiny a označili tak oblast genomu nazvanou MODY1 (Bell, 1991). Následující vazebné studie umožnily lokalizovat další lokusy spojené s MODY na chromozómy 7 (MODY2) (Froguel, 1992; Hattersley, 1992) a 12 (MODY3) (Vaxillaire, 1995). Detailní genetický rozbor rekombinantů v RW rodině identifikoval jako kauzální pro MODY1 gen *HNF4A* (Hepatocyte Nuclear Factor 4-alpha) (Yamagata, 1996a). Analýzou tohoto genu byla nalezena mutace p.Gln268X způsobující diabetes v RW rodině (Yamagata, 1996a). V genu *HNF1A* (Hepatocyte Nuclear Factor 1-alpha), odpovídajícímu svou lokalizací oblasti MODY3, byla jako první nalezena mutace posunující čtecí rámec p.Pro291fsinsC u skotské rodiny (Yamagata, 1996b). Lokus označovaný MODY2 se překrývá s genem kódujícím

enzym glukokinázu (*GCK*) (Froguel, 1992; Hattersley, 1992), v němž první kauzální mutaci p.Gln279X popsali Vionnet a kolektiv (Vionnet, 1992).

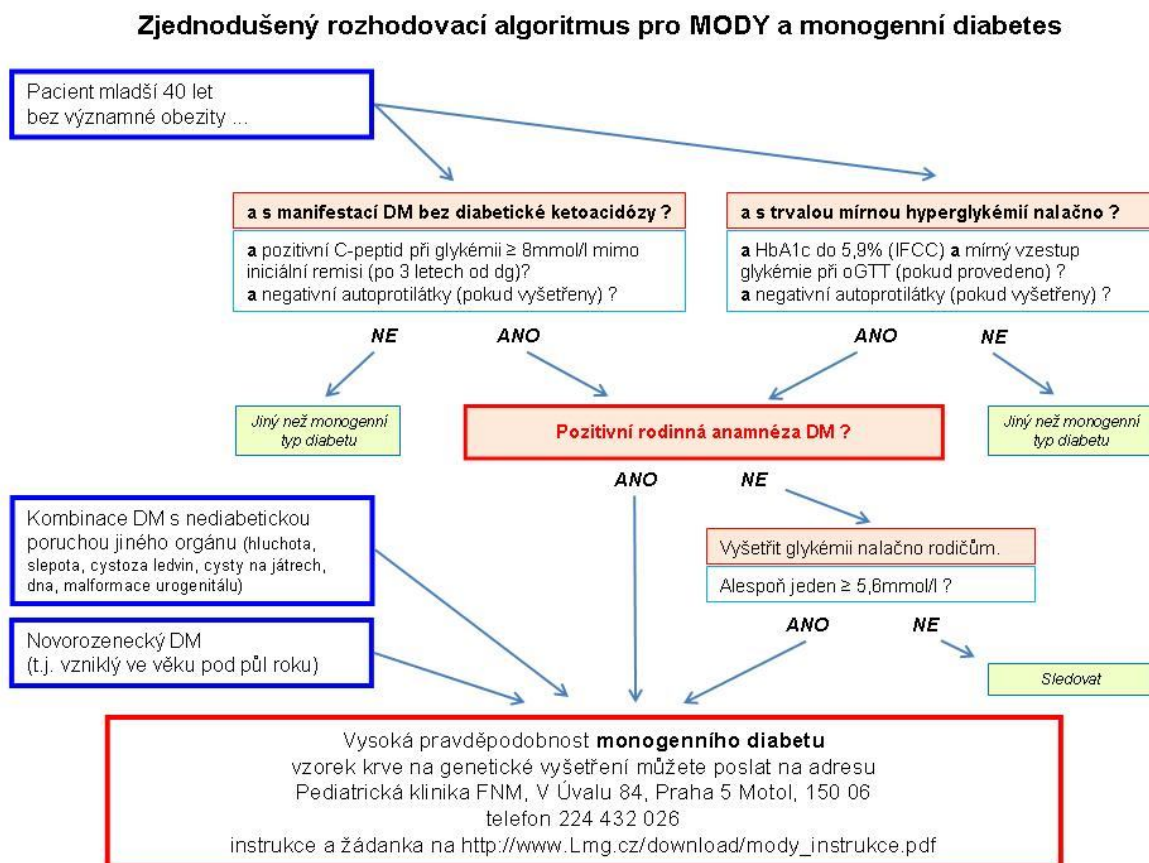
Obrázek 1. Rodokmen RW rodiny (Yamagata, 1996a). Osoby s MODY: černé symboly; nediabetičtí pacienti: bílé symboly; osoby s mutací p.Gln268X v genu *HNF4A*: M/n, negativní: n/n.



2.3.2 Charakteristika

MODY je nejčastější formou monogenního diabetu řadící se v mezinárodní klasifikaci diabetu mezi genetické defekty β buňky (ADA, 2011). Jedná se o klinicky heterogenní skupinu onemocnění, která se zpravidla projevují jako non inzulín-dependentní diabetes mellitus s autozomálně dominantním typem dědičnosti a s věkem v době diagnózy do 40 let. Dalšími společnými klinickými charakteristikami jsou manifestace diabetu bez ketoacidózy, nepřítomnost pankreatických autoprotilátek a detekovatelný C-peptid ukazující na zachování endogenní sekrece inzulínu. Naopak jednotlivé podtypy MODY se od sebe klinicky odlišují v závažnosti hyperglykémie a s tím souvisejících mikro- a makrovaskulárních komplikací (shrnuje v Ellard, 2008; Škrha, 2009). Klinické charakteristiky pacientů s MODY shrnuje obrázek 2 zobrazující schéma používané ošetřujícími lékaři k rozhodnutí, zda pacient splňuje kritéria pro molekulárně-genetické vyšetření MODY diabetu.

Obrázek 2. Rozhodovací algoritmus pro MODY na základě klinických charakteristik (Průhová, nepublikováno). Schéma pro ošetřující lékaře, na základě kterého se mohou rozhodnout zaslat vzorek pacienta na molekulárně-genetické vyšetření MODY.



MODY je způsoben mutací v některém z genů nezbytných pro správnou funkci β buňky pankreatu. Definitivní diagnóza MODY může být tudíž provedena pouze na základě molekulárně-genetického vyšetření (ADA, 2011). Do současnosti bylo popsáno 12 podtypů MODY na podkladě nálezů kauzálních mutací ve 12 různých genech. Od označení MODY1 až MODY12, které reflektovalo pořadí, ve kterém byly jednotlivé geny objeveny, se již upouští. Jednotlivé typy MODY se definují spíše názvem genu, ve kterém byla detekována mutace s příponou diagnózy MODY, tzn. GCK-MODY nebo HNF1A-MODY. Dosud známé podtypy MODY ukazuje tabulka 2.

Tabulka 2. Rozdělení MODY.

Podtyp MODY	Alternativní názvy	OMIM*	Reference
GCK-MODY	MODY2, GCK diabetes	125851	Hattersley, 1992
HNF1A-MODY	MODY3, HNF diabetes	600496	Yamagata, 1996b
HNF4A-MODY	MODY1, HNF diabetes	125850	Yamagata, 1996a
IPF1-MODY	MODY4	606392	Stoffers, 1997a
HNF1B-MODY	MODY5, RCAD	137920	Horikawa, 1997
NEUROD1-MODY	MODY6	606394	Malecki, 1999
KLF11-MODY	MODY7	610508	Neve, 2005
CEL-MODY	MODY8	609812	Raeder, 2006
PAX4-MODY	MODY9	612225	Plengvidhya, 2007
INS-MODY	MODY10	613370	Edghill, 2008, Molven, 2008
BLK-MODY	MODY11	613375	Borowiec, 2009
ABCC8-MODY	-	-	Gonsorcikova, 2011

*OMIM (Online Mendelian Inheritance in Men): online databáze lidských onemocnění s mendelovskou dědičností (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>).

2.3.3 Výskyt

Celkovou prevalenci diabetu MODY je složité stanovit a pravděpodobně jsou její odhady podhodnocené, protože mnoho rodin je vedeno pod jinou diagnózou (diabetes 1. nebo 2. typu) (Stone, 2010) nebo jejich diabetes zůstává zatím nerozpoznán. Odhadem prevalence diabetu typu MODY se zabývalo pouze několik publikovaných prací. Mezi prvními byly dvě německé studie: z klinických záznamů 40 927 pacientů s diabetem vybrali Panzram a Adolph 58 pacientů (0,14%) (Panzram, 1981) splňujících tehdejší kritéria MODY (Tattersall, 1975). Na tuto studii navázal druhý německý výzkum, který ovšem detekoval prevalenci MODY mezi diabetickými pacienty až 10 krát vyšší: 1,8% (Ledermann, 1995). Norská studie (HUNT2) se zaměřila pouze na dospělé pacienty se subtypem HNF1A-MODY (MODY3) a predikovala jejich minimální prevalenci mezi pacienty s diabetem na 0,4% (Eide, 2008). Recentní studie detekovala prevalenci subtypu HNF1A-MODY mezi mladými dospělými v oxfordském regionu v Anglii na 0,18% (Kropff, 2011). Minimální prevalenci MODY v britském registru stanovila druhá britská studie na 108 případů na 1 milión obyvatel (Shields, 2010). Prevalence v jiných populacích nebyla publikována.

Dosavadní výsledky genetického testování MODY v České republice ukazují minimální prevalenci 53 případů na 1 milión obyvatel (nepublikováno).

V současnosti existuje i nezanedbatelné množství rodin splňujících klinická kritéria MODY bez nalezené mutace v některém ze známých MODY genů. Tato skupina se označuje MODYX a nijak se neodlišuje v klinických a biochemických charakteristikách od geneticky prokázaných subtypů MODY (Johansen, 2005). MODYX zaujímá 51% v dánském MODY registru (Johansen, 2005), 48% v českém registru (Pruhova, 2003), 45% v německém registru (Lindner, 1999) a 16% ve francouzském registru (Frayling, 2001).

Zastoupení subtypů MODY diabetu v jednotlivých národních registrech se zejména odvíjí od způsobu náboru pacientů: náhodně zjištěná hyperglykémie u pediatrických pacientů je s vyšší pravděpodobností způsobená mutací v genu pro glukokinázu (GCK-MODY, MODY2), zatímco detekovaná hyperglykémie u dospělých bude spíše způsobená diabetem 2. typu, který v této skupině výrazně převažuje (Giuffrida, 2005). U národních registrů založených především na doporučení pacientů z pediatrických ambulancí tudíž převažují pacienti s diagnózou GCK-MODY: např. ve španělském (Estalella, 2007), italském (Lorini, 2009), německém (Schober, 2009) a českém (Pruhova, 2003; **publikace prezentovaná v kapitole 4.1**). Naproti tomu u britského (Shields, 2010) nebo norského (Bjorkhaug, 2003) registru, které jsou založené převážně na doporučení pacientů z ambulancí pro dospělé, výrazně převažuje diagnóza HNF1A-MODY.

2.3.4 Funkce β buňky

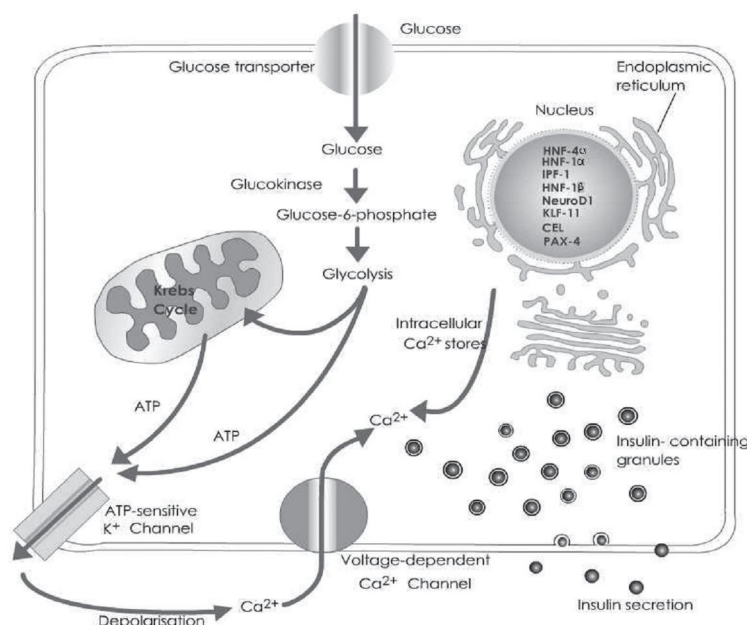
Sekrece inzulínu z β buněk pankreatu je nezbytná k udržení glukózové homeostázy. Mutace v genech kódujících jaderné transkripční faktory pankreatu či v genu pro glukokinázu jsou zodpovědné za poškození funkce β buněk pankreatu, což vede k poruše produkce inzulínu.

Obrázek 3 popisuje mechanismus sekrece inzulínu: glukóza vstupuje do β buňky přes glukózové transportéry (GLUT1, GLUT2). Uvnitř β buňky je glukóza rozpoznána enzymem glukokinázou, který ji fosforyluje na glukózu-6-fosfát. Následuje sled biochemických reakcí glykolýzy a Krebsova cyklu za vzniku vysoce energetických vazeb ve formě ATP (adenozin trifosfát). Energie ATP je poté využita k uzavření draselného kanálu (K_{ATP}), což vede ke snížení množství draselných iontů vystupujících z buňky. Kanál K_{ATP} je složen z celkem osmi podjednotek: čtyři z nich tvoří tzv. vnitřní usměrňovač draslíku (pottasium inward-rectifying channel - Kir6.2; kódovaný genem *KCNJ11*), který je závislý na hladině ATP. Zbývající čtyři

podjednotky tvoří sulfonylureový receptor (SUR1; kódovaný genem *ABCC8*), který plní regulační funkci. Důsledkem uzavření kanálu K_{ATP} dojde k depolarizaci membrány β buňky a k následnému otevření napěťově řízených vápenatých kanálů a proudů iontů vápníku do β buňky. Vyšší intracelulární koncentrace vápníku vyvolá sekreci inzulínu ze zásobních granul (shrnutí v Nyunt, 2009; Škrha, 2009).

Kromě uvolnění inzulínu způsobí vstup glukózy do β buňky i zvýšenou transkripci genu pro inzulín (*INS*) (Baillyes, 1992), který dále interaguje s jadernými transkripčními faktory (např. s HNF1A, HNF4A, IPF1 a NEUROD1) (Duncan, 1998). Složitá síť transkripčních faktorů ve výsledku ovlivňuje veškeré děje v β buňce a reguluje i její prenatalní a postnatální vývoj (Servitja, 2004).

Obrázek 3. Mechanismus sekrece inzulínu β buňkou (Nyunt, 2009).



2.4 GCK-MODY

GCK-MODY, označovaný také jako glukokinázový diabetes, GCK-diabetes nebo MODY2, je nejčastěji zastoupeným podtypem MODY v českém registru monogenního diabetu (viz publikace představená v kapitole 4.1).

2.4.1 Klinická charakteristika

Fenotyp pacientů s GCK-MODY je víceméně uniformní bez ohledu na typ či lokalizaci mutace v *GCK*, pravděpodobně díky kompenzaci pomocí zdravé (tj. nemutované) alely (Sturis, 1994). U pacientů je detekována vyšší glykémie na lačno

(zpravidla v rozmezí 6 až 8 mmol/l), která je přítomna od narození. Hyperglykémie je u GCK-MODY stabilní, bez tendence k progresi (Stride, 2002), což reflektuje i hodnota glykovaného hemoglobinu (HbA_{1c}) pohybující se na horní hranici normy (tj. do 5,6% IFCC). Přítomnost mikro- a makrovaskulárních komplikací spojených s hyperglykemií je u pacientů s GCK-MODY velmi nízká (Velho, 1997; **rukopis v recenzním řízení představený v kapitole 4.6**). Orální glukózový toleranční test (oGTT) nevykazuje typickou diabetickou křivku, u většiny pacientů nepřesahuje nárůst glykémie ve 120. minutě 3 mmol/l (Stride, 2002). Rodinní příslušníci pacienta s GCK-MODY mohou být vedeni jako diabetici 2. typu nebo zůstává jejich hyperglykémie nerozpoznána až do okamžiku nálezu mutace v genu *GCK* (Ellard, 2008). Stabilně mírná hyperglykémie pacientů s GCK-MODY nevyžaduje farmakologickou léčbu s výjimkou těhotenství (Hattersley, 2006). Doporučuje se dodržování zásad zdravého životního stylu a dietní opatření s cílem zabránit vzniku diabetu 2. typu k již přítomnému GCK-MODY (Murphy, 2008).

Náhodně zjištěná hyperglykémie u dětí je nejčastěji způsobená mutacemi v genu *GCK* (Feigerlova, 2006). Další častou situací, kdy dochází k prvnímu zachycení hyperglykémie, je těhotenství. Za růst plodu je nejvíce zodpovědný inzulín (Desoye, 1994). Studie Hattersleyho a kolektivu i navazující práce (Shields, 2008) ukázaly, že plod, který nezdědil mutaci v *GCK* od své matky s GCK-MODY, má v době porodu o 600 g vyšší hmotnost než je průměrná porodní váha, a to v důsledku hyperglykémie matky zvyšující inzulínem zprostředkovaný růst plodu (Hattersley, 1998). Pokud nastane situace, kdy plod je nositelem mutace v *GCK*, ovšem zdědil ji po otci a matka je normoglykemická, dojde ke snížené sekreci fetálního inzulínu a nižší porodní váze o 540 g. V případě přítomnosti GCK-MODY u matky i plodu se oba výše popsané jevy vzájemně vyruší a plod má průměrnou porodní hmotnost (Hattersley, 1998).

2.4.2 Gen GCK a funkce proteinu

GCK-MODY je způsoben heterozygotní inaktivační mutací v genu pro glukokinázu (*GCK*). Gen *GCK* se nachází na krátkém raménku 7. chromozómu (7p15.3-7p15.1). Byly popsány 3 izoformy: izoforma 1, regulovaná distálním promotorem, se vyskytuje v β buňkách pankreatu a v mozku. Isoformy 2 a 3, ovlivňované proximálním promotorem, byly nalezeny v jaterních buňkách (Jetton, 1994). Gen *GCK* je složen v případě pankreatické izoformy z 10 exonů (1a, 2-10) (NM_000162.2). Dosud bylo publikováno více než 600 mutací kauzálních pro GCK-MODY (Stenson, 2009), které byly lokalizovány víceméně rovnoměrně po celém genu s výjimkou exonu 1a (Osbak, 2009). Neexistuje důkaz o přítomnosti mutačního

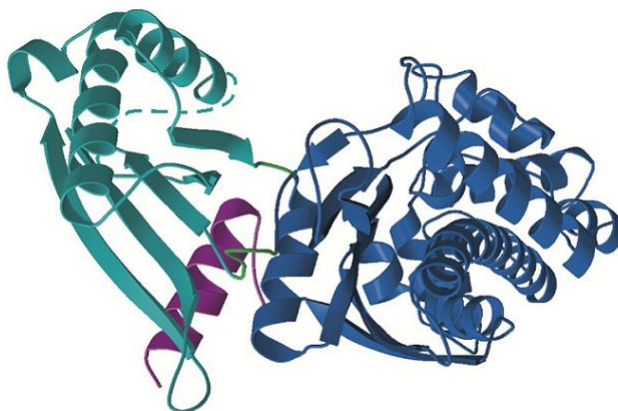
hot-spot (Osbak, 2009). Na druhou stranu bylo prezentováno několik mutací nalezených u zdánlivě nepříbuzných rodin pocházejících ze stejného regionu, což ukazuje na efekt zakladatele (Henderson, 2007; Sagen, 2008; Saker, 1996). Nejčastěji, u 21 českých rodin, byla detekována mutace p.Glu40Lys - o analýze efektu zakladatele pojednává **publikace představená v kapitole 4.2**.

Heterozygotní mutace v *GCK* způsobují hyperglykémii různými mechanismy: např. plnou inaktivací enzymu glukokinázy kvůli inzerci asparaginového zbytku v pozici 161. aminokyseliny (Garcia-Herrero, 2007), teplotní nestabilitou enzymu způsobenou substitucí p.Glu300Lys (Burke, 1999), sníženou afinitou ke glukóze zapříčiněnou mutací p.Glu70Lys (Burke, 1999) nebo defektní regulací glukokinázy v důsledku mutace p.Val62Met (Gloyn, 2005).

Studie na myších modelech ukázaly, že kompletní vyřazení *gck* způsobí smrt z důvodu závažné formy diabetu během prvních 4 dní života (Grupe, 1995). To upomíná na analogii se vznikem PNDM u dětí s homozygotní mutací v *GCK* (Njolstad, 2001). Padesátiprocentní zastoupení *gck* v důsledku heterozygotní mutace v genu *gck* pak u myší vyústilo v mírnou, trvalou hyperglykémii podobnou fenotypu pacientů s GCK-MODY (Grupe, 1995).

Gen *GCK* kóduje enzym stejného názvu, který hraje v β buňce zásadní roli při zpracování glukózy: fosforyluje glukózu na glukózu-6-fosfát (viz kapitola 2.3.4). Glukokináza (hexokináza IV/D) byla objevena roku 1962 jako člen rodiny enzymů hexokináz. Skládá se z 465 aminokyselin, které podle modelu krystalické struktury (Kamata, 2004) tvoří velkou a malou doménu oddělenou žlábkem, do kterého se váže molekula glukózy a ATP. Jsou známy tři konformační stavy enzymu GCK: 1. zavřený (stav vysoké afinity, kdy je navázána glukóza i ATP), 2. otevřený (mezistupeň, kdy je přítomna vysokoafinitivní forma GCK ovšem již bez navázané glukózy a ATP), 3. super-otevřený (stav nízké afinity ke glukóze), jež znázorňuje obrázek 4 (Iynedjian, 2009). Glukokináza vykazuje unikátní enzymatickou kinetiku: má více než 20krát vyšší afinitu ke glukóze v porovnání s následně působící hexokinázou II a závislost GCK na koncentraci glukózy popisuje spíše sigmoidní charakter než typičtější hyperbolický (Cardenas, 1998). Tyto charakteristiky dávají GCK vlastnost citlivého senzoru pro glukózu v buňkách s neomezeným transportem glukózy přes buněčnou membránu, jako je pankreatická β buňka.

Obrázek 4. Celková struktura super-otevřené formy glukokinázy (Kamata, 2004). Modře je znázorněna velká doména, zeleně malá doména a fialově helix $\alpha 13$, který spojuje obě domény.



Aktivita GCK může být regulována polymorfizmy v genech pro regulátor glukokinázy (*GCKR*), katalytickou glukózu 6 fosfatázu (*G6PC2*), melatoninový receptor 1 (*MTNR1B*) nebo polymorfizmy v samotném GCK (Soranzo, 2010). Rizikové alely v těchto genech jsou asociovány s vyšší hodnotou glykémie na lačno (Heni, 2010), HbA_{1c} (Soranzo, 2010) či sekrecí inzulínu (Hu, 2010). Vliv polymorfizmu v genu *G6PC2* na biochemické charakteristiky pacientů s GCK-MODY jsme ve spolupráci s polskými kolegy studovali v kohortě českých a polských rodin s GCK-MODY a ukázali jsme asociaci vyšší hladiny HbA_{1c} a rizikové varianty polymorfizmu v *G6PC2* (rukopis v recenzním řízení představený v kapitole 4.7).

2.5 HNF1A-MODY

Většina dosud známých subtypů diabetu MODY je způsobena mutacemi v genech kódujících transkripční faktory, z nichž nejběžněji bývá v kavkazských populacích diagnostikován typ HNF1A-MODY (MODY3).

2.5.1 Klinická charakteristika

Na rozdíl od mírného fenotypu spojeného s onemocněním GCK-MODY jsou pacienti s HNF1A-MODY charakterističtí s věkem progredující hyperglykemií. Vyšetření oGTT vykazuje vysoký nárůst glykémie (o více než 5 mmol/l) ve 120. minutě (Stride, 2002). U některých pacientů je glykémie na lačno v normálním rozmezí, ale ve 120. minutě dosahuje již diabetických hodnot (Ellard, 2008). Jelikož je transkripční faktor HNF1A exprimován i v buňkách renálního tubulu, u některých pacientů pozorujeme snížený renální práh pro glukózu vedoucí ke glykosurii

(Pontoglio, 2000). Pro HNF1A-MODY je typická dobrá kompenzace diabetu na nižších dávkách inzulínu, než jsou obvyklé u pacientů s jiným typem diabetu (Ellard, 2008). Ovšem u nespolupracujících pacientů dochází velmi rychle k rozvoji mikro- a makrovaskulárních komplikací (Isomaa, 1998; Steele, 2010). Zvýšená hladina HDL cholesterolu je dalším znakem pozorovaným u onemocnění HNF1A-MODY (Pearson, 2003). Rodinní příslušníci probanda suspektního na HNF1A-MODY mohou být diagnostikováni jako diabetici 1. typu bez přítomnosti pankreatických protilátek nebo například jako neobézní diabetici 2. typu bez inzulínové rezistence (Ellard, 2008).

Z pohledu pacienta s HNF1A-MODY je nejzásadnější jejich zjištěná citlivost na léčbu deriváty sulfonylurey (Sovik, 1998). Deriváty sulfonylurey překlenují poškození β buňky způsobené defektem v transkripčních faktorech působením na draselný kanál a stimulací sekrece inzulínu (Pearson, 2003). Jak je zmíněno v následující kapitole 2.5.2, mutace v genu *HNF1A* poruší transport a zpracování glukózy a sníží metabolismus v mitochondriích. Tyto děje předchází činnosti draselného kanálu (viz kapitola 2.3.4). Pokud je tedy v β buňce přítomné ATP, mohou deriváty sulfonylurey zavřít draselný kanál (Hattersley, 2006) a uvolnit tak cestu k sekreci inzulínu. Před genetickou diagnózou je většina pacientů léčena inzulínem. Bylo prokázáno, že po převedení na léčbu některou z tablet derivátů sulfonylurey (např. gliklazidem) dochází ke zlepšení jejich kompenzace diabetu (Pearson, 2000) i ke zlepšení jejich životního standardu (Shepherd, 2004).

Penetrance HNF1A-MODY je vysoká: u 63% pacientů se diabetes rozvine do 25. roku věku a u 96% do 55 let (Shepherd, 2001).

2.5.2 Gen HNF1A a funkce proteinu

Gen *HNF1A* (*TCF1*) leží na dlouhém raménku 12. chromozómu (12q22-24.2) a skládá se z 10 exonů (NM_000545.5) rozkládajících se v oblasti dlouhé přibližně 23 kilobází (kb). Dosud známe tři izoformy *HNF1A* lišící se v exonu 6 a 7 (Bach, 1993). Bylo popsáno více než 350 heterozygotních mutací (substitucí, delecí, inzercí i větších přestaveb) způsobujících HNF1A-MODY (Stenson, 2009), které jsou rozprostřeny víceméně rovnoměrně po celé délce genu. Jak popisuje kapitola 2.1.1, první nalezenou kauzální mutací v *HNF1A* byla p.Pro291fsinsC (Yamagata, 1996b). Tato heterozygotní mutace posunující čtecí rámec s předčasným ukončením syntézy proteinu byla následně detekována i u dalších rodin pocházejících z různých populací (Frayling, 1997; Kaisaki, 1997). Haplotypové analýzy neprokázaly, že by pacienti s p.Pro291fsinsC sdíleli společný ancestrální haplotyp obklopující mutaci (Bjorkhaug, 2003; Frayling, 1997; Kaisaki, 1997). Region genomu zahrnující popisovanou mutaci obsahuje řadu cytozinů (polyC oblast). Toto nukleotidové složení je náchylné k

„uklouznutí“ polymerázy a vzniku delecí nebo inzercí (Ellard, 2006). Tudíž je oblast 291. aminokyseliny genu *HNF1A* považována za mutační hot-spot spíše než za výsledek efektu zakladatele.

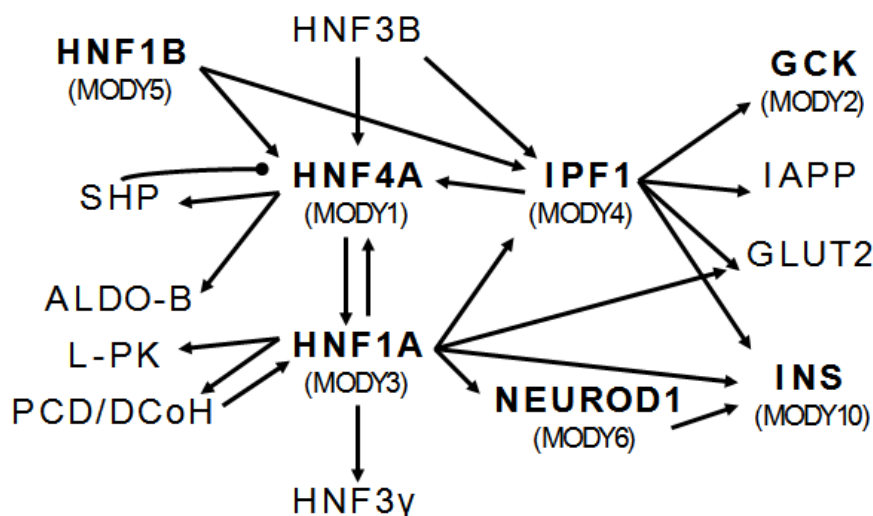
Heterozygotní mutace v *HNF1A* způsobují HNF1A-MODY dvěma mechanismy: haploinsuficiencí (exprese pouze jedné alely není dostatečná pro zajištění plné funkce proteinu) a dominantně-negativním efektem (mutovaná alela poškodí i druhou alelu) (Ellard, 2006).

Práce na myších modelech ukázaly, že heterozygotní vyřazení genu *hnf1a* vedlo k vážnému poškození pankreatických β buněk (Lehto, 1997; Shih, 2002). Úplný knockout *hnf1a* pak vyvolal diabetes pár dní po narození a poškození funkce jater a ledvin (Lee, 1998; Pontoglio, 1996; Pontoglio, 2000). U lidí nebyla homozygotní mutace v genu *HNF1A* popsána.

Transport a metabolismus glukózy v pankreatické β buňce je regulován řadou transkripčních faktorů včetně HNF1A (Stoffel, 1997). Exprese proteinu HNF1A byla poprvé objevena v játrech a posléze v pankreatu, ledvinách, žaludku a tenkém střevě (Yamagata, 2003). HNF1A je tvořen třemi funkčními doménami: dimerizační, DNA-vazebnou a transaktivační. HNF1A může působit jako monomer nebo jako dimer ve spojení s HNF1B, k čemuž využívá právě dimerizační doménu (Yamagata, 1996b). I když přesná role HNF1A nebyla dosud plně objasněna, je známo několik genů, které tento transkripční faktor ovlivňuje: geny pro glukózový transportér (GLUT2), pyruvát kinázu typu L (enzym glykolýzy), aldolázu B, inzulín, mitochondriální 2-oxoglutarát dehydrogenázu a geny regulující buněčnou proliferaci a apoptózu (Okita, 1999; Wang, 2000; Wobser, 2002; Yamagata, 2002; Yang, 2002).

Obrázek 5 popisuje složitou transkripční síť regulující děje v pankreatické β buňce. Vzájemná regulace transkripčních faktorů HNF1A a HNF4A byla dokumentována studii na myších modelech i u pacientů s MODY diabetem. Analýzy myši s vyřazeným genem *hnf1a* ukázaly, že exprese HNF4A je závislá na HNF1A (Boj, 2001). Toto zjištění následně potvrdil nález mutací v promotoru genu *HNF1A*, kam se váže transkripční faktor HNF4A (Gagnoli, 1997). Opačná závislost HNF1A na HNF4A byla prokázána experimentálně (Wang, 2000) i u rodin s mutací v oblasti promotoru specifickém pro pankreatické β buňky (P2) genu *HNF4A*, které vedly k porušení schopnosti HNF1A vázat se do této oblasti a způsobily tak u pacientů HNF4A-MODY (Hansen, 2002; Wirsing, 2010). Spekuluje se, že mutace v jednom z těchto faktorů může vést k funkčnímu poškození zbývajících alel v popsaném kruhu (Ferrer, 2002; Servitja, 2004).

Obrázek 5. Předpokládaný model hierarchické sítě transkripčních faktorů (upraveno dle Shih, 2001). Šipky značí pozitivní regulaci.



2.6 HNF4A-MODY

HNF4A-MODY (MODY1) způsobený heterozygotními mutacemi v genu kódujícím transkripční faktor HNF4A je klinicky téměř shodný s výše popsaným HNF1A-MODY diabetem. Je detekován ovšem méně často.

2.6.1 Klinická charakteristika

Prakticky identický fenotyp pacientů s HNF4A-MODY a HNF1A-MODY vedl k souhrnému označení diagnózy těchto pacientů jako HNF-diabetes (HNF-MODY) nebo diabetes transkripčních faktorů. V případě negativního genetického vyšetření genu *HNF1A* a splněných klinických kritérií se tudíž doporučuje i analýza genu *HNF4A* (Ellard, 2008). Citlivost na deriváty sulfonylurey je u HNF4A-MODY srovnatelná s pacienty s HNF1A-MODY (Shepherd, 2004). V porovnání s HNF1A-MODY bývají pacienti s HNF4A-MODY diagnostikováni později a nebyl u nich prokázán nízký renální práh pro glukózu (Pearson, 2005).

Nejzásadnější rozdíl ve fenotypu pacientů mezi HNF1A-MODY a HNF4A-MODY poprvé pozorovali Pearson a kolektiv roku 2007: porodní váha nositelů mutací v genu *HNF4A* byla v průměru o 790 g vyšší v porovnání se zdravými příbuznými, naopak vyšší porodní hmotnost nebyla asociována s mutacemi v genu *HNF1A* (Pearson, 2007). Kromě pozorované makrosomie převažující u diagnózy HNF4A-MODY byl popsán i kauzální vztah mutací v genu *HNF4A* s neonatální

hyperinzulinemickou hypoglykemií nezávislou na maternální glykémii v těhotenství (Pearson, 2007). Tyto nálezy potvrdily experimentální práce na myších s knockoutovaným genem *hnf4a* (Pearson, 2007) i další klinické studie (Kapoor, 2008) zahrnující i detailně klinicky charakterizovanou RW rodinu s HNF4A-MODY (viz kapitola 2.1.1) (Fajans, 2007). Zjištěná fakta indikují, že postnatálně úzce kooperující transkripční faktory HNF1A a HNF4A (viz kapitola 2.5.2) působí nezávisle na sobě v prenatálním období. Výjimkou z popisovaných fenotypových charakteristik je nález českého probanda s geneticky potvrzeným HNF1A-MODY, u něhož jsme popsali přítomnost makrosomie a ketotické hypoglykémie (**publikace představená v kapitole 4.3**).

2.6.2 Gen HNF4A a funkce proteinu

Na dlouhém raménku 20. chromozómu (20q13.12) se nachází gen *HNF4A* tvořený celkem 13 exony (exony 1a, 1b, 1c, 1d, 2 – 10). Různé složení proximálních exonů genu *HNF4A* tvoří devět známých izoform (Bogan, 2000). Isoformy HNF4A1 až HNF4A6 zahrnující exony 1a, 1b nebo 1c jsou aktivní v jaterních buňkách (reguluje je jaterně-specifický promotor P1) (Dean, 2010). Ve fetálním období jedince jsou jaterní izoformy exprimovány i v pankreatu z přibližně jedné čtvrtiny a významně tak ovlivňují vývoj pankreatu (Harries, 2008). V adultních β buňkách pankreatu dominuje výše zmíněný pankreaticky-specifický promotor P2, který reguluje expresi izoform HNF4A7 až HNF4A9 obsahující exon 1d (Thomas, 2001). Promotor P2 zahrnuje kromě již popsaného vazebného místa pro HNF1A (Hansen, 2002) i vazebné místo pro faktor IPF1 (Thomas, 2001) a v obou těchto lokacích byly nalezeny mutace způsobující MODY (Thomas, 2001; Hansen, 2002; Wirsing, 2010; vlastní pozorování). Celkově bylo dosud publikováno 72 různých mutací v genu *HNF4A* (Stenson, 2009) bez indicií o mutačním hot-spot nebo efektu zakladatele.

Studie na myších ukázaly, že heterozygotní delece genu *hnf4a* nezpůsobí glukózovou intoleranci (Shih, 2001), zatímco myš s plně vyřazeným *hnf4a* nepřežije více než pár dní (Chen, 2010).

Transkripční faktor HNF4A patří do rodiny receptorů steroidních hormonů je exprimován v játrech, v ostrůvcích pankreatu, v ledvinách a tenkém střevě (Miquerol, 1994; Sladek, 1990). Na rozdíl od HNF1A pracuje pouze ve formě homodimeru a je aktivován ligandem, pravděpodobně mastnými kyselinami (Dhe-Paganon, 2002). Funkci regulátoru transkripce umožňují DNA vazebná doména, ligand vázající doména s dimerizačním rozhraním a dvě transaktivační domény (Furuta, 1997). Roli HNF4A v regulaci pochodů v β buňce částečně popisuje kapitola 2.5.2 a obrázek 5, ale veškeré interakce nebyly dosud objeveny a popsány.

2.7 *IPF1*-MODY

Heterozygotní mutace v genu *IPF1* (Insulin Promotor Factor 1) jsou zodpovědné za vzácně se vyskytující formu MODY: *IPF1A*-MODY (MODY4).

2.7.1 Klinická charakteristika

Stoffers a kolektiv roku 1997 publikovali nález rozsáhlé rodiny, u níž mutace p.Pro63fsdelC (c.188delC, p.Pro63fsX60) v homozygotním stavu způsobila permanentní neonatální diabetes mellitus a exokrinní pankreatickou nedostatečnost způsobenou agenezí pankreatu (Stoffers, 1997a). Heterozygotní mutace pak vedla k MODY diabetu charakteristickému sníženou odpovědí inzulínu na glukózu a průměrným věkem v době diagnózy 35 let (Stoffers, 1997a; Stoffers, 1997b). Stejná mutace v genu *IPF1* vedoucí v homozygotním stavu k podobnému fenotypu jako u předchozího probanda byla nalezena i u další rodiny (Thomas, 2009). Fenotyp nositelů heterozygotní mutace p.Pro63fsdelC se ale od prvně popsané rodiny odlišoval – diabetes byl u pacientů diagnostikován v dřívějším věku a byl provázen hyperinzulinemií, což způsobila pravděpodobně vyskytující se obezita (Fajans, 2010). *IPF1*-MODY byl prokázán i u pacientů s gestačním diabetem (Gragnoli, 2005; Weng, 2002) či s hyperglykemií na lačno (Schwitzgebel, 2003).

Dosavadní klinická data tak ukazují, že MODY4 představuje relativně mírnou formu diabetu se sníženou inzulínovou sekrecí (Fajans, 2010), zatímco homozygotní mutace v *IPF1* vedou k závažnému poškození morfolgie i funkce pankreatu (Chen, 2008).

2.7.2 Gen *IPF1A* a funkce proteinu

Mapování pomocí mikrosatelitních markerů na myším modelu s časným projevem diabetu pojmenovaném Akita lokalizovalo další, čtvrtý lokus spojený s dědičným diabetem na chromozóm 7 (Yoshioka, 1997). Ovšem prakticky ve stejnou dobu publikovali Stoffers a kolektiv nález již přímo kauzálního genu pro MODY4 - *IPF1*, oficiálně označovaného *PDX1* (Pancreas/Duodenum Homeobox Factor 1), který leží na chromozómu 13 (13q12.1) (Stoffers, 1997a). Gen *IPF1* je tvořen dvěma exony (NM_000209.3), které kódují transkripční faktor *IPF1*. Protein je složený z N-terminální transaktivační domény, motivu pěti aminokyselin (FPWMK), jež interaguje s transkripčním faktorem *PBX1* a konečně homeodomény, což je oblast zodpovědná za vazbu ke genům, které reguluje.

Transkripční faktor IPF1 je nezbytný pro embryogenezi pankreatu a u dospělých β buněk pankreatu pro udržení jejich funkce (Ahlgren, 1998; Madsen, 1997). Jak již název napovídá, IPF1 se váže do promotoru inzulinového genu (oblast TAAT), ale reguluje i další geny zapojené do fungování β buňky: *PAX4* (Smith, 2000), *GLUT2* (Ahlgren, 1998), *Nkx6.1* (Watada, 2000), nebo gen pro růstový faktor vázající heparin (*HB-EGF*) (Kaneto, 1997). Mezi geny, jež naopak regulují funkci IPF1, patří *IPF1* sám (Smith, 2000), *HNF3B* (Marshak, 2000) a *KLF11* (Fernandez-Zapico, 2009).

Mechanismy působení poškozeného IPF1, jež jsou zodpovědné za fenotyp pacientů, se odvíjí od typu nalezené mutace. Jednonukleotidová delece p.Pro63fsdelC v genu *IPF1* způsobila posun čtecího rámce s předčasně ukončenou syntézou proteinu, kterému tak chyběla DNA-vazebná doména (Fajans, 2010; Stoffers, 1997a). Heterozygotní substituce p.Glu164Asp a p.Glu178Lys vedla k hraničním hodnotám glykémie u jejich nositelů kvůli snížené transkripční aktivitě IPF1 způsobené krátkým poločasem života (Schwitzgebel, 2003).

Homozygotní delece genu *ipf1* vedla ve shodě s pozorováním u lidí k agenezi pankreatu na myších modelech (Jonsson, 1994). Heterozygotní mutace vedly k porušení glukózové tolerance (závislé na stáří myších modelů) způsobené vyšší rychlostí apoptózy β buněk pankreatu (Johnson, 2003).

2.8 HNF1B-MODY

HNF1B-MODY (MODY5) je vzácným subtypem MODY, který je charakteristický kromě diabetu poškozením dalších orgánových soustav.

2.8.1 Klinická charakteristika

Heterozygotní mutace v dalším z transkripčních faktorů podílejících se na fungování β buňky pankreatu, HNF1B (Hepatocyte Nuclear Factor 1-beta), byl zodpovědný za dědičný diabetes v japonské rodině popsané roku 1997 (Horikawa, 1997). Následující práce odhalily, že HNF1B-MODY je nejen spojen s diabetem, ale především s defekty urogenitálního traktu (Bingham, 2000; Nishigori, 1998) a proto je HNF1B-MODY nahrazováno označením syndrom renálních cyst a diabetu (RCAD, Renal Cysts and Diabetes syndrome). Diabetes pacientů s HNF1B-MODY vykazuje známky defektu sekrece inzulinu a je podobný fenotypu pacientů s HNF1A-MODY (Bellanne-Chantelot, 2004). Ovšem na rozdíl od HNF1A-MODY není u pacientů s HNF1B-MODY plně objasněna optimální léčba jejich diabetu a doporučuje se tedy pečlivý monitoring (Naylor, 2011).

Poškození urogenitálního traktu se zpravidla u pacientů s HNF1B-MODY projevuje dříve než diabetes. Svědčí o tom metaanalýza publikovaná roku 2010, která ukázala, že anomálie struktury ledviny se vyskytovala u 96,6% pacientů mladších 25 let, zatímco porucha metabolismu glukózy byla přítomna pouze u 21,6% stejně starých pacientů (Chen, 2010). Typ poškození struktury ledvin je u HNF1B-MODY velice variabilní: zahrnuje například polycystózu, dysplázii, hypoplázii nebo agenezi (Chen, 2010; vlastní pozorování). U pacientů s HNF1B-MODY byly popsány i anomálie dalších orgánů – jater (Kitanaka, 2004) nebo poškození exokrinní části pankreatu (Bellanne-Chantelot, 2004).

2.8.2 Gen HNF1B a funkce proteinu

Gen *HNF1B* tvořený 9 exony (NM_000458.2) se nachází v oblasti centromery chromozómu 17 (17cen-q21.3). Transkripční faktor kódovaný *HNF1B* se skládá ze tří domén: na N-konci se nachází dimerizační doména, následuje ji DNA-vazebná doména složená ze specifické POU domény a POU homeodomény a transaktivační doména. Kauzální jednonukleotidové mutace se nejčastěji vyskytují v DNA-vazebné doméně (Chen, 2010), celkově však převažuje heterozygotní delece celého genu (Bellanne-Chantelot, 2005). Vysvětlením může být kompozice regionu obklopujícího gen *HNF1B*, která je bohatá na AT, což vede ke vzniku sekundárních struktur a vyššímu riziku vzniku delecí (Chuzhanova, 2003). Pravděpodobným mechanismem působení mutací v *HNF1B* je haploinsuficience, kdy porušená DNA-vazebná či transaktivační doména není schopná vázat koaktivátor, tj. některou z histon-acetyltransferáz (Barbacci, 2004). Spekuluje se i o vlivu dominantně negativního efektu, jako u mutací v jiných transkripčních faktorech (Kitanaka, 2004).

Exprese HNF1B byla detekována v játrech, pankreatu, ledvinách a žlučovodu. Jak již bylo ukázáno na obrázku 5, HNF1B je součástí složité regulační sítě transkripčních faktorů, které regulují vývoj β buňky pankreatu i metabolismus glukózy. HNF1B může fungovat ve formě monomeru nebo dimeru ve vazbě s HNF1A (Yamagata, 1996b). V tomto směru ukázala experimentální studie, že mutovaný HNF1B potlačuje aktivitu HNF1A (Kitanaka, 2004). HNF1B navíc reguluje řadu genů včetně genu pro inzulin (Okita, 1999).

Studie myši s knockoutovaným genem *hnf1b* nejsou jednoduché, protože zvířecí modely umíraly v důsledku chybění *hnf1b* krátce po implantaci (Coffinier, 1999), což dokazuje zásadní roli tohoto faktoru v embryogenezi (Maestro, 2003). Speciální strategie ale umožnila generovat myši s chybějícím *hnf1b* genem výhradně v β buňkách pankreatu, které krátce po narození projevily poruchu glukózové

tolerance s tendencí k progresi během života a došlo i ke změně exprese jiných transkripčních faktorů (Wang, 2004b).

2.9 NEUROD1-MODY

Posledním subtypem MODY diabetu, který byl objeven ve 20. století, je NEUROD1-MODY (MODY6) způsobený heterozygotními mutacemi v genu *NEUROD1* (Neurogenic Differentiation 1).

2.9.1 Klinická charakteristika

Polská studie na pacientech s dědičným diabetem 2. typu popsala u dvou rodin přítomnost mutací v genu *NEUROD1* a vedla tak u nich ke změně diagnózy na NEUROD1-MODY (Malecki, 1999). Další rodiny s tímto onemocněním byly posléze identifikovány na Islandu (Kristinsson, 2001), v Číně (Liu, 2007), v České republice (Gonsorcikova, 2008) a pravděpodobně v Norsku (Sagen, 2005). Publikované rodiny nesdílely mnoho společných klinických charakteristik. Věk v době diagnózy diabetu se pohyboval od dětství až do pozdní dospělosti (Malecki, 1999; Liu, 2007). U obou dvou českých rodin a jedné polské byla přítomná výrazná obezita (Gonsorcikova, 2008; Malecki, 1999), zatímco islandští a čínští pacienti vykazovali normální (i když v některých případech hraniční) hodnotu BMI (Kristinsson, 2001; Liu, 2007). Ani ve způsobu léčby nelze najít společný prvek. Klinická kritéria pro výběr pacientů na skríníng genu *NEUROD1* tak zůstávají nejasná (Sagen, 2005).

2.9.2 Gen NEUROD1 a funkce proteinu

Lidský gen *NEUROD1* (*BETA2/NEUROD1*) byl lokalizován na dlouhé raménko 2. chromozómu (2q32). Je tvořen 2 exony (NM_002500.3), z nichž pouze druhý je translatován do proteinu. Třída B rodiny transkripčních faktorů, jež obsahují DNA-vazebnou doménu HLH (helix-loop-helix), zahrnuje i NEUROD1. Naya a kolektiv prokázali, že se NEUROD1 váže jako heterodimer ve spojení s proteinem E47 k E-boxu promotoru inzulínového genu a specificky tak reguluje expresi inzulínu (Naya, 1995). Později se ukázalo, že další esenciální součástí regulačního komplexu NEUROD1 je i koaktivátor p300 (Sharma, 1999). NEUROD1 je nezbytný i pro vývoj β buněk pankreatu, což prokázaly studie na myších s vyřazeným *neurod1*, které uhynuly do 5 dní po narození v důsledku sníženého množství β buněk a progresivního diabetu (Naya, 1997).

Heterozygotní mutace zodpovědné za NEUROD1-MODY byly nalezeny v HLH doméně a zabránily tak vazbě k DNA (Kristinsson, 2001; Malecki, 1999), popř.

v transaktivační doméně, čímž znemožnily vazbu koaktivátoru p300 (Malecki, 1999; Liu, 2007; Gonsorcikova, 2008).

2.10 KLF11-MODY

Mutace v dalším z transkripčních faktorů, Krüppel-like zinc finger 11 (KLF11), způsobují sedmý popsaný subtyp MODY diabetu: KLF11-MODY (MODY7).

2.10.1 Klinická charakteristika

Pouze u tří rodin po celém světě byla prokázána diagnóza KLF11-MODY (Neve, 2005). Jednalo se o rodiny s původní diagnózou časného diabetu 2. typu, kde diabetes segregoval s mutací přinejmenším ve dvou generacích. Pacienti byli diagnostikováni v rozmezí 17 až 56 let věku, převažovala léčba perorálními antidiabetiky a u zhruba poloviny z nich se již vyskytovaly diabetické vaskulární komplikace (Neve, 2005).

2.10.2 Gen KLF11 a funkce proteinu

Transkripční faktor kódovaný genem *KLF11* (chromozómová lokalizace 2p25, 4 exony) je jedním z 16 členů podskupiny KLF v rodině Sp1/KLF, která je charakteristická třemi evolučně konzervovanými DNA-vazebnými doménami s motivem zinkových prstů (Bieker, 2001). Pomocí těchto domén se KLF11 váže ke GC či CACCC boxu promotorových oblastí cílových genů (Niu, 2007). KLF11 reguluje celou řadu buněčných dějů včetně proliferace, stárnutí, apoptózy (Black, 2001) a působí jako represor faktorů způsobujících rakovinu pankreatu (Buck, 2006). Jelikož je činnost KLF11 indukovaná TGF β (Transforming Growth Factor β), jehož signalizační dráha je nezbytná pro vývoj pankreatu (Miralles, 1998), představoval *KLF11* kandidátní gen pro diabetes.

A skutečně, Neve a kolektiv našli dvě vzácné varianty v genu *KLF11* segregující s diabetem u tří rodin (Neve, 2005). Obě mutace (p.Thr220Met a p.Ala347Ser) mění sekundární strukturu DNA-vazebných domén proteinu a zřejmě ovlivňují i vazbu nezbytných kooperátorů (Neve, 2005).

Po nálezů kauzálních variant pro MODY následovaly studie zabývající se rolí KLF11 v patogenezi diabetu. Při vysokých hladinách glukózy se KLF11 v β buňkách váže k inzulínovému promotoru a tím jej aktivuje (Neve, 2005). Ovšem o dva roky později byla publikována studie s opačnými výsledky ukazující, že vysoká hladina glukózy naopak vedla v β buňce ke snížení množství detekované mRNA pro KLF11 (Niu, 2007). Nicméně je jisté, že homozygotní mutace v promotoru inzulínového genu

c.-331C>G způsobující neonatální diabetes (Garin, 2010) přeruší vazebné místo pro transkripční faktor KLF11, čímž zabrání aktivaci genu pro inzulin tímto faktorem (Bonfond, 2011). Dále bylo zjištěno, že KLF11 se váže do promotorové oblasti genu *IPF1* (viz kapitola 2.7.2), který tímto aktivuje (Fernandez-Zapico, 2009). Aktivace promotoru *INS* genu faktorem KLF11 je závislá na kofaktoru p300, který vyvolává acetylaci histonů (Bonfond, 2011). Ukázalo se rovněž, že p300 působí jako regulátor většiny MODY genů (*GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B*, *IPF1*, *NEUROD1*, *KLF11*) (Fernandez-Zapico, 2009).

Myši s vyřazeným genem *klf11* nevykazovaly žádné klinické abnormality a byly fertlní (Song, 2005). Hlubší pohled na deficienci *klf11* v β buňkách pankreatu však ukázal, že vede ke snížení sekrece inzulinu o 34% vzhledem k myši s plně funkčním genem *klf11* (Bonfond, 2011).

2.11 CEL-MODY

Na rozdíl od většiny subtypů MODY není CEL-MODY (MODY8) způsoben mutacemi v některém z transkripčních faktorů, ale v enzymu karboxyl ester lipáza (CEL).

2.11.1 Klinická charakteristika

I CEL-MODY se řadí mezi raritní formy dědičného diabetu, protože i když byl hledán v kohortě dánských a britských MODYX pacientů (Torsvik, 2010), zůstávají popsány pouze 2 norské rodiny trpící exokrinní dysfunkcí pankreatu a diabetem, jež jsou způsobeny heterozygotními mutacemi v genu *CEL* (Raeder, 2006). U většiny pacientů se nejprve, zpravidla během druhé dekády života, objevila mírná, opakující se bolest břicha a následné testy prokázaly deficit elastázy ve stolici (FED) potvrzující defekt exokrinní činnosti pankreatu. Diabetes či porušená glukózová tolerance se u pacientů manifestovaly později (u jedné z rodin v průměru ve 36 letech) a vykazovaly porušení sekrece inzulinu, zvýšenou glykémii na lačno i ve 120. minutě během oGTT a vyšší hladiny HbA_{1C} (Raeder, 2006). Následná klinická studie ukázala, že u nositelů heterozygotní mutace v genu *CEL* se před manifestací diabetu v pankreatu akumuluje tuk a předpokládá se tedy, že lipomatóza je jedním z časných jevů v patogenezi diabetu i exokrinního selhání pankreatu (Raeder, 2007). CEL-MODY tudíž potvrzuje, že diabetes může vzniknout v důsledku porušení exokrinní funkce pankreatu (Lombardo, 2003). Léčba pacientů substitucí pankreatického enzymu neměla vliv na kontrolu glykémie, ale zmírnila symptomy exokrinní insuficience

pankreatu (Vesterhus, 2010). CEL-MODY je podle stejné práce asociován i s demyelinizační neuropatologií (Vesterhus, 2010).

2.11.2 Gen CEL a funkce proteinu

Nukleotidová kompozice genu *CEL* nacházejícího se na 9. chromozómu (9q34.3, NM_001807.3) je zajímavá z několika důvodů: prvním je přítomnost 11 kilobází vzdáleného pseudogenu *CELP* s 96% homologií v exonech 1, 8, 9, 10 a 11, což značně ztěžuje molekulárně-genetickou analýzu (Torsvik, 2010) a za druhé tím, že se v posledním 11. exonu genu nachází sled repetice o délce 33 párů bazí (VNTR, Variable Number of Tandem Repeats), které se opakují 7krát až 21krát, nejčastěji však 16krát (Higuchi, 2002; Raeder, 2006). Oblast VNTR je v maturovaném proteinu postranslačně modifikována O-glykosylací (Reue, 1991), jež zaručuje intracelulární zpracování proteinu (Lombardo, 2001). Předpokládá se, že VNTR repetice jsou nezbytné pro správné složení, sekreci a stabilitu enzymu (Bruneau, 1997). A právě stabilita CEL je porušena nalezenými mutacemi u dvou rodin s CEL-MODY, které se nacházely v první (c.1686delT), respektive čtvrté (c.1785delC) repetici VNTR (Raeder, 2006). Recentní práce ukázala, že u pacientů s CEL-MODY je rovněž narušeno složení proteinu do funkční konformace (Johansson, 2011).

Karboxyl ester lipáza (CEL), enzym kódovaný genem *CEL*, je exprimován zejména v exokrinních částech pankreatu, prsní žláze produkující mateřské mléko a v menší míře i v endotelových buňkách a eozinofilech (Lombardo, 2001). Hlavní funkcí CEL je hydrolýza esterů cholesterolu, mono-, di- a triacylglycerolů, fosfolipidů (Hui, 1996) a trávení tuků z mléka u novorozenců (Lombardo, 2001). Snížená stabilita i nesprávná konformace proteinu v důsledku mutací v genu *CEL* vedou k atrofii pankreatu a infiltraci pankreatu tukem a následnému fenotypu CEL-MODY (Raeder, 2006).

Ovšem u myší s knockoutovaným genem *cel* se neprojeví známky exokrinní a endokrinní dysfunkce pankreatu (Howles, 1996), s výjimkou zjištěné mírné glukózové intolerance u samic (Vesterhus, 2010). Ukázalo se tedy, že v případě CEL-MODY nekoreluje fenotypové charakteristiky u lidí a zvířecích modelů.

2.12 PAX4-MODY

PAX4-MODY (MODY9), další vzácný podtyp MODY s ne zcela vyhraněnými fenotypovými charakteristikami, byl testován i u kohorty českých probandů klinicky suspektních pro MODY diabetes (**publikace představená v kapitole 4.4**).

2.12.1 Klinická charakteristika

Plengvidhya a kolektiv roku 2007 popsali nález dvou thajských rodin s dědičným diabetem, který byl způsobený heterozygotními mutacemi v genu *PAX4* (Plengvidhya, 2007). Fenotyp obou rodin se však příliš neshodoval: v případě první rodiny byla nalezena mutace p.Arg164Trp ve dvou generacích, u jednoho člena rodiny byl diabetes diagnostikován až v 50 letech, u dalšího byla prokázána jen porušená glukózová tolerance. Ovšem u dalších dvou příbuzných s porušenou glukózovou tolerancí nebyla mutace detekována a autoři se odkazují na přítomnost fenokopií (Plengvidhya, 2007). Rovněž ve druhém publikovaném případě zůstávají pochybnosti o roli genu *PAX4* v etiologii MODY: u pacienta s mutací v místě sestřihu intronu 7 a exonu 8 (IVS7-1G>A) nebyli k dispozici příbuzní pro segregáční analýzu. Zveřejněná dostupná klinická data ukázala, že v rodině probanda se vyskytoval jak diabetes, tak renální selhání (Plengvidhya, 2007). Nedávno byl publikován nález třetí, japonské rodiny s *PAX4*-MODY, potvrzující značnou klinickou heterogenitu tohoto subtypu MODY (Jo, 2011). U probanda byl v 15 letech diagnostikován diabetes bez ketoacidózy a pankreatických autoprotilátek vyžadující léčbu inzulínem. Naproti tomu probandův otec trpěl od 30 let diabetem, jenž byl dobře kompenzován na dietě. U obou byla detekována kauzální delece 39 nukleotidů v genu *PAX4* (Jo, 2011).

Dosavadní výsledky ukazují, že genetické pozadí asijských a kavkazských MODY pacientů se může lišit. Kauzální mutace v genu *PAX4* nebyla dosud detekována v kohortách francouzských (Dupont, 1999), britských (Edghill, 2010) a českých (**kapitola 4.4**) MODY pacientů, ale pouze u rodin pocházejících z Thajska a Japonska (Plengvidhya, 2007; Jo, 2011). Navíc převažující subtypy MODY (GCK-MODY, HNF1A-MODY, HNF4A-MODY) v kavkazských populacích tvoří pouze malé procento korejských, čínských či japonských pacientů (Eto, 1993; Hwang, 2006; Tonooka, 2002; Xu, 2005).

2.12.2 Gen *PAX4* a funkce proteinu

Gen *PAX4* (Paired box 4) leží na dlouhém raménku 7. chromozómu (7q32) a je složen z 9 exonů (NM_006193.2). *PAX4* patří do genetické rodiny transkripčních faktorů obsahujících párovou doménu a homeodoménu, které hrají klíčovou roli v embryonálním vývoji plodu (Dohrmann, 2000). Produkt genu *PAX4*, transkripční faktor *PAX4*, se skládá z 349 aminokyselin (Smith, 1999). Je exprimován v časně fázi vývoje pankreatu a později je jeho výskyt omezen pouze na β buňky (Sosa-Pineda, 1997). *PAX4* působí jako represor transkripce: interaguje s dalšími transkripčními faktory *PDX1* a *Nkx6.1* a moduluje tak správný vývoj pankreatických β buněk (Wang,

2004a). Rovněž byla prokázána přítomnost vazebného místa pro PAX4 v oblasti promotoru inzulínového genu (Smith, 1999).

I když je fenotyp pacientů s PAX4-MODY různorodý, funkční studie se v zásadě shodují na principu působení nalezených mutací. PAX4 potlačuje aktivitu promotoru inzulínového genu za běžných okolností z 50% (Plengvidhya, 2007). Represe promotoru byla snížena na 35% v případě přítomnosti mutace p.Arg164Trp (Plengvidhya, 2007), respektive byla úplně ztracena v případě delece c.374_412del39 (Jo, 2011). Patogenita sestřihové mutace IVS7-1G>A může být způsobena porušením akceptorového místa splicingu a potencionálním přeskočením exonu, ovšem experimentální důkazy chybí (Plengvidhya, 2007).

Myší modely s heterozygotní delecí *pax4* nevykazovaly žádné abnormality, přežily do dospělosti a byly fertlní (Sosa-Pineda, 1997). Kompletní knock-out genu vyvolal růstovou retardaci, dehydrataci, snížené množství β buněk pankreatu a smrt, celkově se podobal fenotypu pozorovanému u kompletního vyřazení transkripčního faktoru IPF1, přestože byl přítomen pankreas normální velikosti (Sosa-Pineda, 1997).

2.13 INS-MODY

Studium inzulínového genu (*INS*) probíhá po několik desetiletí, ale až na začátku 21. století byla objevena jeho souvislost s dědičným diabetem typu MODY a byl tak popsán INS-MODY (MODY10).

2.13.1 Klinická charakteristika

Jak je stručně zmíněno v kapitole 1.2.2, permanentní neonatální diabetes mellitus může být způsoben i heterozygotními (Stoy, 2007; Polak, 2008; Edghill, 2008) nebo homozygotními (Garin, 2010) mutacemi v genu *INS* či jeho promotoru. Ukázalo se také, že heterozygotní mutace v *INS* jsou vzácně zodpovědné i za subtyp MODY (Molven, 2008; Edghill, 2008; Bonfanti, 2009; Boesgaard, 2010). Fenotyp pacientů s familiární formou diabetu vzniklou v důsledku mutace v *INS* genu je velice různorodý. Byli popsáni jak pacienti přesně zapadající do klinických kritérií MODY – neobézní, s non inzulín-dependentním diabetem (Edghill, 2008), tak i pacienti s pozitivními pankreatickými protilátkami, ketoacidózou a diabetem závislým na inzulínu (Molven, 2008). U české pacientky s INS-MODY se diabetes manifestoval polyurií a polydipsií (Boesgaard, 2010).

elementem C2 kooperují proteiny s párovou doménou a homeodoménou – např. PAX4 (kapitola 2.12.2), do CRE (Cyclic AMP Response Element) se váží faktory s motivem leucinového zipu (CREB, CRE vázající protein), a role oblasti G1 bohaté na puriny zůstává ještě plně neobjasněná (shrnutí v Melloul, 2002). Dále ve směru proximálně od počátku transkripce genu *INS* se nachází oblast s VNTR, jejíž počet opakování jednotlivých repeticí je asociován s diabetem 1. (Bennett, 1996) i 2. typu (Ong, 1999).

Předpokládané účinky mutací v *INS* genu jsou porušení stability molekuly inzulínu či porucha konverze proinzulínu na inzulín (Molven, 2008), jež jsou doprovázené chronickým stresem endoplazmatického retikula spojeným s úbytkem množství β buněk pankreatu (Liu, 2010). Experimentální studie na myších Akita, modelových organizmech pro stres endoplazmatického retikula, potvrdily důležitost tohoto jevu v patogenezi diabetu mellitu (Araki, 2003).

2.14 BLK-MODY

Dalším publikovaným subtypem MODY je BLK-MODY (MODY11), vzácný typ diabetu klinicky připomínající NEUROD1-MODY, který je způsobený heterozygotními mutacemi v genu *BLK* (B-lymfocyt kináza).

2.14.1 Klinická charakteristika

Hlavní společné klinické charakteristiky tří polských rodin s geneticky potvrzeným BLK-MODY byly nadváha (průměr BMI 28,7) a relativní spíše než absolutní deficit sekrece inzulínu. Průměrný věk v době diagnózy diabetu byl 31 let. Většina pacientů (59%) se léčila inzulínem (Borowiec, 2009). Všechny vypsané charakteristiky se shodují s výše popsányými daty o pacientech s NEUROD1-MODY (Gonsorcikova, 2008). Je ale nutné zmínit, že menší množství nositelů mutace v genu *BLK* zůstalo normoglykemických (Borowiec, 2009). Penetrance BLK-MODY tedy není stoprocentní. Ukázalo se, že důležitou roli v tomto jevu může hrát právě nadváha: penetrance u pacientů s BMI nižším než 28 byla pouze 33%, zatímco u osob s hodnotou BMI rovnou nebo vyšší než 28 dosáhla penetrance BLK-MODY 89% (Borowiec, 2009). Studie potvrzuje, že i monogenní choroby včetně MODY mohou být ovlivněny dalšími genetickými nebo enviromentálními modifikátory (Borowiec, 2009; Dipple, 2000).

2.14.2 Gen BLK a funkce proteinu

Na krátkém raménku chromozómu 8 (8p23-22) leží gen *BLK* skládající se z 13 exonů (NM_001715.2). Mutace způsobující BLK-MODY byly nalezeny ovšem i mimo kódující region: 20 kb ve směru 5' od začátku transkripce a v polyadenylační oblasti na 3' konci (Borowiec, 2009). Mutace p.Ala71Thr detekovaná u další rodiny segregovala na haplotypu, který zahrnoval i vzácné varianty na konci 3' nepřekládaného regionu (UTR) a 8 kb ve směru 3' (Borowiec, 2009).

Gen *BLK* kóduje B-lymfocyt kinázu, protein s tyrozin kinázovou aktivitou z rodiny *src* protoonkogenů, jenž byl, jak jeho název napovídá, detekován v B-lymfocytech, kde se podílí na buněčné proliferaci a diferenciaci (Dymecki, 1990). Pozdější studie popsala i přítomnost kinázy v buňkách pankreatu (Marselli, 2008), kde se exprese BLK zvýšila při vysokých koncentracích glukózy a podporovala tím sekreci inzulínu (Borowiec, 2009). Funkční studie nalezených mutací asociovaných s BLK-MODY prokázaly snížení schopnosti BLK podporovat sekreci inzulínu (Borowiec, 2009). Autoři rovněž spekulují, že BLK podporuje expresi transkripčních faktorů Nkx6.1 a IPF1 ovlivňujících inzulínový gen (Borowiec, 2009).

Role BLK ve fungování β buňky pankreatu zůstává stále ne zcela objasněna a další studie jsou zapotřebí k hlubšímu poznání funkce BLK v patogenezi MODY. Příliš nového nepřinesla ani část výzkumu na zvířecích modelech, u nichž vyřazení genu *blk* nevyvolalo diabetes (Borowiec, 2009).

2.15 ABCC8-MODY

ABCC8-MODY se řadí mezi vzácné subtypy MODY s variabilní klinickou expresí. Do spektra popsaných fenotypů přispěla i studie české rodiny (**publikace představená v kapitole 4.5**).

2.15.1 Klinická charakteristika

Dosud bylo identifikováno široké spektrum fenotypů spojených s mutacemi v genu *ABCC8* (ATP-binding cassette C8) kódujícím regulační podjednotku draselného kanálu β buňky, SUR1. Inaktivační mutace způsobují kongenitální hyperinzulinismus, který je charakterizován neregulovanou sekrecí inzulínu vedoucí k perzistentní hypoglykémii (Thomas, 1995). Opačně působící aktivační mutace vedou k tranzientnímu nebo permanentnímu neonatálnímu diabetu (Flanagan, 2007) nebo až k syndromu spojujícímu opoždění psychomotorického vývoje, epilepsii a permanentní neonatální diabetes (DEND) (Babenko, 2006). V současnosti byly

publikovány případy pacientů s geneticky prokázáným ABCC8-MODY. Jejich fenotyp byl ovšem velice různorodý: od mírné hyperglykémie podobné charakteristikám GCK-MODY (**publikace představená v kapitole 4.5**), přes diabetes citlivý na léčbu deriváty sulfonylurey podobný HNF1A-MODY (Bowman, 2011), diabetes léčený inzulínem (Hartemann-Heurtier, 2009), až po diabetes připomínající T2DM (Huopio, 2003).

2.15.2 Gen ABCC8 a funkce proteinu

Gen *ABCC8*, který leží na chromozómu 11 (11p15.1), je tvořen 39 exony (NM_000352.3), které kódují 1581 aminokyselin dlouhý protein, označovaný SUR1. Inaktivační mutace způsobující hyperinzulinismus se rozdělují do dvou skupin podle efektu, který mají na protein. První třída mutací zabraňuje dopravě K_{ATP} kanálu z endoplazmatického retikula k buněčné membráně (Zerangue, 1999). Mutace v *ABCC8* druhé třídy znemožňují MgADP stimulovat aktivitu K_{ATP} kanálu, což způsobuje jeho permanentní zavření (Huopio, 2002). Publikovaná literatura nabízí minimálně dva mechanismy, jimiž aktivační mutace zabrání K_{ATP} kanálu se zavřít: snížená senzitivita kanálu k ATP (Proks, 2006), nebo vyšší stimulační aktivita SUR1 (Babenko, 2006).

Sulfonylureový receptor 1 (SUR1) patří do rodiny ABC proteinů a jeho funkcí je regulace druhé jednotky K_{ATP} kanálu, Kir6.2 (Aittoniemi, 2009). Kromě pro ABC proteiny běžných podjednotek (transmembránové a nukleotid-vázající domény) obsahuje SUR1 i unikátní soubor 5 terminálních transmembránových helixů (TMD0), jež modulují otevírání a zavírání K_{ATP} kanálu (Chan, 2003). Mutace v této doméně byla nalezená i u české rodiny s ABCC8-MODY (**publikace představená v kapitole 4.5**).

Sníženou senzitivitu k ATP vedoucí až hyperglykémii, hypoinzulinémií, ketoacidóze a smrti projevíly i myši v důsledku aktivační mutace v *abcc8* (Koster, 2000).

2.16 MODYX

I přes stále se navyšující počet genů kauzálních pro MODY, zůstává genetická příčina diabetu u velkého množství rodin splňujících klinická kritéria MODY dosud nenalezena (Johansen, 2005; **kapitola 4.4**). Explozivní rozvoj molekulárně-genetických technik a současně jejich rychle klesající cena pravděpodobně v brzké budoucnosti umožní objev dalších genů kauzálních pro MODY. Mezi slibné techniky

se řadí především celoexomový skríníng (Ng, 2009) nebo celogenomové sekvenování (Shendure, 2008) DNA pacientů z vybraných MODYX rodin.

3. Shrnutí genetického vyšetřování MODY

V posledních čtyřech letech se nám díky finanční podpoře grantu norského království prostřednictvím finančního mechanismu (CZ0100) podařilo zoptimalizovat, časově i ekonomicky zefektivnit a rozšířit molekulárně-genetickou diagnostiku genů zodpovědných nejen za MODY diabetes, ale i za nejčastější formy neonatálního diabetu.

V Laboratoři molekulární genetiky Pediatrické kliniky 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze tak rutinně provádíme vyšetření genů *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *IPF1*, *HNF1B*, *NEUROD1*, *KLF11*, *PAX4*, *INS*, *ABCC8* a *KCNJ11* za použití následujících technik:

- izolace DNA: z periferní krve metodou vysolování, popř. komerčním kitem Qiagen (MiniKit, Hilden, Německo); ze slin komerčním kitem OraGene (DNA Genotek, Ontario, Kanada); ze suchých Guthrieho kapek komerčním kitem Qiagen (MicroKit, Hilden, Německo)
- přímá sekvenace
 - amplifikace jednotlivých exonů genů pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)
 - přečištění PCR produktů pomocí chemikálií Ampure za využití robota (oboje Beckman Coulter, Fullerton, USA)
 - sekvenační reakce (BigDye Terminator 3.1, Applied Biosystems, Warrington, UK)
 - přečištění sekvenačních produktů pomocí chemikálií CleanSeq za použití robota (oboje Beckman Coulter, Fullerton, USA)
 - separace fragmentů na 16ti-kapilární elektroforéze (ABI3130xl, Applied Biosystems)
 - hodnocení softwarem Mutation Surveyor v.3.24 (SoftGenetics, Pennsylvania, USA)
- analýza strukturálních variant (rozsáhlejších delecí a inzercí) metodou MLPA
 - komerční kit P241-B1 MODY (MRC Holland, Amsterdam, Nizozemí)
 - hodnocení softwarem GeneMarker v.1.75 (SoftGenetics)

Molekulárně-genetické vyšetření je českým pacientům suspektním na MODY poskytováno bezplatně díky grantové finanční podpoře. Od roku 2009 se úspěšně

účastníme mezinárodní externí kontroly kvality (EMQN) zaměřené na sekvenaci a molekulárně-genetickou diagnostiku MODY.

K datu 1.12.2011 evidujeme v databázi monogenního diabetu celkem 1613 osob z 591 rodin, z nichž klinická kritéria MODY splňuje a v procesu genetického vyšetřování je zahrnuto 522 rodin (1518 osob). Dosavadní výsledky vypadají následovně:

- GCK-MODY: 175 rodin (376 osob)
- HNF1A-MODY: 41 rodin (96 osob)
- HNF4A-MODY: 18 rodin (55 osob)
- HNF1B-MODY: 7 rodin (7 osob)
- NEUROD1-MODY: 2 rodiny (11 osob)
- INS-MODY: 3 rodiny (7 osob)
- ABCC8-MODY: 1 rodina (7 osob).

Výsledky studia MODY diabetu prezentujeme nejen ve formě původních publikací v zahraničních časopisech (viz kapitola 4), ale i na domácích a mezinárodních vědeckých konferencích.

4. Vlastní publikace a rukopisy s komentáři

4.1 GCK-MODY nejčastějším subtypem v českém MODY registru

Š. Průhová, P. Dušátková, Z. Šumník, S. Koloušková, O. Pedersen, T. Hansen, O. Cinek, J. Lebl: Glucokinase diabetes in 103 families from a country-based study in the Czech Republic: geographically restricted distribution of two prevalent GCK mutations. *Pediatric Diabetes* 2010, 11: 529-535.

Cílem této práce bylo shrnout výsledky deseti let molekulárně-genetického vyšetřování genu *GCK* u českých pacientů klinicky splňujících kritéria GCK-MODY. Od roku 1999 byly pod vedením MUDr. Štěpánky Průhové, Ph.D. systematicky vyhledávány rodiny s pozitivní rodinou anamnézou diabetu, gestačního diabetu či s poruchou glukózové tolerance v (převážně) pediatrických endokrinologických a diabetologických ambulancích po celé České republice. Do roku 2009 jsme tak z registru o 292 rodinách vytvořili soubor čítající 140 rodin (zastoupených 140 probandů), které jsme testovali na přítomnost mutací v genu *GCK*. Vzorky DNA prvních 66 probandů byly analyzovány ve spolupracujícím dánském pracovišti skriningovou metodou dHPLC (denaturační vysokovýkonnostní kapalinová chromatografie), na kterou v případě pozitivního výsledku navazovala přímá sekvenace (Pinterova, 2007; Pruhova, 2003). Zbývající vzorky spolu s těmi negativními po analýze dHPLC byly vyšetřovány přímo metodou sekvenace, kterou v případě negativního nálezu doplňovala detekce větších přestaveb v genu *GCK* pomocí MLPA.

Diagnózu GCK-MODY jsme geneticky prokázali nalezením heterozygotních mutací v genu *GCK* u 103 rodin, což odpovídá 74% záchytnosti mezi rodinami s fenotypem GCK-MODY. GCK-MODY je s 35% nejčastěji zastoupeným subtypem v českém registru pacientů s MODY. Analýza rovněž překvapivě ukázala na čtyři prevalentní mutace (p.Glu40Lys, p.Leu315His, p.Gly318Arg a p.Val33Ala), které byly detekovány u nezanedbatelného množství nepříbuzných rodin. Navíc rodiny se dvěma ze zmíněných mutací (p.Glu40Lys a p.Leu315His) pocházely z geograficky ohraničených oblastí České republiky. Analýzou původu těchto mutací jsme se následně detailně zabývali (**kapitola 4.2**). Reanalýza dHPLC negativních výsledků

přímou sekvenací ukázala, že senzitivita této skriningové metody nedosahuje publikovaných 92-100% (Boutin, 2001), ale pouze 84%.

Original Article

Glucokinase diabetes in 103 families from a country-based study in the Czech Republic: geographically restricted distribution of two prevalent *GCK* mutations

Pruhova S, Dusatkova P, Sumnik Z, Kolouskova S, Pedersen O, Hansen T, Cinek O, Lebl J. Glucokinase diabetes in 103 families from a country-based study in the Czech Republic: geographically restricted distribution of two prevalent *GCK* mutations. *Pediatric Diabetes* 2010; 11: 529–535.

Background: Glucokinase diabetes, also called GCK-MODY or maturity-onset diabetes of the young type 2 (MODY2), is caused by heterozygous mutations in the gene encoding glucokinase (*GCK*).

Objective: The aim of study was to investigate the current prevalence of *GCK* mutations in a large cohort of Czech patients with typical clinical appearance of GCK-MODY. In addition, we reanalyzed the negative results obtained previously by screening using the denaturing high-performance liquid chromatography (dHPLC).

Methods: We studied 140 unrelated Czech probands with clinical picture of GCK-MODY who were referred to our center from the whole of the Czech Republic between the years 1999–2009 by direct sequencing of *GCK* gene.

Results: A mutation in *GCK* was identified in 103 of 140 probands (74%). We identified 46 different *GCK* mutations of which 13 were novel. Several mutations were detected in multiple families: p.Glu40Lys (20 families), p.Gly318Arg (12), p.Leu315His (7) and p.Val33Ala (six families). Direct sequencing detected a *GCK* mutations in 9 of 20 previously dHPLC-negative samples; the sensitivity of the dHPLC screening was calculated as 84%.

Conclusions: The study shows a relatively high proportion of *GCK* mutations among individuals with *GCK*-like phenotype, confirming the effectiveness of carefully applied clinical criteria prior to genetic testing. In the Czech MODY registry, GCK-MODY represents the biggest subgroup of MODY (35%). We report several prevalent *GCK* mutations with a likely founder effect in the Czech population. Furthermore, our results provide ground for a possible recommendation to reinspect all negative results previously obtained by screening using dHPLC.

**Stepanka Pruhova^{a,b},
 Petra Dusatkova^a,
 Zdenek Sumnik^a,
 Stanislava Kolouskova^a,
 Oluf Pedersen^{c,d,e}, Torben
 Hansen^{c,f}, Ondrej Cinek^a
 and Jan Lebl^a**

^aDepartment of Pediatrics, University Hospital Motol, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic;

^bDepartment of Pediatrics, University Hospital Kralovske Vinohrady, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic; ^cHagedorn Research Institute & Steno Diabetes Center, Gentofte, Denmark; ^dUniversity of Aarhus, Aarhus, Denmark; ^eInstitute of Biomedical Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark; and ^fUniversity of Southern Denmark, Odense, Denmark

Key words: dHPLC – diabetes – founder effect – GCK-MODY – glucokinase

Corresponding author:
 Prof. Jan Lebl, MD, PhD,
 Department of Pediatrics, University
 Hospital Motol and Second Faculty
 of Medicine, Charles University in
 Prague, V Úvalu 84, CZ-150 06,
 Prague, Czech Republic.
 Tel: +420 224 432 001;
 fax: +420 224 432 020;
 e-mail: jan.lebl@lfmotol.cuni.cz

Submitted 13 October 2009.
 Accepted for publication 7 January
 2010

Maturity-onset diabetes of the young (MODY) is a genetically heterogeneous form of monogenic diabetes mellitus, characterized by an autosomal dominant

inheritance, by early age at onset and a primary defect in beta-cell function. Glucokinase diabetes, also called GCK-MODY or MODY2, is one of the most prevalent

subtypes of MODY. It is caused by heterozygous mutations in the gene encoding glucokinase (*GCK*). The heterozygous mutations in *GCK* lead to enzyme inactivation that induces the specific GCK-MODY phenotype characterized by chronic mild hyperglycemia from early childhood (1, 2).

The prevalence of GCK-MODY differs markedly across the studied populations (2–4). According to the generally accepted opinion, this discrepancy is caused not only by the variations in the genetic background but also by differences in the recruitment criteria (5). A previous study done in the Czech Republic showed one of the highest prevalences of GCK-MODY among MODY patients (6).

So far, more than 300 different mutations in the *GCK* have been described according to the Human Gene Mutation Database (7) and by a review of the literature (8). Earlier, direct sequencing was usually preceded by a screening method, such as denaturing high-performance liquid chromatography (dHPLC) (9). Nowadays, direct sequencing of all samples prevails. In our previous studies (6, 10), the dHPLC was used as a screening method for the investigation of *GCK*.

This paper aims to summarize the results from genetic testing of a large cohort of Czech patients fulfilling the clinical criteria for glucokinase diabetes, gathered over the past 10 yr. The present work also includes the retesting of all samples whose negativity had been based solely on a negative dHPLC screening.

Methods

Study group

The probands were referred to our center from different parts of the Czech Republic over the years 1999–2009. Altogether, we collected DNA from 959 family members from 292 families meeting the criteria for MODY (11) and thus representing the Czech MODY registry. We studied 140 probands from MODY families with a high clinical suspicion of GCK-MODY according to the recently published criteria (11), specifically, the fasting hyperglycemia is ≥ 5.5 mmol/L, persistent and stable, HbA_{1c} is typically just above the upper limit of normal and rarely exceeds 7.5% and the parents may have ‘mild type 2 diabetes’ with no complications or may not be diabetic (11).

Sixty-six probands had been tested in previously published studies (6, 10) using the dHPLC as a screening method. Twenty probands with clinical suspicion on GCK-MODY were dHPLC negative. Their DNA was now reinvestigated by direct sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). Seventy-four new index probands were referred to the Czech MODY registry after the earlier published studies and their DNA was analyzed by direct sequencing

and then by a MLPA if required. Altogether, DNA samples from 94 probands were investigated.

The protocol was approved by the institutional Ethics Committees of the Second and Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic.

Genetic analysis of the *GCK* gene

Genomic DNA was extracted from peripheral blood with a routine salting-out method or using QIAmp DNA Blood Mini Kit (Quiagen, Hilden, Germany). Exons 1A-10, exon/intron boundaries and the *GCK* promoter region were analyzed by direct sequencing. Polymerase chain reaction (PCR) primers were used according to Boutin (9) with minor modifications. The PCR conditions are available from the authors. The PCR products were purified by Agencourt Ampure system (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), sequenced using BigDye Terminator 3.1 chemistry (Applied Biosystems, Warrington, UK) and sequencing products were purified by Agencourt CleanSeq system (Beckman Coulter). Reactions were analyzed on the DNA sequencer ABI Prism 3130x/ (Applied Biosystems) and inspected using the Mutation Surveyor software version 3.24 (SoftGenetics, Pennsylvania, PA, USA). Only the relevant primers for index mutations were used for DNA samples from family members of the GCK-MODY patients. The DNA samples negative for mutations were subsequently screened for gene dosage by MLPA following the manufacturer’s instructions (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands). The results were analyzed using software GeneMarker version 1.75 (SoftGenetics LLC, PA, USA).

The dHPLC method involves subjecting PCR products to ion-pair reverse-phase liquid chromatography in a column containing alkylated non-porous particles. The PCR products with sequence variations form the heteroduplexes which display reduced column retention time relative to their homoduplex counterparts (9).

Statistical analysis

Clinical and biochemical data are given as a median with interquartile range. p-values were calculated using non-parametric Mann–Whitney two-tailed test. For comparing types of treatment the chi-squared test was used. p-values less than 0.05 were considered significant.

Results

Prevalence of GCK-MODY

Out of 140 probands, the diagnosis of GCK-MODY was genetically confirmed in 103 families which

Table 1. Clinical and biochemical characteristics of Czech *GCK* mutation carriers and probands negative for *GCK* mutation

	GCK mutation carriers (n = 103)	Probands without a <i>GCK</i> mutation (n = 37)	p-value*
Age at investigation (yr)	19.5 (15.5–25.0)	21.0 (17.0–25.0)	0.48
Age at diagnosis (yr)	12.3 (8.0–15.0)	14.0 (11.0–16.0)	0.06
BMI (kg/m ²)	20.8 (18.7–22.8)	20.7 (17.1–23.3)	1.00
Fasting serum glucose (mmol/L)	6.7 (6.1–7.2)	6.4 (6.0–6.7)	0.13
HbA1c (%)	6.3 (5.8–6.7)	6.0 (5.8–6.4)	0.13
Treatment			
Diet	71	20	0.09
OHA	4	3	0.32
Insulin	7	5	0.22
None	11	7	0.20

BMI, body mass index; HbA1c, hemoglobin A1c; OHA, oral hypoglycemic agents.

Data are median (interquartile range).

*Using non-parametric Mann–Whitney two-tailed test and the chi-squared test for comparing types of treatment. p-values less than 0.05 were considered as significant.

represent 74% of Czech patients fulfilling the clinical criteria. GCK-MODY is a frequent subgroup of MODY in the Czech MODY register representing 35% of all probands. The other two frequent MODY types in the Czech MODY register are HNF1A-MODY with 10.6% and HNF4A-MODY with 4.5% (data not shown).

Clinical characteristics

Clinical and biochemical characteristics of GCK-MODY probands are shown in Table 1. The clinical characteristics do not differ between carriers and non-carriers of *GCK* mutation. The only possible tendency could be noticed regarding the age of diagnosis: the *GCK* mutation carriers were diagnosed at the mean age of 11.6 ± 6.5 yr, whereas the probands without mutation manifested later, at the age of 15.3 ± 8.7 yr on average. However, this difference was not significant ($p = 0.061$). Six probands with *GCK* mutation were younger than 1 yr at diagnosis. Only two women were recommended to the investigation because of gestational diabetes with a strong family history of mild hyperglycemia. The insulin therapy was successfully terminated without a need of other therapy in probands with genetically confirmed GCK-MODY.

Genetic analysis of *GCK*

We detected 46 different mutations summarized in Table 2. Twenty-two of them were detected by dHPLC and characterized by sequencing and described in our previous studies (6, 10). Thirteen mutations are novel, previously unpublished: p.Gly81Asp, p.Asp124Asn, p.Asn180fs, p.Thr209Lys, p.Val226Glu, p.Val244fs, p.Val277Arg, p.Gly385Trp, p.Val412fs, p.Glu442stop, IVS2+1G>A, IVS5+1G>T, and IVS7–1G>C. Some mutations were detected in more than one apparently

unrelated family: p.Glu40Lys (in 20 families), p.Gly318Arg (12 families), p.Leu315His (seven families), p.Val33Ala (six families), p.Cys220X (five families), p.Cys434Tyr (four families), p.Glu268stop (three families), and seven mutations found in two families each. In one proband, two different mutations were found on one chromosome (p.Val226Glu, p.Ala188Thr). The haplotype was passed in the family over three generations. All mutations segregated with chronic mild hyperglycemia or diabetes within the families confirming the clinical diagnosis of GCK-MODY. None of the novel mutations were found in non-diabetic relatives of the probands.

Gene dosage analysis using the MLPA technique was performed in 37 families with no detected mutation in the coding region or the promoter of *GCK*. We did not find any partial or whole gene deletion or duplication in the analyzed samples.

Sequencing analysis of dHPLC-negative samples

Direct sequencing of 20 previously dHPLC-negative samples detected eight different *GCK* mutations in nine samples. Moreover, two of these have not been previously described (p.Val244fs, p.Gly385Trp). The sensitivity of the dHPLC method in our previous studies was therefore 84% (46 patients with positive dHPLC screening and consequently with captured mutations from the total amount of 55 mutations).

Discussion

The high prevalence of genetically confirmed GCK-MODY clearly points to the importance of good clinical classification of the patients and their family before genetic testing. Our results – likewise the recent paper by Lorini et al. (12) – show that investigation of fasting glycemia in parents may be specifically recommended if the child has mild stable

Table 2. Mutations in the GCK gene identified in the Czech subjects

No. of families	Location	Codon/nt	Nucleotide change	Designation	Published
6	Exon 2	33	c.98T>C	p.Val33Ala	Lukasova 2008
20	Exon 2	40	c.118G>A	p.Glu40Lys	Pruhova 2003
2	Exon 2	44	c.131G>A	p.Gly44Asp	Pruhova 2003
1	Intron 2	1	c.208+1G>A	IVS2+1G>A	Novel
1	Exon 3	72	c.214G>A	p.Gly72Arg	Lehto 1999
1	Exon 3	81	c.242G>A	p.Gly81Asp	Novel
1	Exon 4	124	c.370G>A	p.Asp124Asn	Novel
1	Exon 4	150	c.450C>A	p.Phe150Leu	Pruhova 2003
1	Exon 4	157	c.469G>A	p.Glu157Lys	Massa 2001
1	Exon 5	175	c.523G>A	p.Gly175Arg	Froguel 1993
1	Exon 5	180	c.540delT	p.Asn180fs	Novel
1	Exon 5	182	c.544G>A	p.Val182Met	Froguel 1993
1	Exon 5	186	c.556C>T	p.Arg186stop	Katagiri 1992
2	Exon 5	188	c.562G>A	p.Ala188Thr	Shimada 1993
1	Exon 5	191	c.572G>A	p.Arg191Gln	Massa 2001
1	Intron 5	1	c.579+1G>T	IVS 5+1G>T	Novel
1	Exon 6	209	c.626C>A	p.Thr209Lys	Novel
5	Exon 6	220	c.660C>A	p.Cys220stop	Ziemssen 2002
2	Exon 6	226	c.676G>A	p.Val226Met	Velho 1997
1	Exon 6	226	c.677T>A	p.Val226Glu	Novel
3	Exon 7	244	c.730delG	p.Val244fs	Novel
1	Exon 7	250	c.748C>T	p.Arg250Cys	Pinterova 2007
2	Exon 7	251	c.751A>G	p.Met251Val	Pruhova 2003
1	Exon 7	252	c.754T>C	p.Cys252Arg	Pruhova 2003
1	Exon 7	256	c.766G>A	p.Glu256Lys	Gidh-Jain 1993
1	Exon 7	261	c.781G>A	p.Gly261Arg	Stoffel 1992
1	Exon 7	265	c.793G>A	p.Glu265Lys	Galán 2006
3	Exon 7	268	c.802G>T	p.Glu268stop	Pruhova 2003
1	Exon 7	277	c.829_830delinsAG	p.Val277Arg	Novel
1	Intron 7	-1	c.864-1G>C	IVS7-1G>C	Novel
1	Exon 8	294	c.881G>T	p.Gly294Asp	Pruhova 2003
1	Exon 8	295	c.884G>A	p.Gly295Asp	Pruhova 2003
7	Exon 8	315	c.944T>A	p.Leu315His	Pinterova 2007
1	Exon 8	316	c.946T>G	p.Phe316Val	Pinterova 2007
12	Exon 8	318	c.952G>A	p.Gly318Arg	Pruhova 2003
1	Exon 9	377	c.1129C>T	p.Arg377Cys	Osbak 2009
2	Exon 9	383	c.1148C>T	p.Ser383Leu	Barrio 2002
1	Exon 9	385	c.1153G>T	p.Gly385Trp	Novel
1	Exon 9	387	c.1160C>T	p.Ala387Val	Thomson 2003
1	Exon 9	411	c.1233_1238delCinsACCCCA	p.Val 412fs	Novel
1	Exon 10	419	c.1255T>C	p.Phe419Leu	Pinterova 2003
4	Exon 10	434	c.1301G>A	p.Cys434Tyr	Pruhova 2003
1	Exon 10	436	c.1307T>A	p.Ile436Asn	Pinterova 2007
1	Exon 10	442	c.1334G>T	p.Glu442stop	Novel
2	Exon 10	447	c.1340G>A	p.Arg447Gln	Thomson 2003
1	Exon 10	454	c.1361C>A	p.Ala454Glu	Pinterova 2007

hyperglycemia, negative autoimmune markers for type 1 diabetes but seems to have negative family history of diabetes.

The results prove the high prevalence of GCK-MODY in the Czech MODY registry and are consistent with our previous reports (6, 10); however, the prevalence is still lower as compared to the very high proportion of GCK-MODY reported in Spain (3). The probands with GCK-MODY represent the biggest subgroup of patients with defined MODY diagnosis which rank among published data from Germany (13), Italy (12), and France (14) and are in contrast to the

rather low prevalence of GCK-MODY in Norway (12%) (4). Most of the studies agree that the high prevalence of GCK-MODY is as a result of the mode of recruitment of the subjects, which was primarily based on referrals from pediatricians. In pediatric population, the possibility of GCK-MODY being the cause of mild stable hyperglycemia is higher than in the adult population where type 2 diabetes is the leading cause of hyperglycemia. However, we obviously cannot rule out the different genetic background of the studied populations or the possible bias because of low number of subjects in some papers (15).

Novel *GCK* mutations

We found 13 novel and 33 known mutations in the *GCK* gene. These 13 mutations include six missense, four nonsense and three splicing mutations. The amino-acid residues affected by novel mutations p.Gly81Asp, p.Thr209Lys, p.Val226Glu and p.Gly385Trp were described to be disease causing in previous studies: p.Gly81Ser (16), p.Thr209Met (17), p.Val226Met (14) and p.Gly385Val (18). The missense mutations p.Asp124Asn and p.Val277Arg are located in the highly conserved residues among different species (rat, cow, and chicken) implying their functional importance. The novel nonsense mutations p.Asn180fs, p.Val244fs, p.Val412fs, and p.Glu442stop result in truncated proteins which lead to functional consequences. Furthermore, we have found three new splicing mutations IVS2+1G>A, IVS5+1G>T, and IVS7-1G>C. The positions are assumed to affect splicing procedure. As the partial or whole gene deletions may cause MODY (19), the MLPA analysis was performed. No structural variant of the MODY genes was detected in our dataset which corresponds with previous findings that such rearrangements are not a frequent cause of GCK-MODY (20).

The 'Czech' *GCK* mutations

GCK testing in the Czech MODY registry revealed that some mutations such as p.Glu40Lys, p.Gly318Arg, p.Leu315His and p.Val33Ala occur in apparently unrelated families. Interestingly, all these most frequent *GCK* mutations were first reported in the Czech MODY patients (6, 10, 21) and, to our best knowledge, they have not been reported in foreign GCK-MODY patients since then. These findings suggest a founder effect in the Czech population.

Moreover, deeper insight on the regional distribution of our four most prevalent *GCK* mutations revealed that the p.Glu40Lys was detected in the western part of the Czech Republic, whereas the p.Leu315His occurred only in the northeast of the country (Fig. 1). The other most frequent mutations p.Gly318Arg and p.Val33Ala did not show an apparent pattern of distribution in the Czech Republic. Hence, a haplotype construction using single nucleotide polymorphisms or microsatellite markers may clarify the genetic background and distribution of the 'Czech' *GCK* mutations in our dataset.

Founder *GCK* mutations have previously been detected in several countries including Norway (4) and Spain (3). However, the data from Slovakia indicate that although an identical novel mutation (-71G>C *GCK* beta-cell promoter) can be found in several families at a restricted geographic area (22), the origin of the mutation can be independent. We did test the

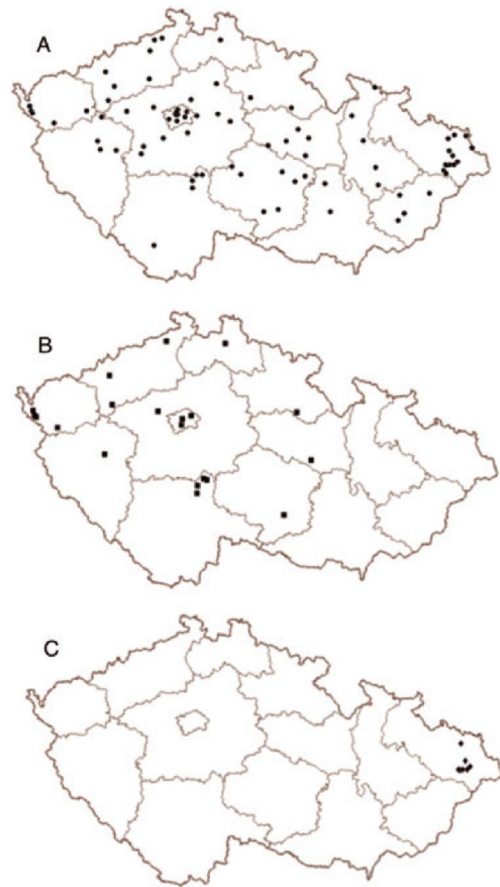


Fig. 1. Regional distribution of glucokinase (*GCK*) mutations in the Czech Republic. The geographical distribution of the cities/villages from which originate all probands with detected mutations in *GCK* gene (A), probands with p.Glu40Lys (B) and p.Leu315His (C). Each spot corresponds to one proband with *GCK* mutation.

region spanning this novel 'Slovak' mutation within the promoter, but neither of our patients was positive.

The reinspection of the dHPLC-negative results

The dHPLC method was used for screening for mutations in several studies (6, 23–25). Although the sensitivity of the dHPLC was expected to reach 92–100% (9), we achieved only 84%. Two different temperatures for heat denaturation as well as various concentrations of acetonitrile buffers were used as recommended by Bountin (9). Nevertheless, the dHPLC as a screening method may give false negative results even if the described optimized methods are used.

In conclusion, in this study, we present a high prevalence of GCK-MODY in a group of carefully clinically selected Czech, mainly pediatric, patients fulfilling the clinical criteria for GCK-MODY and also high prevalence of GCK-MODY among all our MODY probands. Furthermore, we reported several frequent GCK mutations with a possible founder effect in the Czech population. Our data may provide ground for recommendation to reinvestigation of all negative results obtained by screening methods such as dHPLC.

Acknowledgements

The study was supported by a grant 'Monogenic diabetes in childhood: from genetics to therapy' from Norway through the Norwegian Financial Mechanism (No CZ0100) and by an institutional grant from the Czech Ministry of Health (grant MZ000064203).

We appreciate the contribution of patients and their families to the study. The authors would like to thank the following diabetologists who cared for the patients and participated in this study: J. Bartošová, A. Benešová, B. Buzová, M. Cvejn, J. Černá, J. Čížek, K. Dvořáková, J. Fěrová, N. Filáková, P. Frič, R. Hamouzová, P. Hamzová, J. Chocholová, J. Chudáčková, M. Imramovská, L. Jandová, V. Janšová, A. Ježdíková, Z. Ježová, I. Juránková, J. Karasová, V. Karlová, J. Klabochová, M. Klementová, I. Kluzová, L. Kocínová, J. Kopecký, J. Kopřiva, M. Kosák, R. Kula, J. Kylian, P. Kyselová, D. Langová, P. Lisý, J. Malý, P. Mendlová, D. Neumann, E. Nováková, M. Pejchlová, D. Pinková, P. Plicková, K. Poločková, R. Pomahačová, Y. Ptoszková, L. Raclavská, I. Röschlová, F. Saudek, T. Sedláček, V. Sigl, P. Skála, J. Sláma, M. Slavičková, J. Škvor, K. Štechová, H. Štěpánková, H. Taxová, L. Trešlová, J. Vávra, H. Vávrová, J. Venháčová, K. Vondra, J. Vosáhlo, V. Zamrazil, and R. Zemanová. Klára Veselá is acknowledged for her technical assistance.

References

1. 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.
2. VELHO G, FROGUEL P, GLOYN A, HATTERSLEY AT. Maturity onset diabetes of the young type 2. In: MATSCHINSKY FM, ed. *Glucokinase and Glycemic Disease: From Basics to Novel Therapeutics*. Basel: Karger, 2004, 42–64.
3. ESTALELLA I, RICA I, PEREZ DE NANCLARES G et al. Mutations in GCK and HNF-1alpha explain the majority of cases with clinical diagnosis of MODY in Spain. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007; 67: 538–546.
4. SAGEN JV, BJORKHAUG L, MOLNES J, RAEDER H, GREVLE L, SOVIK O et al. Diagnostic screening of MODY2/GCK mutations in the Norwegian MODY Registry. *Pediatr Diabetes* 2008; 9: 442–449.
5. GIUFFRIDA FM, REIS AF. Genetic and clinical characteristics of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes Obes Metab* 2005; 7: 318–326.
6. PRUHOVA S, EK J, LEBL J et al. Genetic epidemiology of MODY in the Czech republic: new mutations in the MODY genes HNF-4alpha, GCK and HNF-1alpha. *Diabetologia* 2003; 46: 291–295.

7. STENSON PD, MORT M, BALL EV et al. The human gene mutation database: 2008 update. *Genome Med* 2009; 1: 13.
8. OSBAK KK, COLCLOUGH K, SAINT-MARTIN C et al. Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Hum Mutat* 2009; 30: 1512–1526.
9. BOUTIN P, VASSEUR F, SAMSON C, WAHL C, FROGUEL P. Routine mutation screening of HNF-1alpha and GCK genes in MODY diagnosis: how effective are the techniques of DHPLC and direct sequencing used in combination? *Diabetologia* 2001; 44: 775–778.
10. PINTEROVA D, EK J, KOLOSTOVA K et al. Six novel mutations in the GCK gene in MODY patients. *Clin Genet* 2007; 71: 95–96.
11. ELLARD S, BELLANNE-CHANTELOT C, HATTERSLEY AT. Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia* 2008; 51: 546–553.
12. 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.
13. SCHOBER E, RAMI B, GRABERT M et al. 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. *Diabet Med* 2009; 26: 466–473.
14. VELHO G, BLANCHE H, VAXILLAIRE M et al. Identification of 14 new glucokinase mutations and description of the clinical profile of 42 MODY-2 families. *Diabetologia* 1997; 40: 217–224.
15. MOISES RS, REIS AF, MOREL V et al. Prevalence of maturity-onset diabetes of the young mutations in Brazilian families with autosomal-dominant early-onset type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24: 786–788.
16. MASSA O, MESCHI F, CUESTA-MUNOZ A et al. Diabetes Study Group of the Italian Society of Paediatric Endocrinology and Diabetes (SIEDP). High prevalence of glucokinase mutations in Italian children with MODY. Influence on glucose tolerance, first-phase insulin response, insulin sensitivity and BMI. *Diabetologia* 2001; 44: 898–905.
17. HAGER J, BLANCHE H, SUN F et al. Six mutations in the glucokinase gene identified in MODY by using a nonradioactive sensitive screening technique. *Diabetes* 1994; 43: 730–733.
18. NG MC, COCKBURN BN, LINDNER TH et al. Molecular genetics of diabetes mellitus in Chinese subjects: identification of mutations in glucokinase and hepatocyte nuclear factor-1alpha genes in patients with early-onset type 2 diabetes mellitus/MODY. *Diabet Med* 1999; 16: 956–963.
19. ELLARD S, THOMAS K, EDGHILL EL et al. Partial and whole gene deletion mutations of the GCK and HNF1A genes in maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia* 2007; 50: 2313–2317.
20. GARIN I, RICA I, ESTALELLA I et al. Haploinsufficiency at GCK gene is not a frequent event in MODY2 patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008; 68: 873–878.
21. LUKASOVA P, VCELAK J, VANKOVA M, VEJRAZKOVA D, ANDELOVA K, BENDLOVA B. Screening of mutations

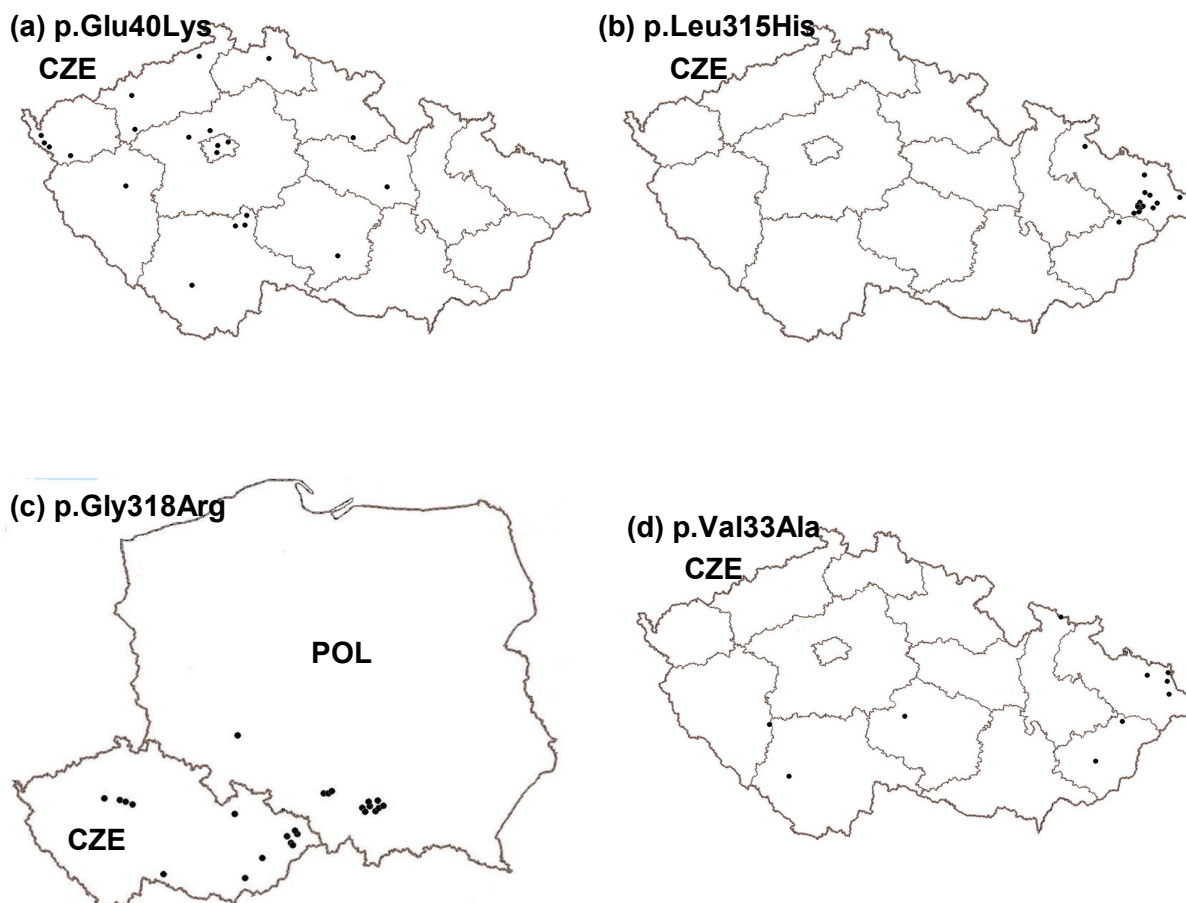
- and polymorphisms in the glucokinase gene in Czech diabetic and healthy control populations. *Physiol Res* 2008; 57 (Suppl. 1): S99–S108.
22. GASPERIKOVA D, TRIBBLE ND, STANIK J et al. Identification of a novel beta-cell glucokinase (GCK) promoter mutation (–71G>C) that modulates GCK gene expression through loss of allele-specific Sp1 binding causing mild fasting hyperglycemia in humans. *Diabetes* 2009; 58: 1929–1235.
 23. FORSYTH L, HUME R, HOWATSON A, BUSUTTIL A, BURCHELL A. Identification of novel polymorphisms in the glucokinase and glucose-6-phosphatase genes in infants who died suddenly and unexpectedly. *J Mol Med* 2005; 83: 610–618.
 24. CHRISTESEN HB, TRIBBLE ND, MOLVEN A et al. Activating glucokinase (GCK) mutations as a cause of medically responsive congenital hyperinsulinism: prevalence in children and characterisation of a novel GCK mutation. *Eur J Endocrinol* 2008; 159: 27–34.
 25. 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.

4.2 Efekt zakladatele prevalentních mutací v GCK

P. Dušátková, Š. Průhová, M. Borowiec, K. Veselá, K. Antosik, J. Lebl, W. Mlynarski, O. Cinek: Ancestral mutations may cause a significant proportion of GCK-MODY. *Pediatric Diabetes*. V tisku.

Při přípravě publikace o GCK-MODY v České republice (**kapitola 4.1**) jsme detekovali dosud nejvyšší počet nepříbuzných rodin, které nesly shodnou mutaci v genu GCK: 21 rodin s p.Glu40Lys, 15 rodin s p.Leu315His, 13 rodin s p.Gly318Arg a 10 rodin s p.Val33Ala. Díky následné spolupráci s kolegy z Polska se nám podařilo rozšířit soubor rodin s mutací p.Gly318Arg o dalších 13 polských rodin. Dalším zajímavým jevem bylo, že rodiny s určitými mutacemi pocházely z geograficky ohraničených oblastí České republiky a Polska (obrázek 7). Tyto skutečnosti indikovaly, že zmíněné mutace v GCK mohly vzniknout a rozšířit se díky efektu zakladatele.

Obrázek 7. Geografická distribuce rodin nesoucích mutace p.Glu40Lys (a), p.Leu315His (b), p.Gly318Arg (c) a p.Val33Ala (d).



Možný vztah mezi nepříbuznými rodinami se stejnou mutací jsme analyzovali pomocí genetických markerů (jednonukleotidových polymorfizmů) obklopujících gen *GCK*. Evolučně staré mutace jsou totiž přenášeny z generace na generaci jako součást ancestrálního haplotypu, tzn. spolu s unikátní kombinací alel okolních markerů.

Pomocí haplotypové analýzy jsme prokázali, že 3 ze 4 studovaných mutací, p.Glu40Lys, p.Leu315His a p.Gly318Arg, vznikly díky efektu zakladatele. Využitím daného setu genetických markerů se nám nepodařilo prokázat ancestrální původ mutace p.Val33Ala. Důvodem je pravděpodobně malá statistická síla v důsledku nízkého počtu dostupných rodin. Následně jsme pomocí statistického nástroje využívajícího demografické údaje odhadli pravděpodobné stáří ancestrálních mutací, které se pohybovalo mezi 82 a 110 generacemi.

Předkládaná studie se jako vůbec první zabývala detailně studiem efektu zakladatele u jednoho ze subtypů MODY. Ukázali jsme, že mutace v *GCK* jsou evolučně staré a ve shodě s předchozí prací studující komplikace u GCK-MODY (**kapitola 4.6**) naše data ukazují, že pacienti s GCK-MODY byli fertlní a přenášeli mutace dalším generacím i v minulosti.

Original Article

Ancestral mutations may cause a significant proportion of GCK-MODY

Dusatkova P, Pruhova S, Borowiec M, Vesela K, Antosik K, Lebl J, Mlynarski W, Cinek O. Ancestral mutations may cause a significant proportion of GCK-MODY.

Pediatric Diabetes 2011; 0: 000–000.

Background: Although the literature indicates that ancestral mutations in the glucokinase (*GCK*) gene are rare, we have detected a high frequency of four prevalent mutations that together are responsible for over one third of the *GCK* mutations in our Czech National Register of monogenic diabetes. Therefore, we studied their potential ancestral origin in our and neighbouring Polish populations.

Methods: We analysed the lineage of four mutations in the *GCK* gene – p.Glu40Lys (21 apparently unrelated families), p.Leu315His (15 families), p.Gly318Arg (26 families), and p.Val33Ala (10 families) – using genotypes of 16 single nucleotide polymorphisms that span a 14 Mb region around the gene. Haplotypes were reconstructed using PHASE and HAPLOVIEW programmes, and their age was estimated using DMLE+.

Results: We found a strong evidence that supports ancestral origin of three of the four mutations: the p.Glu40Lys mutation was associated with an 11-marker long conserved haplotype, the p.Leu315His mutation was associated with a 7-marker haplotype, and the p.Gly318Arg mutation was associated with an 8-marker haplotype. None of these haplotypes were detected in the general population with a frequency >0.5%. The ages of the mutations were roughly estimated to be between 82 and 110 generations old (95% credible sets 65–151). The fourth prevalent mutation, p.Val33Ala, lacked statistically significant evidence for the founder effect, although there were some indications for its common origin.

Conclusions: The large proportion of families carrying three ancestral mutations in *GCK* indicates that the previously assumed rarity of the founder effect with regard to *GCK*-maturity onset diabetes of the young (MODY) should be reconsidered.

**Petra Dusatkova^a,
Stepanka Pruhova^a, Maciej
Borowiec^b, Klara Vesela^a,
Karolina Antosik^b, Jan
Lebl^a, Wojciech Mlynarski^b
and Ondrej Cinek^a**

^aDepartment of Paediatrics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, CZ-150 06, Prague, Czech Republic; and ^bDepartment of Paediatrics, Oncology, Hematology and Diabetology, Medical University of Lodz, PL-91 738, Lodz, Poland

Key words: founder effect – GCK-MODY – haplotype analysis – mutation age estimation

Corresponding author: Ondrej Cinek, Department of Paediatrics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, University Hospital Motol, V Úvalu 84, CZ-150 06 Prague, Czech Republic.
Tel: +420 224 432 026;
fax: +420 224 432 020;
e-mail: ondrej.cinek@Lfmotol.cuni.cz

Submitted 22 June 2011. Accepted for publication 2 December 2011

Glucokinase MODY (GCK-MODY, MODY2) is a common form of maturity onset diabetes of the young (MODY) that is caused by heterozygous inactivating mutations in the glucokinase (*GCK*) gene (1, 2). Over 600 different causative mutations have been described (3), which are uniformly distributed over the entire gene, except for in exon 1. The generally accepted opinion is that a vast majority of families with GCK-MODY carry their own specific mutation (4). However, exceptions to these private mutations exist, as recurrent mutations have been documented.

Generally, the recurrent mutations in a gene might be caused either by the presence of mutation hot-spot or

by a founder effect. The mutation hot-spot corresponds to the region of genome which is susceptible to the genesis of new mutations mostly due to nucleotide composition (e.g., CpG nucleotides). Mutations that arose by this phenomenon are equally distributed in different populations. On the other hand, an ancestral mutation is regionally or culturally restricted because of its origin from a founder population.

In the GCK-MODY, several mutations have been shown to arise from common ancestors: a mutation which was reported in five apparently unrelated families in Oxford (p.Gly299Arg mutation) (5), a mutation in five families in Quebec (p.Val226Met)

(6), three mutations in Spain (p.Val182Leu in three families from Cantabria, p.Glu399X in two families from Albacete, and p.Ala379Val in two families from Basquete) (7), a mutation in six families from Norway (p.Glu339Gly) (8), and a mutation in five families in Slovakia (c.-71G>C) (9). However, the evidence in support of the common origin of the above reported that recurrent mutations are often limited by the number and span of markers (at most, seven markers that span approximately 7 Mb (9)), and previous studies lack estimates regarding the age of the mutations.

In the National Czech MODY Register, we identified a notable number of unrelated families with GCK-MODY who carry the same missense mutations: p.Glu40Lys, p.Leu315His, p.Gly318Arg, and p.Val33Ala. Together, these four recurrent mutations constitute over one third of all genetically confirmed cases of the disease. This led us to ask the central MODY laboratory in neighbouring Poland about the occurrence of these four mutations, and together we established the collection of the Czech and Polish families carrying these prevalent mutations. Within the Czech population, p.Glu40Lys and p.Leu315His are restricted to a particular region (Fig. 1). This fact strongly suggests that the founder effect may be responsible for the observed distribution of these mutations.

The aim of our study was to determine whether the founder effect is responsible for the distribution of these recurrent mutations and to estimate when these mutations arose.

Methods

Clinical characteristics of the subjects and genetic diagnosis

The families that were analysed were identified by the Czech and Polish nation-wide MODY registers, which are based on referrals from both paediatric and adult diabetologists. To date, the registers have identified 152 Czech and 68 Polish families with GCK-MODY. We have analysed 157 mutation carriers and their 47 healthy relatives negative for the respective familial mutation, namely 21 Czech families with the p.Glu40Lys mutation (52 mutation carriers and 13 healthy relatives), 15 Czech families with the p.Leu315His mutation (34 mutation carriers and 19 healthy relatives), 26 families (13 Czech and 13 Polish, altogether 51 mutation carriers and 11 healthy relatives) with the p.Gly318Arg mutation, and 10 Czech families (20 mutation carriers and 4 healthy relatives) with the p.Val33Ala mutation. The families with the same mutation were considered as unrelated if having different family names back to the third generation. Median age at investigation of the healthy relatives was 41 yr, interquartile range 34.5–49.0 yr. The clinical data on the carriers of the mutations were as follows: median age at investigation 26.5 yr (interquartile range 16.0–42.0), median age at diagnosis 15.5 yr (9.0–25.0), median body mass index 22.3 kg/m² (19.3–24.8), median fasting glycaemia level 6.4 mmol/L (6.0–7.0), and median glycated haemoglobin (DCCT scale) 6.6% (6.2–7.1). The genetic diagnosis of the families was performed using direct

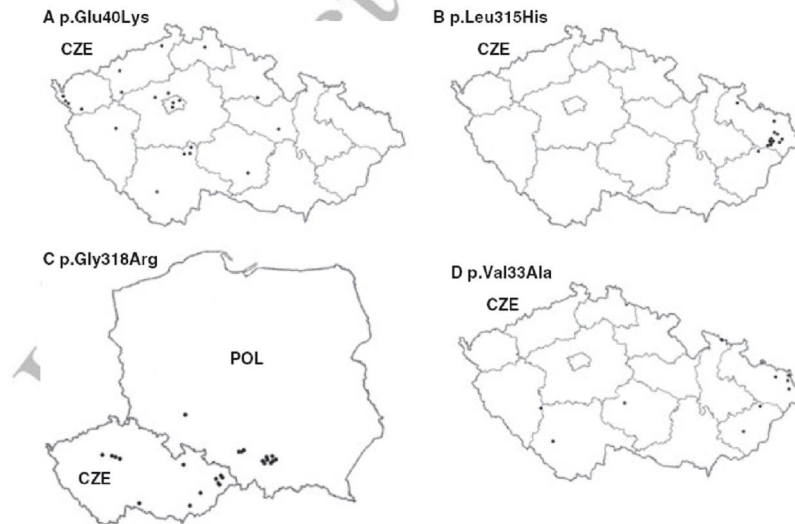


Fig. 1. Geographical distribution of the families carrying recurrent mutations. The distribution of mutations is shown within the Czech Republic (A, B, and D) or the Czech Republic and Poland (C).

Sanger sequencing of polymerase chain reaction (PCR) products (10, 11).

The background marker and haplotype frequencies were established using samples from 94 unrelated non-diabetic control subjects that were consecutively recruited from paediatric patients who underwent minor surgical interventions at the Department of Paediatric Surgery, University Hospital Motol, Prague. The subjects had normal fasting blood glucose levels and no history of diabetes. This study was approved by the Institutional Ethics Committee, and written informed consent was obtained from all participants or their guardians.

SNP typing

To assess whether a mutation had a common origin, we analysed 16 single nucleotide polymorphisms (SNPs) whose minor allele frequencies are reported to be between 37 and 50% in subjects of European ancestry (12). None of the markers were in linkage disequilibrium (LD) with the others according to the HapMap Project database. The markers covered a 14 Mb region (i.e., 9.2 cM for male and 25 cM for female genetic map based on Rutgers Combined Map) around the *GCK* gene: rs2718177, rs6964434, rs10259786, rs10256791, rs12701941, rs4720444, rs11763891, rs1181603, rs2595650, rs2971674, rs6950488, rs217355, rs10242353, rs4917157, rs4286894, and rs4947757. The genotypes of the markers were determined using the TaqMan SNP genotyping assays, which were run using the Universal Master Mix (both Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and a 384-well format LightCycler 480 machine (Roche, Basel, Switzerland). The end-point readings were analysed according to the manufacturer's instructions. To ensure consistency between runs, identical samples of all the three genotypes were repeated in every PCR run.

Statistical analysis

Haplotype analysis. The genotypes of 16 SNPs, the mutations, and family status were analysed using HAPLOVIEW software (13) to detect possible LD between the markers and the mutations. In addition, the PHASE programme implementing the Markov chain Monte Carlo algorithm (14) was used to estimate the haplotype phases based only on population data because the parents of several of the probands were unavailable.

The lack of LDs between the markers in the general population was verified using 94 control subjects; their genotypes neither departed from Hardy–Weinberg law nor displayed significant mutual LD (all $D' \leq 0.40$, $r^2 \leq 0.17$) (Fig. S1E, Supporting information).

Evolutionary tree reconstruction. Evolutionary history was inferred using MEGA5 software (15), which utilizes the UPGMA clustering method (16). The test of the molecular clock hypothesis (equal evolution rate) was performed by comparing the maximum-likelihood value for the given tree topology with and without the molecular clock constraints as per the Tamura–Nei model (17). The null hypothesis of the constant rate of evolution was not rejected for any of the mutations (p-values: p.Glu40Lys, 0.991; p.Leu315His, 0.538; p.Gly318Arg, 0.769).

Estimation of mutation age. Subsequently, the genetic markers that were in LD were used to estimate the age of the mutation using DMLE+ software (18). Three parameters were set: the duration of one generation, the population growth rate, and the proportion of the population that was sampled. The programme was run in the genotype mode. One generation was set to last 25 yr. The population growth rate was estimated with the formula $N = N_0 \times e^{gr}$, where N represents actual population size (10 230 060 inhabitants in the Czech Republic and 38 116 000 in Poland), N_0 is the population size at different times, g is number of generations between N and N_0 , and r is the natural logarithm of population growth per generation. According to data from the Czech Statistical Office (www.czso.cz), the average growth rate from 1100 AD to now is approximately 0.078. Similar data can be obtained from the Central Statistical Office of Poland (www.stat.gov.pl). The proportion of the population that was sampled was determined with the assumption that 2% of all diabetic patients are suffering from monogenic diabetes (19). *GCK-MODY* is predicted to make up an average of 35% of monogenic diabetes (20). Therefore, the proportion of the population that was tested was estimated to be 0.004 for p.Glu40Lys, 0.003 for p.Leu315His, and 0.001 for p.Gly318Arg (Czech and Polish epidemiological data included).

Importantly, it has been repeatedly shown that the DMLE+ method is crucially dependent on the demographic parameters (21, 22). Therefore, a sensitivity analysis was performed with minimum (0.03) and maximum (0.102) growth rate, and with a different proportions of chromosomes carrying mutations (0.0004, 0.004, and 0.009 for p.Glu40Lys; 0.0003, 0.003, and 0.008 for p.Leu315His; and 0.0001, 0.001, and 0.007 for p.Gly318Arg). Further, results utilizing male and female genetic distances were compared.

Results

We observed that three of the recurrent mutations (p.Glu40Lys, p.Leu315His, and p.Gly318Arg) were associated with conserved haplotypes. The most

conserved was the haplotype surrounding the p.Glu40Lys mutation, which extended over 11 SNPs in 51 of the 52 carriers (AAGACGGAGGCG; the mutation is highlighted in bold and the sequences of the SNP alleles are shown in order from telomere to centromere). The haplotype of the remaining subject was only different at three of the markers (Table 1A and Fig. S1A). The conserved haplotype around the p.Leu315His mutation extended over seven SNPs (ATAGAGGT) spanning 1.4 Mb (Table 1B and Fig. S1B). Finally, both Czech and Polish subjects with the p.Gly318Arg mutation had a haplotype that extended over eight markers and spanned 4 Mb (ATAGAGCTG) (Table 1C and Fig. S1C). No significant haplotype could be defined for the p.Val33Ala mutation (Table 1D and Fig. S1D), although the analysis indicated a tendency towards LD with the nearest markers.

Clustering analyses that show the evolutionary relationship of families with *GCK* mutations are presented in Fig. S2. These analyses indicate that the p.Leu315His mutation arose from a restricted region in the northeast part of the Czech Republic (Fig. S2B), and also confirm that the Czech and Polish families that carry the p.Gly318Arg mutation share a common genetic background (Fig. S2C).

The time when these mutations appeared in the Central European population was estimated using markers from the ancestral haplotypes. The p.Glu40Lys mutation was estimated to have appeared 82 generations ago (95% credible set 65–119 generations), the p.Leu315His mutation 91 generations ago (95% credible set 71–130 generations), and the p.Gly318Arg mutation 110 generations ago (95% credible set 92–151 generations). However, the sensitivity analyses revealed a high variability of the results: the estimates ranged almost threefold depending on the population growth rate and almost twofold depending on the proportion of the mutated chromosomes (data shown in Fig. S3 and its footnote).

Discussion

In this study, we demonstrated that the founder effect is responsible for the distribution of the glucokinase mutations: p.Glu40Lys, p.Leu315His, and p.Gly318Arg. All three are carried on considerably long ancestral haplotypes that are not present in the background population. Our study differs from the previously published works (5–9) in that we used a considerably larger number of apparently unrelated families (10–26 per one mutation) and a higher number of SNP markers, and estimated the age of the mutations. The estimation of mutation age was performed using the DMLE+ programme which is one of the most accurate prediction programmes (23) because

it utilizes the time of mutation genesis rather than the period of existence of the most recent common ancestor (24). Its accuracy, however, critically depends on the input data from the studied population, which was demonstrated also by our sensitivity analysis (Fig. S3).

The collaboration of two national MODY collections decreased the likelihood of overlooking a prevalent recurrent mutation, but we understand that our collection, similar to other MODY collections, contains just the tip of the GCK-MODY iceberg. This limitation is manifested by the p.Val33Ala mutation whose ancestral origin could not be statistically proven with the data from 10 families, although indications of LD were observed (Table 1D and Fig. S1D). We hypothesize that even a single early recombination event may have severely decreased our power to confirm the identity by descent of this less prevalent recurrent mutation. The count of 10 families with this recurrent mutation is higher than any of the so far published ancestral *GCK* mutations, yet the power to detect the founder effect is still insufficient; therefore, many more similar ancestral mutations may be still hidden undetected in various populations.

The exact estimation of the age of the three ancestral mutations is utmost difficult due to high degree of uncertainty for all of the input parameters (especially the population growth rate and proportion of mutated chromosomes; Fig. S3). It, however, appears that the three mutations do not dramatically differ from each other with respect to their age of origin (approximately 30% difference in age between the oldest and youngest mutation). Therefore, the extent of their geographic distribution might illustrate how the spread of these mutations was dependent on the magnitude and routes of migration from the founder populations. The p.Leu315His mutation is mostly confined to a relatively small, ethnographically restricted region in the northeast part of the Czech Republic, called *Lašsko*. *Lašsko* is characterised by a common dialect and culture (25). However, its geographical limits are vague, and the population has never been considered isolated. The prevalent p.Glu40Lys mutation has spread throughout the western part of the Czech Republic, yet it is has not been detected in the neighbouring countries; but, interestingly, one Irish family was observed carrying this mutation (4). Similarly, the third ancestral mutation, p.Gly318Arg, was observed not only in the Czech Republic and in the neighbouring Polish cities of Katowice, Krakow, and Wroclaw, but also in three families from UK, USA, and Canada (4). We are not able to assess the relationship between Middle-European and the other carriers.

In conclusion, we present strong evidence that three recurrent mutations in the *GCK* gene are ancestral.

Table 1. Ancestral haplotypes of the four ancestral mutations (A) Mutation p.Glu40Lys

SNP	rs2718177		rs6964434		rs10259786		rs10256791		rs12701941		rs4720444		rs11763891		rs1181603		rs2595650		p.Glu40Lys		rs2971674		rs6950488		rs217355		rs10242353		rs4917157		rs4286894		rs4947757							
	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G							
Genotype	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A					
Physical distance (Mb)	1.3	1.5	0.9	1.5	1.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1			
Genetic distance, female (cM)	3.2	2.6	0.6	2.7	2.3	0.5	0.5	0.4	0.6	0.6	0.9	0.9	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4			
Genetic distance, male (cM)	1.6	0.8	0.7	1.8	0.9	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1		
CZ_404	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A		
CZ_410	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
CZ_441	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CZ_443	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CZ_445	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CZ_510	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CZ_511	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CZ_517	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CZ_528	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CZ_664	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CZ_669	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CZ_709	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CZ_710	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CZ_741	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CZ_766	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CZ_769	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CZ_790	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CZ_794	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CZ_799	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CZ_852	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CZ_853	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Table 1. Continued
 (B) Mutation p.Leu315His

SNP	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	T/A	A/G	C/G	C/T	A/G	A/G	C/T	A/G	
r54947757																
r54286894																
r54917157																
r510242353																
r5217355																
r56950488																
r52971674																
p.Leu315His																
r52959550																
r51181603																
r511763891																
r54720444																
r512701941																
r510256791																
r510259786																
r56964434																
r52718177																
Genotype	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G
Physical distance (Mb)	1.3	1.5	0.9	1.5	1.3	0.3	0.3	0.2	0.2	0.3	0.1	0.1	0.2	0.3	0.1	0.2
Genetic distance, female (cM)	3.2	2.6	0.6	2.7	2.3	0.5	0.5	0.4	0.6	0.9	0.4	0.4	0.9	0.4	0.4	0.6
Genetic distance, male (cM)	1.6	0.8	0.7	1.8	0.9	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1
CZ_402	A	G	A	A	A	A	A	T	A	A	G	T	A	A	A	T
CZ_405	G	A	G	A	A	A	T	T	A	A	G	T	A	A	A	T
CZ_413	G	G	A	A	A	A	T	A	G	A	G	T	A	A	A	T
CZ_507	A	G	A	A	A	A	T	A	A	A	G	T	A	A	T	A
CZ_675	A	G	A	A	A	A	T	A	A	A	G	T	A	A	C	G
CZ_696	G	G	A	A	A	A	T	A	G	A	G	T	A	A	T	A
CZ_747	G	A	A	G	G	A	T	A	A	A	G	T	A	A	T	A
CZ_844	G	G	A	G	G	A	T	A	A	A	G	T	A	A	T	A
CZ_849	G	G	A	G	G	A	T	A	A	A	G	T	A	A	T	A
CZ_870	A	A	G	G	G	A	T	A	A	A	G	T	A	A	T	G
CZ_893	G	G	A	G	G	A	T	A	A	A	G	T	A	C	A	A
CZ_920	G	G	A	G	G	A	T	A	A	A	G	T	A	G	T	A
CZ_926	G	G	A	G	G	A	T	A	A	A	G	T	A	G	T	G
CZ_928	A	G	A	A	A	A	T	A	A	A	G	T	A	G	T	A
CZ_955	G	G	A	G	G	A	T	A	A	A	G	T	A	A	T	A

Table 1. Continued
(D) Mutation p.Val83Ala

SNP	rs2718177	rs6964434	rs10259786	rs10256791	rs12701941	rs4720444	rs11763891	rs1181603	rs2595650	p.Val83Ala	rs2971674	rs6950488	rs217355	rs10242353	rs4917157	rs4286894	rs4947757
Genotype	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	C/T	A/G	T/C	A/G	C/G	C/T	A/G	A/G	C/T	A/G	A/G
Physical distance (Mb)	1.3	1.5	0.9	1.5	1.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.1	2.7	1.2	1.2	1.0	
Genetic distance, female (cM)	3.2	2.6	0.6	2.7	2.3	0.5	0.5	0.4	0.6	0.9	0.4	4.9	1.8	1.7	1.9		
Genetic dist, male (cM)	1.6	0.8	0.7	1.8	0.9	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	1.3	0.4	0.6	0.6		
CZ_501	G	A	A	A	A	G	A	T	G	C	G	G	T	A	G	C	G
CZ_671	A	G	A	A	A	G	T	G	G	C	G	G	T	G	A	T	A
CZ_697	G	A	A	G	G	G	T	G	G	C	G	G	T	A	G	T	G
CZ_770	A	G	A	A	A	G	T	G	G	C	G	G	T	G	A	T	G
CZ_771	G	G	A	A	A	G	T	G	G	C	G	G	T	G	A	C	G
CZ_875	G	A	A	A	A	G	T	G	G	C	G	G	T	G	G	T	A
CZ_883	G	A	A	A	A	G	T	G	G	C	G	G	T	A	G	C	A
CZ_961	A	A	A	A	A	G	T	G	G	C	C	C	C	A	G	T	A
CZ_976	A	A	G	G	A	G	T	G	G	C	G	G	T	A	G	C	A
CZ_985	A	A	G	G	G	G	T	G	G	C	G	G	T	A	G	T	A
CZ_501	G	A	A	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	A	G	C	G

SNP, single nucleotide polymorphism. Each unrelated family is represented by the proband. The distance between each of the two of the neighbouring markers is expressed by physical distance (in megabases, Mb) and by genetic distance for both females and males based on Rutgers Combined Map (in centiMorgans, cM). The mutation is shown in bold. The conserved haplotype, on which the mutations are carried, is delimited by thick vertical lines. The same genotype for each of the markers is highlighted by white or grey colour. *The haplotype ATAGAGCTG was present in 44 of 51 patients in the joint Czech–Polish dataset. All mutation carriers from Polish families had the same ancestral haplotype, while one Czech family (two patients; represented by proband CZ_654) differed by two markers. In three additional Czech families, three patients carry a single modification in the ancestral haplotype. †The family originated from southern Poland and immigrated to Germany in the early 1950s. They were recruited from Munich, Germany.

Their high occurrence in the MODY collections of the Czech Republic (one of three families) and Poland (one of five families) may indicate that the previously assumed rarity of the founder effect with regard to GCK-MODY should be reconsidered. This work may have implications for future genetic testing strategies, as genotyping of a single substitution can be done at a fraction of the cost, labour, and time needed for sequencing the whole gene and is possible as the first step in genetic investigation in a population like ours.

Acknowledgements

The authors would like to thank the patients and their families for their participation in this study as well as their physicians for their collaboration. Additionally, we would like to thank Dr Peter Meyer from the Institut für Molekulare Medizin in München, Germany, for providing DNA samples from a family who originally came from southern Poland and Prof. Iwar Klimes from Bratislava, Slovakia, for providing us with information on GCK-MODY in Slovakia.

The study was supported by the Grant Agency of the Charles University in Prague (GAUK 0840/2010) and the Czech Ministry of Health (grant MZ NT/11402).

The recruitment and mutation analysis of the *GCK* gene in Polish samples was funded by the Innovative Economy Operational Programme – Activity 1.2 (TEAM Programme coordinated by the Foundation for Polish Science) and the Ministry of Science and Higher Education (grant numbers: N407 277734, N402 478137, and N407 022535).

Conflict of interest

The authors have no relevant conflicts of interest.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. Plots of linkage disequilibria (LDs) for the four analysed recurrent mutations. Observed LD among families carrying (A) p.Glu40Lys, (B) p.Leu315His, (C) p.Gly318Arg, and (D) p.Val33Ala. The tab (E) displays the lack of LD in our control population. The colours are displayed as follows: bright red represents $LOD \geq 2$ and $D' = 1$, shade of red $LOD \geq 2$ and $D' < 1$, blue $LOD < 2$ and $D' = 1$, brightly pink $LOD < 2$ and $D' > 0.5$, and white $LOD < 2$ and $D' < 0.5$.

Fig. S2. Evolutionary relationships of families carrying *GCK* mutations: (A) p.Glu40Lys, (B) p.Leu315His, and (C) p.Gly318Arg.

Fig. S3. Sensitivity analyses of DMLE+ estimates.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

References

- HATTERSLEY AT, TURNER RC, PERMUTT MA et al. Linkage of type 2 diabetes to the glucokinase gene. *Lancet* 1992; 339: 1307–1310.
- VIONNET N, STOFFEL M, TAKEDA J et al. Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 1992; 356: 721–722.
- STENSON PD, MORT M, BALL EV et al. The Human Gene Mutation Database: 2008 update. *Genome Med* 2009; 1: 13.
- OSBAK KK, COLCLOUGH K, SAINT-MARTIN C et al. Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Hum Mutat* 2009; 30: 1512–1526.
- SAKER PJ, HATTERSLEY AT, BARROW B et al. High prevalence of a missense mutation of the glucokinase gene in gestational diabetic patients due to a founder-effect in a local population. *Diabetologia* 1996; 39: 1325–1328.
- HENDERSON M, LEVY E, DELVIN E, LOSEKOOT M, LAMBERT M. Prevalence and clinical phenotype of the p.Val226Met glucokinase gene mutation in French Canadians in Quebec, Canada. *Mol Genet Metab* 2007; 90: 87–92.
- ESTALELLA I, RICA I, PEREZ DE NANCLARES G, et al. Mutations in GCK and HNF-1alpha explain the majority of cases with clinical diagnosis of MODY in Spain. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007; 67: 538–546.
- SAGEN JV, BJORKHAUG L, MOLNES J et al. Diagnostic screening of MODY2/GCK mutations in the Norwegian MODY Registry. *Pediatr Diabetes* 2008; 9: 442–449.
- GASPERIKOVA D, TRIBBLE ND, STANIK J et al. Identification of a novel beta-cell glucokinase (GCK) promoter mutation (–71G>C) that modulates GCK gene expression through loss of allele-specific Sp1 binding causing mild fasting hyperglycemia in humans. *Diabetes* 2009; 58: 1929–1935.
- BOROWIEC M, ANTOSIK K, FENDLER W et al. Novel glucokinase mutations in patients with monogenic diabetes - clinical outline of GCK-MD and potential for founder effect in Slavic population. *Clin Genet*. In press.
- PRUHOVA S, DUSATKOVA P, SUMNIK Z et al. Glucokinase diabetes in 103 families from a country-based study in the Czech Republic: geographically restricted distribution of two prevalent GCK mutations. *Pediatr Diabetes* 2010; 11: 529–535.
- International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature* 2003; 426: 789–796.
- BARRETT JC, FRY B, MALLER J, DALY MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; 21: 263–265.
- STEPHENS M, SMITH NJ, DONNELLY P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 978–989.
- TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, KUMAR S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24: 1596–1599.
- SNEATH PHA, SOKAL RR. Numerical Taxonomy. San Francisco, CA: Freeman, 1973.

Dusatkova et al.

17. TAMURA K, NEI M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 1993; 10: 512–526.
18. REEVE JP, RANNALA B. DMLE+: Bayesian linkage disequilibrium gene mapping. *Bioinformatics* 2002; 18: 894–895.
19. LEDERMANN HM. Is maturity onset diabetes at young age (MODY) more common in Europe than previously assumed? *Lancet* 1995; 345: 648.
20. VAXILLAIRE M, FROGUEL P. Monogenic diabetes in the young, pharmacogenetics and relevance to multifactorial forms of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2008; 29: 254–264.
21. ALLER E, LARRIEU L, JADO T et al. The USH2A c.2299delG mutation: dating its common origin in a Southern European population. *Eur J Hum Genet* 18: 788–793.
22. CORNES BK, TANG CS, LEON TY et al. Haplotype analysis reveals a possible founder effect of RET mutation R114H for Hirschsprung's disease in the Chinese population. *PLoS One* 5: e10918.
23. GREENWOOD CM, SUN S, VEENSTRA J et al. How old is this mutation? - a study of three Ashkenazi Jewish founder mutations. *BMC Genet* 11: 39.
24. RANNALA B, BERTORELLE G. Using linked markers to infer the age of a mutation. *Hum Mutat* 2001; 18: 87–100.
25. VACHOVA Z. K vyvoji slezskych oblasti lidove kultury. *Cesky lid* 1969; 56: 9–12.

Uncorrected Proofs

4.3 HNF1A-MODY s makrosomií a hypoglykemií

P. Dušátková, Š. Průhová, Z. Šumník, S. Koloušková, B. Obermannová, O. Cínek, J. Lebl: *HNF1A* mutation presenting as fetal macrosomia and hypoglycemia in childhood prior to onset of overt diabetes. *J Pediatr Endocr Met* 2011, 24 (5-6): 377-379.

Klinický obraz pacientů s HNF1A-MODY a HNF4A-MODY je velice podobný, pravděpodobně díky autoregulační smyčce mezi transkripčními faktory HNF1A a HNF4A, které jsou součástí transkripční sítě působící na děje v β buňce. Ovšem neonatální hyperinzulinémická hypoglykémie a makrosomie byla popsána pouze u pacientů s HNF4A-MODY (Pearson, 2007).

Naše skupina publikovala případ probanda, jehož porodní váha ve 43. gestačním týdnu byla 4750 g (+1,99 SD) a porodní délka 59 cm (+3,51 SD). Křeče nejasné etiologie s pozitivními ketolátkami se u něj objevily první den života a opakovaly se ještě několikrát během raného dětství vždy v souvislosti s fyzickou aktivitou a nedostatečným přísunem energie. Avšak hladina glykémie byla změřena až při jednom z dalších záchvatů v 9 letech a dosáhla 2,2 mmol/l. V 19 letech byla u probanda detekována glykosurie a následně diabetes mellitus s ihned započatou léčbou inzulínem. Diabetes mellitus se projevil u probandovy dcery (porodní váha: +1,02 SD, porodní délka: +1,29 SD) v jejích 16 letech polyurií. Kvůli pozitivní rodinné anamnéze diabetu jsme provedli genetické vyšetření a našli jsme heterozygotní mutaci v genu *HNF1A* u probanda i jeho dcery.

Demonstrovali jsme tak pravděpodobně první případ asociace makrosomie a ketotických hypoglykemií v dětství s HNF1A-MODY, ačkoli jsme si vědomi neúplných klinických informací o předpokládané hypoglykémii probanda v jeho dětství.

***HNF1A* mutation presenting with fetal macrosomia and hypoglycemia in childhood prior to onset of overt diabetes**

Petra Dušátková, Štěpánka Průhová, Zdeněk Šumník, Stanislava Koloušková, Barbora Obermannová, Ondřej Cinek and Jan Lebl*

Department of Pediatrics, University Hospital Motol and Second Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

Abstract

Background: *HNF1A*-MODY (*MODY3*) is a common subtype of autosomal dominant diabetes. Unlike *HNF4*-MODY where fetal macrosomia and early postnatal hyperinsulinemic hypoglycemia have been reported, a history of transient insulin overproduction has not been recognized in individuals with *HNF1A*-MODY yet.

Case report: Here, we report a 40-year-old male patient with *HNF1A* mutation p.Arg272His (c.815G>A) with a history of fetal macrosomia (4750 g, 59 cm) and, at least, one attack of symptomatic hypoglycemia in childhood. Diabetes was subsequently diagnosed at 19 years. The proband's daughter who developed diabetes at 16 years carries the same mutation, but her birth weight and length were in the upper normal range, and she never experienced hypoglycemic symptoms.

Conclusion: The observation of fetal macrosomia and hypoglycemia in childhood is suggestive of a biphasic impact of the *HNF1A* mutation on β -cell function over the lifespan, leading from inappropriate insulin oversecretion to final clinical diabetes.

Keywords: diabetes; *HNF1A*-MODY; hypoglycemia; macrosomia.

Introduction

HNF1A and *HNF4A* are essential components of the β -cell transcriptional network. Their heterozygous mutations are causative of *HNF1A*-MODY (*MODY3*) and *HNF4A*-MODY (*MODY1*) – two subtypes of monogenic diabetes with a similar clinical course. However, the recently described association of neonatal hyperinsulinemic hypoglycemia and macrosomia

in *HNF4A* but not *HNF1A* mutation carriers (1–3) suggested that the β -cell transcriptional network can act differently over the lifespan.

History and examination

We report the clinical history of a 40-year-old male proband born from a first uneventful pregnancy of a 31-year-old healthy non-diabetic mother in the 43rd gestational week. His birth weight was 4750 g (+1.99 SD) and birth length 59 cm [+3.51 SD; normative values according to Lawrence et al. (4)]. On the first day of life, after 6 h of adequate spontaneous ventilation, he experienced apnea and hypertonic convulsions. The tonic-clonic convulsions occurred repeatedly up to day 3, until the introduction of sufficient breastfeeding. The proband suffered from recurrent convulsions during febrile respiratory tract infections accompanied by loss of appetite at the age of 16 months, 3 years, 4.5, 5, and 7.5 years. Unfortunately, blood glucose (BG) levels were not measured on these occasions, although semiquantitative estimations of urine ketone bodies were positive (grades 3–4). The patient was treated under an improper diagnosis of epilepsy.

BG level was measured and hypoglycemia was first documented at the age of 9 years, after an episode of blurred vision, vomiting, hypotonicity and dizziness that followed previous extensive physical activity with fasting. Glycemia was 2.2 mmol/L, urine ketone bodies were positive (grade 4). Two hours later, after oral administration of syrup, BG increased to 2.8 mmol/L. Following regular food intake in subsequent days, fasting BG levels ranged from 3.6 to 6.0 mmol/L. One week later, an oral glucose tolerance test (OGTT) resulted in BG levels of 4.1, 9.9, and 6.4 mmol/L at 0, 1, and 2 h. No further convulsions have occurred since this episode.

At the age of 19 years, glycosuria was randomly detected and a subsequent OGTT diagnosed diabetes (BG 8.0, 14.5, and 15.8 mmol/L at 0, 1, and 2 h). Insulin therapy was started in three daily injections: Semilente, Actrapid, and Semilente (0.31 IU/kg/day).

At present, the proband has been treated with insulin for 21 years. He is overweight (body mass index 29.7 kg/m²), his current daily insulin dose ranges from 82 to 88 IU (0.87–0.94 IU/kg/day), and HbA_{1c} is 10.3%. He has already developed diabetic retinopathy, neuropathy, and minor foot problems.

The proband's daughter developed diabetes at 16 years. She was born from a first uneventful pregnancy of a 19-year-old non-diabetic mother in the 40th gestational week, with a

*Corresponding author: Jan Lebl, Prof, MD, PhD, Department of Pediatrics, University Hospital Motol V Úvalu 84, CZ-150 06 Prague, Czech Republic
Phone: +420-224-432 001, Fax: +420-224-432 020, E-mail: jan.lebl@lfmotol.cuni.cz

birth weight of 3950 g (+1.02 SD) and birth length of 53 cm (+1.29 SD). After she had noticed polyuria at 16 years of age, the testing of the morning fasting BG showed 6.5 mmol/L, and postprandial BG was 16–18 mmol/L. Her HbA1c was 6.9%. An intravenous glucose tolerance test (IVGTT) displayed a low-normal first phase insulin release (59.3 mIU/L; minute 1+3 following an IV bolus of glucose 0.5 g/kg BW). Her OGTT was diabetic (BG 12.4 mmol/L at 2 h). She started with insulin therapy (NPH insulin 10 IU daily, i.e., 0.15 IU/kg/day).

Investigation

The positive family history (see the pedigree in Figure 1) indicated the need for MODY genetic testing. The genes *HNF1A*, *HNF4A* and *INS* were analyzed by direct sequencing. A heterozygous mutation p.Arg272His (c.815G>A) in *HNF1A* previously published by Kaisaki et al. (5) was shown both in the proband and his diabetic daughter. Other tested family members were negative for this mutation; however, it must be noted that a sample from the deceased proband's father was not available. The proband was negative for mutations in the *HNF4A* and *INS* genes with its promoters.

The results of genetic testing led to a change in therapy: the proband's daughter was immediately switched to repaglinide administered 1 mg daily (0, 0.5, and 0.5 mg prior to meals) on which she sustained excellent metabolic control. The proband refused to be switched from insulin to OHA (oral hypoglycemic agents).

Here, we demonstrate, to the best of our knowledge for the first time, that a *HNF1A* mutation can be associated with fetal macrosomia and hypoglycemia in childhood. The strength of the evidence is unfortunately limited by the insufficient documentation of BG levels in the neonatal period and during the recurrent attacks of convulsions in early childhood. Only the last attack, when the proband was

9 years old, was documented by laboratory measurements, resembling ketotic hypoglycemia. Nevertheless, the medical data indicate that the repeated attacks of convulsions during the respiratory tract infections and fasting followed by positive testing of urine ketone bodies were very probably caused by hypoglycemia. In our opinion, any spontaneous hypoglycemia, including ketotic hypoglycemia, results from disequilibrium between limited glucose disposal and the ability to suppress insulin action efficiently. Thus, our proband might have suffered from insufficient suppressibility of insulin production in non-standard circumstances (fever, vomiting, limited food intake or excessive physical activity) resulting from impaired function of the β -cell transcriptional regulation. Functional analysis of the detected heterozygous mutation p.Arg272His in *HNF1A* was performed by Vaxillaire et al. (6): according to their results, the mutant protein decreased the ability of the transcriptional factor to bind to the DNA of its regulated genes. The reported case of fetal macrosomia and recurrent attacks of neonatal and childhood hypoglycemia in the *HNF1A*-MODY proband does not allow the causality of the *HNF1A* mutation, to be proved but is of interest with regard to the reports on *HNF4A* mutation carriers. Absence of signs of hypoglycemia in the proband's daughter indicates that the disease background could be multifactorial in origin, not being caused exclusively by the p.Arg272His mutation.

Conclusions

In conclusion, this case observation suggests that fetal macrosomia and hypoglycemia in childhood might not be limited only to *HNF4A* mutations, but could also be associated with the mutation in *HNF1A*. It could be due to a biphasic impact of the *HNF1A* mutation on β -cell function over the lifespan, leading from insufficient control of insulin oversecretion to final failure of insulin production.

Acknowledgements

The studies of subjects with monogenic diabetes are supported by a grant from Norway through the Norwegian Financial Mechanism (No. CZ0100), by an institutional grant from the Czech Ministry of Health (grant MZ000064203) and by a grant from IGA MZCR (grant NT11402). The authors have no relevant conflict of interest to disclose. They would like to acknowledge the patient and his family. Klára Veselá is thanked for her technical assistance.

References

1. Fajans SS, Bell GI. Macrosomia and neonatal hypoglycaemia in RW pedigree subjects with a mutation (Q268X) in the gene encoding hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4A). *Diabetologia* 2007;50:2600–1.
2. Kapoor RR, Locke J, Colclough K, Wales J, Conn JJ, et al. Persistent hyperinsulinemic hypoglycemia and maturity-onset

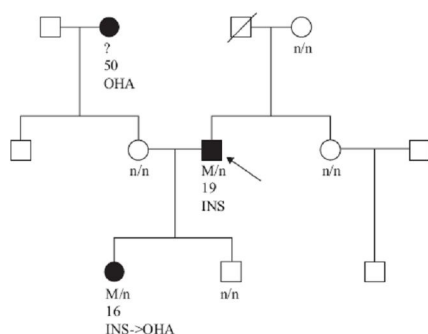


Figure 1 Family pedigree. Patients with known diabetes are colored black. The proband is indicated by an arrow. Where available, the genotype is mentioned (M/n: *HNF1A* mutation carrier, n/n: unaffected), below is recorded the age of diagnosis of diabetes and the treatment (INS for insulin, OHA for oral hypoglycemic agents).

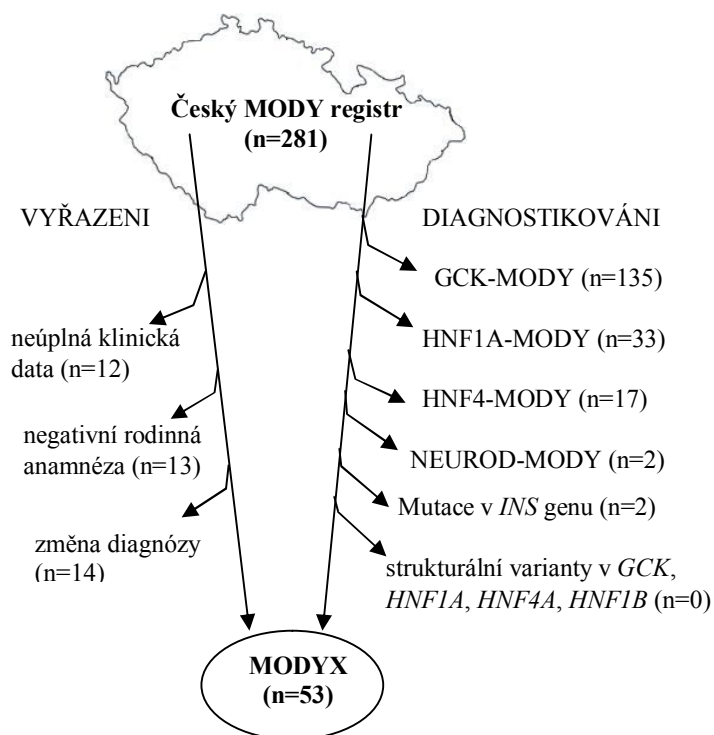
- diabetes of the young due to heterozygous HNF4A mutations. *Diabetes* 2008;57:1659–63.
3. Pearson ER, Boj SF, Steele AM, Barrett T, Stals K, et al. Macrosomia and hyperinsulinaemic hypoglycaemia in patients with heterozygous mutations in the HNF4A gene. *PLoS Med* 2007;4:e118.
 4. Lawrence C, Fryer JG, Karlberg P, Niklasson A, Ericson A. Modelling of reference values for size at birth. *Acta Paediatr Scand* 1989;350(Suppl):55–69.
 5. Kaisaki PJ, Menzel S, Lindner T, Oda N, Rjasanowski I, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in MODY and early-onset NIDDM: evidence for a mutational hotspot in exon 4 [published erratum appears in *Diabetes* 1997 Jul;46(7):1239]. *Diabetes* 1997;46:528–35.
 6. Vaxillaire M, Abderrahmani A, Boutin P, Bailleul B, Froguel P, et al. Anatomy of a homeoprotein revealed by the analysis of human MODY3 mutations. *J Biol Chem* 1999;274:35639–46.

4.4 Analýza genu *PAX4* u českých *MODYX*

P. Dušátková, K. Veselá, Š. Průhová, J. Lebl, O. Cinek: Lack of *PAX4* mutations in 53 Czech *MODYX* families. *Diabetic Medicine* 2010, 27: 1459-1460.

Cílem práce bylo zmapovat gen *PAX4* zodpovědný za vzácný podtyp *MODY* (*PAX4-MODY*, *MODY9*) u rozsáhlé kohorty českých pacientů splňujících klinická kritéria *MODY* diabetu, u nichž avšak nebyla nalezena mutace v prevalentních *MODY* genech (cestu k identifikaci *MODYX* shrnuje obrázek 8).

Obrázek 8. Identifikace skupiny *MODYX* v českém registru pacientů s *MODY*.



Molekulárně-genetická analýza metodou přímé sekvenace neodhalila *PAX4-MODY* u žádného z českých pacientů. Naše výsledky ve shodě s menší francouzskou (Dupont, 1999) a britskou (Edghill, 2010) studií indikují, že *PAX4* není důležitým přispěvatelem k onemocnění *MODY* v kavkazských populacích. Ukazuje na to jednak fakt, že *PAX4-MODY* byl dosud popsán pouze u dvou thajských rodin (Plengvidhya, 2007) a nedávno u jedné japonské rodiny (Jo, 2011). A rovněž nízké zastoupení v Evropě prevalentních subtypů *MODY* (*GCK-MODY*, *HNF1A-MODY*, *HNF4A-MODY*) v asijských populacích (Eto, 1993; Hwang, 2006; Tonooka, 2002; Xu, 2005).

Předkládaná studie ukázala, že zavedení rutinního vyšetřování genu *PAX4* není žádoucí ve skupině pacientů kavkazského původu suspektních pro MODY.

Letters: Original Observations

DOI:10.1111/j.1464-5491.2010.03126.x

Lack of *PAX4* mutations in 53 Czech MODYX families

Diabet. Med. 27, 1459–1460 (2010)

While the most common causes for maturity-onset diabetes of the young (MODY) are heterozygous mutations in the genes *HNF1A*, *GCK* and *HNF4A*, other genes have also been implicated in MODY aetiology in isolated cases. One such gene is the *PAX4* gene, an encoding transcription factor essential for development of insulin-producing cells [1].

The body of evidence supporting the role of *PAX4* in the MODY aetiology is, however, limited. Only two MODY probands, both of Thai origin, have been found to carry heterozygous mutations in the *PAX4* gene [1]. Of note, although the first mutation (p.Arg164Trp) impaired the molecule function *in vitro*, the pedigree of its carrier included mutation-negative phenocopies; thus, clear evidence is lacking for co-segregation with the phenotype. For the mutation IVS7-1G>A found in the other proband, no functional study could be performed and no relatives were available for genetic testing. The only patients with MODY tested for *PAX4* outside the Thai population were 11 French and eight British subjects [2,3]—all negative for mutations. Interestingly, a Japanese study tested *PAX4* in 393 individuals with Type 2 diabetes and found that approximately 3% of patients carried the p.Arg121Trp mutation [4]. However, the published data do not allow conclusions on the possibility that MODY was misclassified as Type 2 diabetes.

As, to the best of our knowledge, no other published study of patients with MODY has focused on the *PAX4* gene, we investigated this gene in a carefully selected and clinically well-documented cohort of 53 Czech probands with MODY who were negative for mutations in the *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *INS* and *NEUROD* genes, and for structural variants in four common MODY genes (MODYX subjects).

The procedure for identification of these MODYX patients among the nationwide Czech MODY registry is shown in Figure 1. The protocol was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Motol, Prague. We first re-evaluated the clinical characteristics of all 281 Czech probands with MODY against the consensus for diagnosis of monogenic diabetes [5]. Briefly, they had to have a positive family history of diabetes in at least two generations, positive C-peptide and no islet autoantibodies. Then, all common MODY genes were tested for mutations as well as for structural rearrangements using techniques reported previously [6], with the exception of amplification of the exon 8 of the *PAX4* gene, where long-range PCR (Qiagen, Hilden, Germany) was utilized to amplify the longer stretch of DNA flanking the exon.

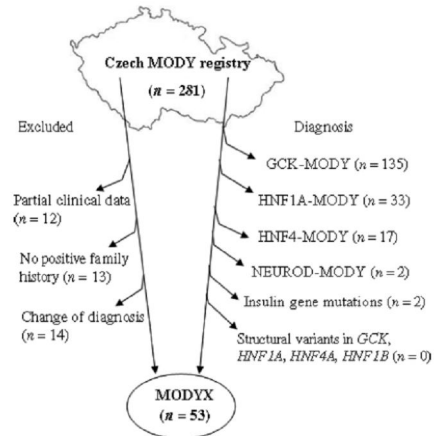


FIGURE 1 Identification of the MODYX probands within the Czech MODY registry.

This test procedure identified 53 MODYX probands with median age at investigation of 33 years [interquartile range (IQR) 21.0–48.0] and median age at diagnosis of diabetes 19 years (IQR 13.5–30.5). The patients were on the edge of the normal and overweight categories, with a median BMI of 24 kg/m². The median fasting serum glucose was 6.7 mmol/l (IQR 6.3–8.3), the median C-peptide was 797 pmol/l (IQR 595.0–1190.0) and the median of HbA_{1c} was 6.1% (IQR 4.5–8.2) and 43 mmol/mol (Diabetes Control and Complications Trial and International Federation of Clinical Chemistry, respectively). Most of the MODYX probands were treated with insulin ($n = 30$). Four probands were on oral hypoglycaemic agents and those with mild and stable hyperglycaemia were treated with diet ($n = 8$) or did not require any treatment ($n = 4$).

PAX4 testing of these MODYX patients revealed no mutations. Our negative result, reached in a considerably larger group, confirms the previous findings from two other Caucasian populations [2,3]. This indicates that *PAX4* is not an important contributor to MODY aetiology in Caucasians, yet it still may be important in the Asian populations: the genetic composition of MODY in Asia is clearly different to the Caucasian populations, as indicated by the lack of mutations in the three most common MODY genes (*GCK*, *HNF1A* or *HNF4A*): this was observed, for example, in studies from Korea and China [7,8].

In conclusion, we did not detect causal mutations in the *PAX4* gene in a large and clinically well-characterized group of Czech MODYX probands, which may suggest—together with data from other European populations—that MODY in Caucasians

could only very rarely, if ever, be attributed to mutations in this gene.

Competing interests

Nothing to declare.

Acknowledgements

The study was supported by a grant 'Monogenic diabetes in childhood: from genetics to therapy' from Norway through the Norwegian Financial Mechanism (no. CZ0100) and by an institutional grant from the Czech Ministry of Health (grant MZ000064203). The authors would like to thank the patients and their families, as well as their physicians, for collaboration.

P. Dusatkova, K. Vesela, S. Pruhova, J. Lebl and
O. Cinek

Department of Pediatrics, University Hospital Motol,
Second Faculty of Medicine, Charles University in
Prague, Prague, Czech Republic

References

- Plengvidhya N, Kooptiwut S, Songtawee N, Doi A, Furuta H, Nishi M *et al.* PAX4 mutations in Thais with maturity-onset diabetes of the young. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; **92**: 2821–2826.
- Dupont S, Vionnet N, Chevret JC, Gallina S, Dina C, Seino Y *et al.* No evidence of linkage or diabetes-associated mutations in the transcription factors BETA2/NEUROD1 and PAX4 in Type II diabetes in France. *Diabetologia* 1999; **42**: 480–484.
- Edghill EL, Minton JA, Groves CJ, Flanagan SE, Patch AM, Rubio-Cabezas O *et al.* Sequencing of candidate genes selected by β -cell experts in monogenic diabetes of unknown aetiology. *JOP* 2010; **11**: 14–17.
- Shimajiri Y, Sanke T, Furuta H, Hanabusa T, Nakagawa T, Fujitani Y *et al.* A missense mutation of Pax4 gene (R121W) is associated with type 2 diabetes in Japanese. *Diabetes* 2001; **50**: 2864–2869.
- Ellard S, Bellanne-Chantelot C, Hattersley AT. Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia* 2008; **51**: 546–553.
- Pruhova S, Dusatkova P, Sumnik Z, Kolouskova S, Pedersen O, Hansen T *et al.* Glucokinase diabetes in 103 families from a country-based study in the Czech Republic: geographically restricted distribution of two prevalent GCK mutations. *Pediatr Diabetes* 2010; DOI: 10.1111/j.1399-5448.2010.00646.x [Epub ahead of print].
- Hwang JS, Shin CH, Yang SW, Jung SY, Huh N. Genetic and clinical characteristics of Korean maturity-onset diabetes of the young (MODY) patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2006; **74**: 75–81.
- Xu JY, Dan QH, Chan V, Wat NM, Tam S, Tiu SC *et al.* Genetic and clinical characteristics of maturity-onset diabetes of the young in Chinese patients. *Eur J Hum Genet* 2005; **13**: 422–427.

DOI:10.1111/j.1464-5491.2010.03112.x

The relationship between low vital capacity and impaired glucose metabolism in men

Diabet. Med. 27, 1460–1461 (2010)

In recent years, associations between low vital capacity, which mostly reflects restrictive lung diseases, and metabolic abnormalities such as Type 2 diabetes and the metabolic syndrome, have been reported in some studies [1–3]. However, no studies have clearly shown that this relationship is independent of central obesity, by means of a direct measurement, instead of statistical adjustment. Consequently, many investigators and clinical practitioners have suggested that even overweight and mild obesity may reduce lung expansion attributable to mechanical, rather than via metabolic factors, because severe obesity reduces the movement of the thorax and diaphragm and thus restricts lung expansion [4,5]. In this context, we evaluated the relationship between low vital capacity and impaired glucose metabolism assessed as high fasting plasma glucose and high glycosylated haemoglobin (HbA_{1c}) in data from a previous study of apparently healthy adults [2]. Impaired glucose metabolism was determined as high fasting plasma glucose (≥ 5.4 mmol/l) or high HbA_{1c} [$\geq 5.8\%$ (National Glycohemoglobin Standardization Program, NGSP); ≥ 40 mmol/mol (International Federation of Clinical Chemistry, IFCC)]. Among male non-smokers without known lung disease ($n = 1169$, 51.9 ± 12.2 years), the percentage of predicted forced vital capacity (%PFVC) in individuals with waist circumference ≥ 85.1 cm was significantly lower in subjects with high fasting plasma glucose than in those with low fasting plasma glucose (Fig. 1). Of note, the %PFVC significantly decreased with increasing waist circumference in subjects with high fasting plasma glucose ($P = 0.04$, one-way ANOVA), but not in those with low fasting plasma glucose ($P = 0.86$). When subjects were limited to male subjects, including smokers, who had HbA_{1c} measured because of suspected impaired glucose metabolism ($n = 848$, 53.0 ± 11.9 years), the %PFVC was significantly lower in subjects with high HbA_{1c} compared with those with low HbA_{1c}, except in the subjects with waist circumference ≤ 80 cm. Furthermore, %PFVC in subjects with high HbA_{1c} significantly decreased with increasing waist circumference ($P = 0.003$), whereas %PFVC in those with low HbA_{1c} did not ($P = 0.14$). Of note, even in the subjects with normal weight and low waist circumference (BMI 23.0 – 25.0 kg/m²), low %PFVC was associated with impaired glucose metabolism. There were no consistent differences in BMI, waist circumference or prevalence of smokers between subjects with impaired glucose metabolism and those without in each waist circumference group (Mann–Whitney U -test and χ^2 -test). These observations with direct measurement rather than statistical adjustment for waist circumference, suggest that high fasting plasma glucose and high HbA_{1c} are associated

4.5 Mutace v genu *ABCC8* způsobující hyperglykémii

L. Gonsorčíková, M. Vaxillaire, Š. Průhová, A. Dechaume, P. Dušátková, O. Cinek, O. Pedersen, P. Froguel, T. Hansen, J. Lebl: Familial mild hyperglycemia associated with a novel *ABCC8*-V84I mutation within three generations. *Pediatric Diabetes* 2011, 12 (3): 266-269.

Publikace, která vznikla ve spolupráci s francouzskými a dánskými kolegy pojednává o nálezu české rodiny, u níž se hyperglykémie vyskytuje ve třech generacích a vykazuje autozomálně dominantní typ dědičnosti. U členů rodiny s detekovanou hyperglykémií nebyla prokázána přítomnost pankreatických protilátek, oGTT bylo v pásmu poruchy glukózové tolerance, neobjevily se diabetické komplikace a nebyla proto zahájena žádná léčba. Genetické vyšetření neprokázalo mutaci v žádném z častých subtypů MODY. Až analýza genu *ABCC8*, kódujícího jednu z podjednotek K_{ATP} kanálu β buňky pankreatu, odhalila heterozygotní mutaci p.Val84Ile segregující s hyperglykémií.

Představili jsme pravděpodobně první případ pacientů, za jejichž hyperglykémii, která by spíše klinicky odpovídala GCK-MODY, je zodpovědná mutace v genu *ABCC8*. Tento nález dokresluje velkou klinickou variabilitu popisovanou u rodin s mutacemi v *ABCC8*.

Case Report

Familial mild hyperglycemia associated with a novel *ABCC8*-V84I mutation within three generations

Gonsorcikova L, Vaxillaire M, Pruhova S, Dechaume A, Dusatkova P, Cinek O, Pedersen O, Froguel P, Hansen T, Lebl J. Familial mild hyperglycemia associated with a novel *ABCC8*-V84I mutation within three generations. *Pediatric Diabetes* 2011; 12: 266–269.

We present a unique case of a 19-year-old man with a positive family history of persistent mild hyperglycemia and a novel V84I mutation in *ABCC8*. The proband was initially detected to have fasting hyperglycemia (ranging 6.1–6.4 mmol/L) at the age of 12 years. Increased fasting blood glucose was also subsequently detected in five additional family members (in his twin brother, sister, mother, maternal aunt, and grandfather). The grandfather has been known to have mild diabetes since 30 years and has never been treated. After having excluded a causative mutation in five maturity-onset diabetes of the young genes (*MODY1–4* and 6), we identified a novel *ABCC8* V84I mutation, which segregated with autosomal dominant transmission of mild hyperglycemia within three generations. This mutation that is located in a conserved area of transmembrane domain TMD0 seems to be a rare cause of clinical phenotype resembling glucokinase-deficient diabetes.

Lucie Gonsorcikova^a,
Martine Vaxillaire^b,
Stepanka Pruhova^{a,c},
Aurélie Dechaume^b, Petra
Dusatkova^a, Ondrej Cinek^a,
Oluf Pedersen^{d,e,f}, Philippe
Froguel^{b,g}, Torben
Hansen^{d,h} and Jan Lebl^a

^aDepartment of Pediatrics, Second Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic; ^bCNRS-UMR8090, Lille Institute of Biology, Lille 2 University, Pasteur Institute, Lille, France; ^cDepartment of Pediatrics, Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic; ^dSteno Diabetes Center and Hagedorn Research Institute, Gentofte, Denmark; ^eFaculty of Health Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark; ^fFaculty of Health Sciences, University of Aarhus, Aarhus, Denmark; ^gGenomic Medicine, Hammersmith Hospital, Imperial College, London, UK; and ^hFaculty of Health Sciences, University of Southern Denmark, Odense, Denmark

Key words: *ABCC8* – diabetes – hyperglycemia – *MODY* – *SUR1*

Corresponding author:
Jan Lebl, MD, PhD,
Department of Pediatrics,
Second Faculty of Medicine,
Charles University in Prague,
V Úvalu 84,
CZ-150 06 Prague 5,
Czech Republic.
Tel: +420-224-432-001;
fax: +420-224-432-020;
e-mail: jan.lebl@lfmotol.cuni.cz

Submitted 23 February 2010.
Accepted for publication 18 August
2010

The ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}) plays a crucial role in blood glucose (BG) homeostasis by regulating the K^+ ions flow across the cell membrane in the beta cell (1). K_{ATP} channels have an octameric structure that consists of two subunits: Kir6.2 and sulfonylurea receptor 1 (SUR1) (2). While the inwardly rectifier protein Kir6.2 (encoded by *KCNJ11*) forms an ion pore, the SUR1 subunit (encoded by *ABCC8*) plays a regulatory role (3). Because of the key role of the K_{ATP} channel in insulin secretion, pathogenic mutations in both *KCNJ11* and *ABCC8* genes are associated with severe disorders of glucose metabolism (4,5). Within *ABCC8*, more than 202 mutations and a significant number of polymorphisms have been identified so far (6). First, *ABCC8* inactivating mutations were recognized to lead to insulin oversecretion resulting in hyperinsulinemic hypoglycemia in infancy (4). Studies of animal models have shown that activating *ABCC8* mutations may lead to diabetes (7). Since 2006, several studies reported activating *ABCC8* mutations to be causative of a wide spectrum of clinical forms of diabetes ranging from permanent neonatal diabetes mellitus (PNDM) and diabetes mellitus, epilepsy, and neurodevelopmental delay (DEND) syndrome to less severe forms of diabetes with variable expression and age at onset (5,6,8–11).

We report the case of a 19-year-old young man with familial autosomal dominant occurrence of hyperglycemia. The proband was recruited from a cohort of patients of Czech Caucasian origin with autosomal dominant transmission of diabetes or hyperglycemia first recognized in childhood, adolescence, or early adulthood. These patients with suspicion of maturity-onset diabetes of the young (MODY) were first analyzed using denatured High Performance Liquid Chromatography (dHPLC) or/and direct sequencing to search for mutations in the five MODY genes: *HNF4A* (MODY 1), *GCK* (MODY 2), *HNF1A/TCF1* (MODY 3), *IPF1* (MODY 4) and *NEURODI* (MODY 6). *HNF1B* mutations responsible for MODY 5 were not investigated because of the absence of urogenital malformations. Because of the negative results and suggestive familial occurrence of hyperglycemia, we decided to continue with genetic testing for mutations in *ABCC8*.

Case report

A 19-year-old man of Caucasian Czech origin was found to have increased fasting glycemia ranging from 6.1 to 6.4 mmol/L. The mild hyperglycemia was initially detected at the age of 12 years during an examination at a sport physician. Clinical signs of diabetes were not present. An oral glucose tolerance test (OGTT) at age 12 years showed a normal 2-h plasma glucose value of 7.6 mmol/L. The fasting and 2-h serum insulin

and C-peptide levels were 8.38 and 50.2 mIU/L for insulin and 496 and 1620 pmol/L for C-peptide. The anti-GAD and anti-insulin autoantibodies were tested negative. The proband has not been treated for diabetes and had not developed diabetic complications. His monozygotic twin brother and his younger sister (age 13 years) also presented increased fasting glycemia (6.1–6.3 mmol/L). The twin brother had an elevated 2-h BG level of 8.3 mmol/L after an oral glucose load. The sister had a normal glucose level of 7.0 mmol/L after an oral glucose load. Their mother and the mother's sister were both prescribed a diet during pregnancies because of mild gestational diabetes (fasting glycemia values ranged from 5.9 to 6.1 mmol/L, and 2-h BG levels from 12.1 to 13.2 mmol/L). They never had any clinical symptoms of diabetes and have not been treated for hyperglycemia since the pregnancies. The maternal grandfather of the proband had been found to have fasting hyperglycemia by the age of 30 years. Unfortunately, he was not available for an OGTT. The family pedigree is displayed in Fig. 1. The clinical and biological characteristics are summarized in Table 1. Plasma glucose levels during an OGTT in five patients compared to plasma glucose levels during an OGTT obtained from patients with diabetes because of a mutation in the glucokinase (*GCK*) gene (12) are shown in Fig. 2.

We analyzed all exons, exon/intron boundaries, and a proximal promoter region of the *ABCC8* gene by

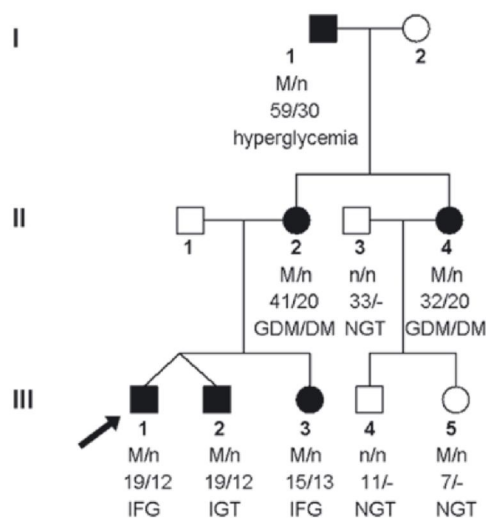


Fig. 1. Family pedigree. Patients with IFG/IGT/DM are colored black. The proband is indicated by an arrow. Clinical data and genotypes are summarized in Table 1. Legend from top to bottom: subject identification, genotype (M-mutant allele, n-wild type), age (current age/age at clinical diagnosis of diabetes), and glycemic status. IFG, impaired fasting glucose; IGT, impaired glucose tolerance; DM, diabetes mellitus; NGT, normal glucose tolerance.

Table 1. Clinical data and genetic status of members of the family

ID number	Sex	Phenotype	Genotype	Current age	Age at diagnosis	Birth weight/Length (g/cm)	BMI	Fasting glycemia (mmol/L)	OGTT-120' glycemia (mmol/L)	HbA _{1c} (DCCT scale) (%)
I:1	M	Hyperglycemia	M/n	59	30	—	—	6.8	—	—
II:2	F	GDM/DM	M/n	41	20	3100/51	24.3	6.0	12.1	5.9
II:3	M	NGT	n/n	33	—	3800/50	—	—	—	—
II:4	F	GDM/DM	M/n	32	20	2900/49	21	6.1	13.2	6.3
III:1	M	IFG	M/n	19	12	2350/45	18.1	6.0	7.6	5.9
III:2	M	IGT	M/n	19	12	2400/45	17.8	6.2	8.3	6.2
III:3	F	IFG	M/n	15	13	3200/53	20	6.1	7.0	6.1
III:4	M	NGT	n/n	11	—	3100/48	16.9	5.8	7.3	5.8
III:5	F	NGT	M/n	7	—	4200/50	15.1	5.2	5.9	4.9

M, male; F, female; GDM, gestational diabetes mellitus; IGT, impaired glucose tolerance; IFG, impaired fasting glucose; NGT, normal glucose tolerance; M/n, carrier of a heterozygous *ABCC8* mutation; n/n, no mutation; BMI, body mass index; HbA_{1c}, glycosylated hemoglobine A1c (DCCT scale); OGTT, oral glucose tolerance test.

The numbering of individuals corresponds with the pedigree (Fig. 1).

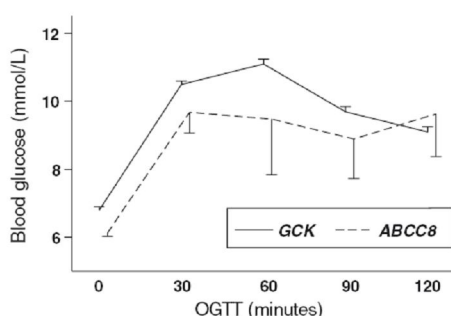


Fig. 2. Glucose concentrations within OGTTs of *ABCC8* mutation carriers (n = 5) in comparison to OGTTs of *GCK* mutation carriers [according to Stride et al. (12)]. OGTT, oral glucose tolerance test.

direct sequencing as previously described (8). PCR products were purified by Agencourt ClenSEQ system (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and sequenced using BigDye Terminator chemistry 3.1 (Applied Biosystems, Warrington, UK). Reactions were analyzed on the DNA sequencer ABI Prism 3100xl (Applied Biosystems) and inspected using the Mutation Surveyor software (Mutation Surveyor v3.24; SoftGenetics, Pennsylvania, PA, USA). To exclude the possibility of change in the gene dosage, the proband's DNA was subsequently screened for the four most common MODY genes (*HNF1A*, *GCK*, *HNF4A*, and *HNF1B*) by MLPA according to the manufacturer's instructions (P241-MODY, MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). The results were analyzed using the software GENEMARKER (SoftGenetics LLC, State College, PA, USA).

After having excluded a mutation within the *GCK* and *HNFs* genes or a change in gene dosage, we identified a novel G>A substitution in exon 2 of the *ABCC8* gene leading to a substitution of valine (GTC) by isoleucine (ATC) at the first position of codon 84

(p.V84I mutation). The V84 residue is conserved across species from humans to mouse, rat, and chicken. The V84I mutation was not found in 300 control chromosomes of Czech healthy subjects. Seven of nine additional family members tested were found to carry the V84I mutation (Fig. 1; Table 1).

Discussion

We present a family with transmission of mild non-progressive hyperglycemia in three generations because of a novel *ABCC8* V84I mutation.

The proband and five members of his family with mild hyperglycemia but no diabetic complications were found to carry the novel V84I mutation, which is located in *ABCC8* exon 2 and leads to an aminoacid substitution in the transmembrane domain TMD0 of SUR1. SUR1 associates with Kir6.2 and modulates opening and closing of the K_{ATP} channel through this N-terminal TMD0 domain (13). The mutations in TMD0 can affect the K_{ATP} channel gating or amplify the stimulatory effect of Mg-nucleotides on SUR1, thereby causing a diabetic phenotype (9,10,14). An *in vitro* functional assay using *Xenopus* oocytes has shown that some of the activating SUR1 mutations led to reduced response to ATP and thus reduced insulin secretion (9). We can therefore hypothesize that the V84I mutation may lead to slightly altered channel gating and thus impaired release of insulin granules. However, the V84I mutation that we report seems to induce a milder phenotype compared to other mutations in the TMD0 region described so far.

The clinical phenotype of family members carrying the *ABCC8* V84I mutation resembles *GCK* diabetes (*MODY2*) with an autosomal dominant mode of inheritance and persistent mild fasting hyperglycemia. It probably represents the mildest ever-described clinical phenotype associated with an *ABCC8* mutation (15).

Interestingly, even the oldest mutation carrier (age 59 years) has not developed diabetic complications so far.

The mutation has been identified in seven of the nine family members available for genetic testing (Fig. 1; Table 1). Six of them were shown to have asymptomatic mild fasting hyperglycemia. One carrier (a 7-year-old girl, III.5) is normoglycemic and has normal OGTT. We speculate that she is still too young to develop hyperglycemia or the penetrance of the mutation may vary. A variable penetrance of dominant *ABCC8* gene mutations has been described in previous studies (10,11).

Although the clinical manifestation of hyperglycemia in this family is similar to the GCK-deficient diabetes, it is to note a tendency to progression from hyperglycemia to overt diabetes with age in the family. Moreover, Tarasov et al. (10) described an *ABCC8* mutation leading to typical adult-onset type 2 diabetes with manifestation of hyperglycemia at 39 years. Another report from Huopio et al. (16) described a family with a missense *ABCC8* mutation associated with mild congenital hyperinsulinism in infancy switched to glucose intolerance in early adulthood and diabetes mellitus in the middle age.

In conclusion, *ABCC8* mutations give rise to a bright spectrum of phenotypes ranging from hyperinsulinemic hypoglycemia (when inactivating), and severe neonatal diabetes or chronic mild hyperglycemia and type 2 diabetes with variable clinical presentation and progression (when activating).

Acknowledgements

The study was supported by a grant from Norway through the Norwegian Financial Mechanism (No CZ0100), by an institutional grant from the Czech Ministry of Education (grant MSM 0021620814) and by an institutional grant from the Czech Ministry of Health (grant MZ 000064203). The authors would like to acknowledge the patient and his family. Klára Veselá is thanked for her technical assistance.

References

1. ASHCROFT FM. ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. *J Clin Invest* 2005; 115: 2047–2058.
2. SHYNG SL, NICHOLS CG. Octameric stoichiometry of the K_{ATP} channel complex. *J Gen Physiol* 1997; 110: 655–664.
3. AGUILAR-BRYAN L, NICHOLS CG, WECHSLER SW et al. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 1995; 268: 423–426.
4. THOMAS PM, COTE GJ, WOHLK N et al. Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* 1995; 268: 426–429.
5. PROKS P, ARNOLD AL, BRUINING J et al. A heterozygous activating mutation in the sulfonylurea receptor SUR1 (*ABCC8*) causes neonatal diabetes. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 1793–1800.
6. FLANAGAN SE, CLAUIN S, BELLANNÉ-CHANTELOT C et al. Update of mutations in the genes encoding the pancreatic beta-cell $K(ATP)$ channel subunits Kir6.2 (*KCNJ11*) and sulfonylurea receptor 1 (*ABCC8*) in diabetes mellitus and hyperinsulinism. *Hum Mutat* 2009; 30: 170–180.
7. KOSTER JC, MARSHALL BA, ENSOR N, CORBETT JA, NICHOLS CG. Targeted overactivity of beta cell $K(ATP)$ channels induces profound neonatal diabetes. *Cell* 2000; 100: 645–654.
8. BABENKO AP, POLAK M, CAVÉ H et al. Activating mutations in the *ABCC8* gene in neonatal diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2006; 355: 456–466.
9. ELLARD S, FLANAGAN SE, GIRARD CA et al. Permanent neonatal diabetes caused by dominant, recessive, or compound heterozygous SUR1 mutations with opposite functional effects. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 375–382.
10. TARASOV A, NICOLSON T, RIVELINE JP et al. A rare mutation in *ABCC8/SUR1* leading to altered ATP-sensitive K^+ channel activity and β -cell glucose sensing is associated with type 2 diabetes in adults. *Diabetes* 2008; 57: 1595–1603.
11. VAXILLAIRE M, DECHAUME A, BUSIAH K et al. New *ABCC8* mutations in relapsing neonatal diabetes and clinical features. *Diabetes* 2007; 56: 1737–1741.
12. STRIDE A, VAXILLAIRE M, TUOMI T et al. The genetic abnormality in the beta cell determines the response to an oral glucose load. *Diabetologia* 2002; 45: 427–435.
13. CHAN KW, ZHANG H, LOGOTHETIS DE. N-terminal transmembrane domain of the SUR controls trafficking and gating of Kir6 channel subunits. *EMBO J* 2003; 22: 3833–3843.
14. MASIA R, DE LEON DD, MACMULLEN C, MCKNIGHT H, STANLEY CA, NICHOLS CG. A mutation in the TMD0-L0 region of sulfonylurea receptor-1 (L225P) causes permanent neonatal diabetes mellitus (PNDM). *Diabetes* 2007; 56: 1357–1362.
15. KLUPA T, KOWALSKA I, WYKA K, SKUPIEN J, PATCH AM, FLANAGAN SE et al. Mutations in the *ABCC8* gene are associated with a variable clinical phenotype. *Clin Endocrinol* 2009; 71: 358–362.
16. HUOPIO H, OTONKOSKI T, VAUHKONEN I, REIMANN F, ASHCROFT FM, LAAKSO M. A new subtype of autosomal dominant diabetes attributable to a mutation in the gene for sulfonylurea receptor 1. *Lancet* 2003; 361: 301–307.

4.6 Makrovaskulární komplikace u GCK-MODY

Š. Průhová, P. Dušátková, P. J. Kraml, M. Kulich, Z. Procházková, J. Brož, J. Zikmund, O. Cinek, M. Anděl, O. Pedersen, T. Hansen, J. Lebl: Chronic mild hyperglycaemia in GCK-MODY does not accelerate the carotid intima-media thickness and the cardiovascular risk. Rukopis v recenzním řízení.

Chronická, i když mírná, hyperglykémie u pacientů s GCK-MODY nevede podle dostupných informací ke vzniku závažných mikro- a makrovaskulárních komplikací (Ellard, 2008) a jen u malého procenta pacientů se objevuje první nebo druhý stupeň komplikací. Počet prací zabývajících se diabetickými komplikacemi u těchto pacientů je ale velice omezený, respektive dosud existovaly dvě publikace (Page, 1995; Velho, 1997). Proto jsme se v naší studii zaměřili na makrovaskulární komplikace s důrazem na měření šířky intimy a médie krční karotidy (CIMT, carotide intima-media thickness) reflektující riziko aterosklerózy, cévní mozkové příhody a ischemie myokardu (Djaberi, 2008).

U 27 pacientů s GCK-MODY a jejich 24 zdravých příbuzných starších 35 let jsme ve spolupráci s 3. lékařskou fakultou Univerzity Karlovy v Praze a fakultní nemocnicí Královské Vinohrady analyzovali základní antropometrická a biochemická data spolu s CIMT měřenou pomocí ultrasonografie.

Neprokázali jsme, že by GCK-MODY zvyšoval u svých nosičů riziko vzniku makrovaskulárních komplikací v porovnání se zdravými příbuznými spárovanými dle věku a pohlaví, se kterými sdílí životní styl a prostředí. Naše studie tak potvrzuje dobrou prognózu pro pacienty s GCK-MODY.

Nosičství heterozygotní mutace v *GCK* však nechrání před rozvojem diabetu 2. typu nad rámec GCK-MODY (Murphy, 2008). Na rozdíl od GCK-MODY, jež charakterizuje pouze mírný nárůst postprandiální glykémie při oGTT, je u pacientů s diabetem 2. typu glykémie ve 120. minutě vyšší, což by mohlo vysvětlovat rozdíl v riziku vzniku mikro- a makrovaskulárních komplikací. Rovněž hodnota CIMT je asociována spíše s postprandiální než s lačnou glykémií (Hanefeld, 2000). I přesto, že GCK-MODY nepřináší rizika spojená s diabetem, je potřebné pacientům zdůraznit důležitost správného životního stylu při prevenci diabetu 2. typu.

Chronic mild hyperglycaemia in GCK-MODY does not accelerate the carotid intima-media thickness and the cardiovascular risk

Stepanka Pruhova¹, Petra Dusatkova¹, Pavel J. Kraml³, Michal Kulich⁴, Zdena Prochazkova³, Jan Broz³, Jaroslav Zikmund², Ondrej Cinek¹, Michal Andel³, Oluf Pedersen^{5,6,8}, Torben Hansen^{7,8}, Jan Lebl¹

¹ Department of Paediatrics, ²nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic, CZ-150 06

² Department of Paediatrics, ³rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, and University Hospital Kralovske Vinohrady, Prague, Czech Republic, CZ-100 81

³ ²nd Department of Internal Medicine, ³rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, and University Hospital Kralovské Vinohrady, Prague, Czech Republic, CZ-100 81

⁴ Department of Probability and Mathematical Statistics, Faculty of Mathematics and Physics, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic, CZ-186 75

⁵ Hagedorn Research Institute, Gentofte, Denmark, DK-2820

⁶ Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Health Science, University of Copenhagen, DK-2200 N.

⁷ Faculty of Health Sciences, University of Southern Denmark, Odense, Denmark, DK-2820

⁸The Novo Nordisk Foundation Center for Basic Metabolic Research, Faculty of Health Sciences, University of Copenhagen, Denmark

Short title:

Carotid intima media thickness in GCK-MODY

*) Corresponding author:

Stepanka Pruhova, M.D., PhD.

Department of Paediatrics

University Hospital Motol

V Uvalu 84, CZ-150 06

Prague, Czech Republic

Phone: +420 224 432 026

Fax: +420 224 432 020

E-mail: stepanka.pruhova@lfmotol.cuni.cz

Key words: MODY, glucokinase, diabetes, vascular complications, intima-media thickness

Word count: 1477 words, abstract 198 words

Abstract

Objective. To investigate the prevalence of macrovascular complications and to measure the carotid intima-media thickness in patients with life-long mild hyperglycaemia caused by glucokinase (*GCK*) mutations and in their unaffected relatives.

Research and Methods. The history of coronary heart disease and stroke and the carotid intima-media thickness (CIMT) was evaluated in 27 *GCK* mutation carriers and 24 control individuals, all aged over 35 years.

Results. Mean CIMT was 0.707 ± 0.215 mm (mean \pm SD) in *GCK* mutation carriers and 0.690 ± 0.180 mm in control individuals. When adjusted for age, gender and family status, the estimated mean difference in CIMT between the two groups increased to 0.049mm (95% CI from -0.026 to 0.123 ; $p=0.19$). No significant difference was detected for other measured clinical and biochemical characteristics with the exception of fasting blood glucose (*GCK*-MODY 7.6 mmol/l (SD \pm 1.2), controls 5.3 mmol/l (SD \pm 0.3), $p < 0.0001$) and glycated hemoglobin HbA_{1c} (*GCK*-MODY 6.9% (SD \pm 1.0), 52 mmol/mol (SD \pm 10), controls 5.7% (SD \pm 0.4), 39 mmol/mol (SD \pm 3), $p < 0.0001$). The frequency of myocardial infarction or ischemic stroke did not differ between study groups.

Discussion. In spite of the life-long mild hyperglycaemia in *GCK* mutation carriers we found no evidence of increased carotid intima-media thickness or increased prevalence of macrovascular complications.

Introduction

GCK-MODY (GCK-diabetes, glucokinase diabetes, MODY2) is a monogenic condition caused by heterozygous mutations in the gene encoding glucokinase (*GCK*) Fajans, 2001. It is characterized by chronic lifelong mild hyperglycaemia, and less than 50% of patients fulfill criteria of overt diabetes. GCK-MODY is not associated with insulin resistance or dyslipidaemia Stride, 2002.

Non-invasive imaging techniques as carotid intima-media thickness (CIMT) measurements allow stratifying for the risk of atherosclerosis and myocardial ischemia Djaberi, 2008. The risk of atherosclerotic vascular disease is increased both in patients with type 2 diabetes, in those with impaired glucose tolerance, and with metabolic syndrome when compared to individuals without diabetes Ishizaka, 2009. However, large epidemiological studies have shown lower rates of cardiovascular mortality in patients with a relatively high fasting blood glucose and relatively low 2-h post-OGTT blood glucose (i.e. a similar pattern to GCK-MODY) in comparison with typical patients with type 2 diabetes 1999. Importantly, Niskanen Niskanen, 1996 demonstrated that components of the insulin resistance syndrome including hyperinsulinaemia after an oral glucose load, serum lipid abnormalities and elevated blood pressure are major determinants of CIMT in patients with diabetes.

Our study aimed in patients with GCK-MODY older than 35 years and their unaffected relatives sharing similar environment and life style to characterize the prevalence of macrovascular complications estimated by the history of coronary heart disease and stroke, and by measuring the CIMT.

Research design and methods

We studied 27 patients from 20 Czech families with genetically confirmed GCK-MODY (age 35-75 years; median 46 years), and their 24 unaffected family members (siblings, parents, partners) representing the control group (age 35-79 years, median 50 years). Each of the 20 participating families contributed with 1 to 3 patients having GCK-MODY and with 1 to 3 control individuals matched by age and gender. The

control individuals having fasting blood glucose more than 6.0mmol/l and/or with known history of diabetes were excluded from the study. The identification of families with GCK-MODY has been reported previously Pruhova, 2003, Pruhova, 2010. Informed consent was obtained from all study participants. The study protocol was approved by the Ethics Committee of 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague.

All study participants were examined in a fasting state. A structured assessment included a questionnaire, anthropometric examination and blood sampling for biochemical analysis. The laboratory methods have been described previously Feigerlova, 2006.

High-resolution B-mode carotid ultrasonography (using Phillips iU22 ultrasound) was performed to measure the CIMT of the distant wall for 1-cm lengths of the carotid bifurcation and the internal and common carotid, right and left. The means at ten sites were combined in an unweighted average to produce an overall CIMT. The upper normal limit of CIMT was set to 0.7mm Aminbakhsh, 1999, Touboul, 2002. History of coronary heart disease and ischemic stroke was obtained from medical records.

Clinical and demographic characteristics of *GCK* mutation carriers and control individuals were compared using a two-sample Welch t-tests (continuous variables) and Fisher exact tests (categorical variables). Mixed linear regression models with CIMT, blood pressure and serum creatinine as outcomes were used to estimate and test adjusted effects of *GCK* mutation status. Age, gender and mutation status were included as fixed effects, families were included as random effects. All analyses were performed using R statistical package 2001.

Results

No significant differences in baseline characteristics were found between patients and control individuals, with the exception of fasting blood glucose (GCK-MODY 7.6mmol/l (SD±1.2), controls 5.3mmol/l (SD±0.3), $p < 0.0001$) and glycosylated hemoglobin HbA_{1c} (GCK-MODY 6.9% (SD±1.0), 52mmol/mol (SD±10), controls 5.7% (SD±0.4), 39mmol/mol (SD±3), ($p < 0.0001$) (Table 1). Two control individuals had fasting blood glucose of 5.9mmol/l. The prevalence of smokers and hypertensive patients was similar in both study samples ($p=1$).

The measured CIMT values for participants with and without GCK mutations are shown in Figure 1. The mean CIMT was 0.707mm (range 0.4-1.1) in GCK-MODY patients and 0.692mm (range 0.4-1.1) in healthy control individuals. According to the published recommendations Aminbakhsh, 1999, Touboul, 2002 these values did not indicate an increased risk for acceleration of atherosclerosis. After adjusting for age, gender and family status, the estimated mean difference in CIMT between patients and healthy individuals slightly increased to 0.049mm (95% CI from -0.026 to 0.123; $p=0.19$). Estimated trends of mean CIMT indicate a moderate rise of CIMT with age and mutation status, see regression lines plotted in Fig. 1. Carotid plaques (local intima-media thickenings exceeding 1 mm and protruding into the lumen) were identified in 7 (25.9%) patients and 3 (12.5%) control individuals, all of them being haemodynamically insignificant.

Myocardial changes typical for ischemic heart disease were detected in three out of 27 patients with GCK-MODY and in two out of 24 healthy control individuals ($p=0.866$). Three study participants suffered from myocardial infarction (two with GCK-MODY, one control individual) ($p=0.895$) in the past and two from an ischemic stroke (one with GCK-MODY, one control individual). A similar proportion of participants (35%) from both groups were treated for hypertension using one or more antihypertensive drugs. Four of 27 patients with GCK-MODY (14.8%) were treated with oral hypoglycaemic agents; one patient was treated with insulin.

Discussion

To our best knowledge, the present study is the first case-control study of the clinical status of GCK-MODY patients older than 35 years with inclusion of CIMT measurements. The results confirm a mild natural course of GCK-MODY with no tendency of increased risk of developing macroangiopathic complications. The 95% confidence interval of the CIMT difference adjusted for age, family and gender, -0.026 to $+0.123$ mm, indicates that the possible increase in CIMT associated with GCK mutation is low, and most likely clinically insignificant.

In GCK-MODY, also the absence of serious chronic microvascular complications was observed by Page Page, 1995 and Velho Velho, 1996, Velho, 1997 who described proliferative retinopathy in less than 4%, proteinuria in 6%, and peripheral neuropathy in 5% of patients with hyperglycaemia for more than 5 years after diagnosis. A major problem with assessing the diabetic complications in these patients is the differentiation between patients who only have GCK-MODY and those who develop type 2 diabetes on top of their GCK-MODY. It is generally assumed that patients with GCK-MODY do not develop insulin resistance and dyslipidaemia in the natural disease course Stride, 2002, and their glucose tolerance remains stable over many years Martin, 2008. Nevertheless, carrying a GCK mutation does not protect against development of type 2 diabetes, which occurs at a prevalence similar to the general population Murphy, 2008.

Patients with GCK-MODY do only have a small increase in glucose levels after an oral glucose load Stride, 2002. This might explain the observed lack of complications in GCK-MODY. In contrast, patients with type 2 diabetes have relatively high the 2-hours glucose levels (as a proxy for postprandial glucose levels) indicating that postprandial glucose levels could be the most pathogenic glycaemic factor for developing micro- and macrovascular complications. The CIMT has been shown to correlate more strongly with postprandial glycaemia than fasting hyperglycaemia, and in addition, subjects with postprandial hyperglycaemia had significantly higher levels of serum triglycerides and a tendency to higher occurrence of hypertension and low serum HDL-cholesterol which is not typically seen in GCK-MODY patients Hanefeld, 2000. In support of the pathogenic role of postprandial glycaemia, Tominaga et al. Tominaga, 1999 reported that impaired glucose tolerance but not impaired fasting

glucose is a risk factor for cardiovascular disease. Also the serum hs-CRP levels are lower in GCK-MODY than in patients with type 2 diabetes McDonald, .

Furthermore, it has been reported that the metabolic syndrome is a risk factor for CIMT in patients with diabetes as well as individuals without diabetes with insulin resistance Ishizaka, 2009, McNeill, 2004, Suzuki, 2004 and is a major component of the atherosclerosis risk. Patients with GCK-MODY have mild hyperglycaemia without the components of metabolic syndrome and insulin resistance which is in contrast to patients with type 2 diabetes. Therefore, our study adds to the accumulating evidence that chronic mild hyperglycaemia without components of the metabolic syndrome has a milder effect on the development of macrovascular complications compared to the same glycaemic levels when associated with metabolic syndrome components.

On the other hand, a common variant in the pancreatic *GCK* promoter has been shown to influence the risk of diabetes complications: März et al showed März, 2004 that the A allele at c.-30G>A of *GCK* was associated with an increased risk of coronary artery disease not only in patients with type 2 diabetes but also - yet much weaker - in individuals not having diabetes (OR=1.27, 95%CI 1.02-1.59).

In conclusion, our data indicate that the natural course of mild life-long hyperglycaemia is associated with a low risk of development of diabetic macrovascular complications. The main message for the patients with GCK-MODY is to reduce the risk of development of “classical” type 2 diabetes on top of their GCK-MODY, i.e. avoid obesity and maintain a high level of physical activity. Our data support a conservative therapeutic approach to the hyperglycaemia in non-pregnant patients with GCK-MODY. Other risk factors for micro- and macrovascular complications should, however, be treated according to present guidelines.

Acknowledgements

The study was supported by an institutional grant from the Czech Ministry of Education (grant MSM0021620814) and by institutional grants from the Czech Ministry of Health (grant MZ000064203 and NT 11402). Klara Vesela is thanked for technical assistance. The authors are grateful to study participants for their excellent collaboration in favor of increasing medical understanding.

None of the authors declares competing interests.

Figure 1

Estimated trends of mean CIMT by gender and GCK mutation status (adjusted for family).

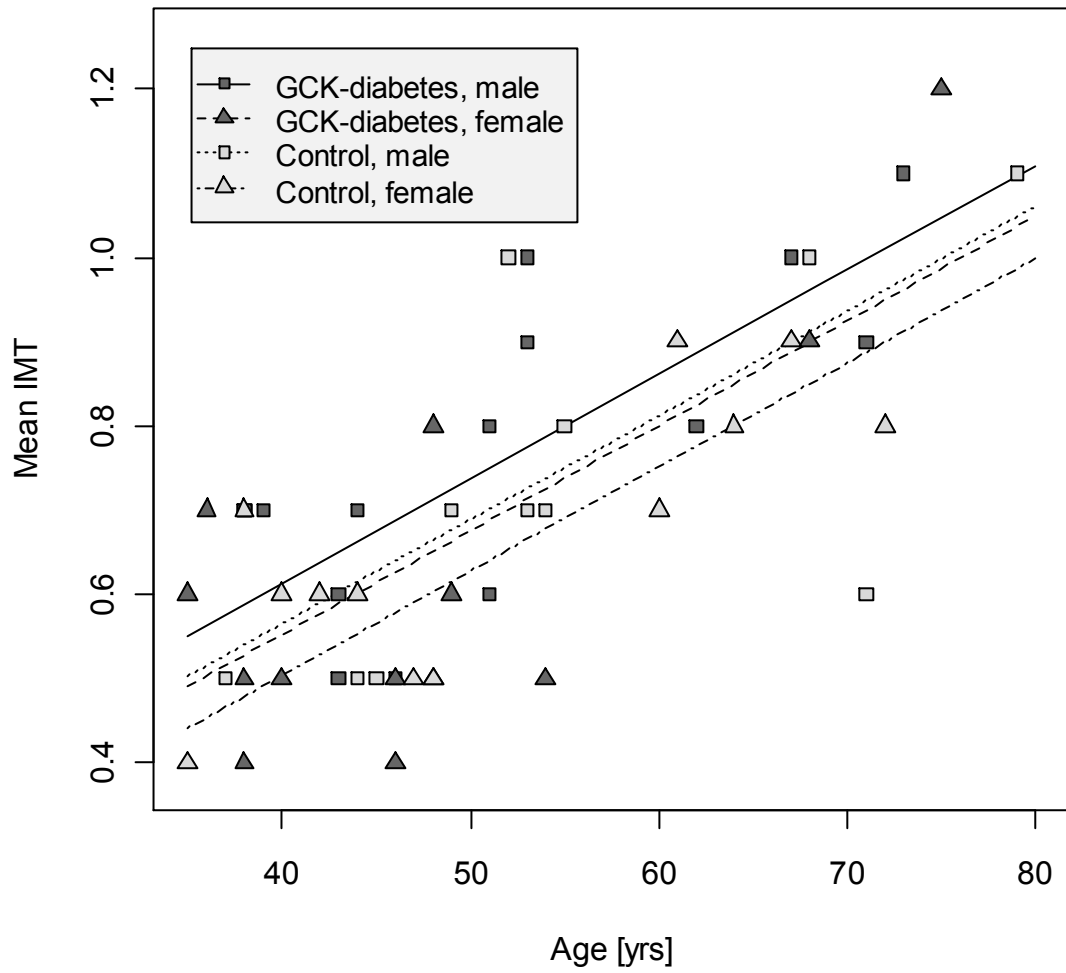


Table 1

Clinical and biochemical characteristics of participants with GCK-MODY and control individuals. Counts and percentages are shown for categorical variables; means and standard deviations are shown for numerical variables. P-values compare the unadjusted means/percentages between the two groups.

	Controls <i>n</i> = 24	GCK-MODY <i>n</i> = 27	<i>p</i> -value
Gender : <i>Female</i>	13 (54.2%)	12 (44.4%)	0.58
<i>Male</i>	11 (45.8%)	15 (55.6%)	
Smoking : <i>Non-smoker</i>	20 (83.3%)	22 (81.5%)	1
<i>Smoker</i>	4 (16.7%)	5 (18.5%)	
Age [yr]	53 (12.2)	49.8 (12.1)	0.35
Weight [kg]	81.7 (14)	77.2 (12.9)	0.23
Height [cm]	172 (7.43)	170 (7.34)	0.35
BMI [kg/m ²]	27.7 (4.32)	26.8 (4.04)	0.43
Waist circumference [cm]	96.8 (13.6)	92.1 (12.3)	0.20
Hip circumference [cm]	108 (7.97)	104 (9.88)	0.081
Waist-to-hip ratio	0.892 (0.083)	0.881 (0.121)	0.73
Systolic blood pressure [mmHg]	124 (12.8)	122 (20.8)	0.8
Diastolic blood pressure [mmHg]	75.6 (9.7)	72.6 (12.5)	0.34
Glycaemia [mmol/l]	5.26 (0.33)	7.58 (1.17)	<0.001
HBA _{1c} [%]	5.74 (0.381)	6.92 (0.957)	<0.001
HBA _{1c} [mmol/mol]	39 (3)	52 (10)	<0.001
C-peptide [pmol/l]	871 (301)	853 (545)	0.89
Total cholesterol [mmol/l]	5.42 (0.866)	5.15 (0.856)	0.26
HDL cholesterol [mmol/l]	1.51 (0.368)	1.52 (0.366)	0.94
LDL cholesterol [mmol/l]	3.16 (0.66)	2.85 (0.757)	0.13
Triglycerides [mmol/l]	1.54 (0.858)	1.58 (1.33)	0.9
Creatinine [mmol/l]	70.5 (19.1)	73.6 (22.1)	0.59
GMT [μkat/l]	0.468 (0.307)	0.647 (0.785)	0.28
Microalbuminuria [μg/mg creatinine]	6.58 (10.1)	24.8 (61)	0.15
Albumin/creatinine ratio	0.818 (1.56)	5.11 (14.6)	0.17
Intima media thickness [mm]	0.692 (0.189)	0.707 (0.215)	0.78

4.7 Modifikátor GCK-MODY

M. Borowiec, W. Fendler, P. Dušátková, K. Antosik, Š. Průhová, O. Cinek, M. Mysliwiec, P. Jarosz-Chobot, M. T. Malecki, W. Mlynarski: HbA_{1c}-based Diabetes Diagnosis Among Patients with Glucokinase Mutation (GCK-MODY) is Affected by a Genetic Variant of Glucose-6-Phosphatase (G6PC2). Rukopis v recenzním řízení.

Produkt genu *G6PC2* (glucose-6-phosphatase catalytic 2 gene) je enzym zapojený do zpracování glukózy, který byl detekován v ostrůvcích pankreatu. Celogenomové asociační studie ukázaly, že jednonukleotidové polymorfizmy v tomto genu jsou asociovány s glykemií na lačno a HbA_{1c} (Bouatia-Naji, 2008; Soranzo, 2010). Proto jsme se ve spolupráci s polskými kolegy rozhodli zkoumat vztah genotypů polymorfizmu rs560887 v genu *G6PC2* s klinickými charakteristikami pacientů s GCK-MODY, zejména s hladinou HbA_{1c}.

Genotyp GG byl asociován s mírně vyšší hladinou HbA_{1c} u českých i polských pacientů s GCK-MODY. Rovněž jsme ukázali, že pacienti s rizikovým genotypem GG mají vyšší pravděpodobnost dosažení hodnoty glykovaného hemoglobinu představující klinickou hranici pro diabetes dle kritérií americké diabetologické asociace (ADA, 2011). Předpokládáme tedy, že rizikový genotyp GG polymorfizmu rs560887 může mít aditivní efekt k mutaci v *GCK*. Vztah mutace v *GCK* a testovaného polymorfizmu však nemohl být detailněji studován kvůli nedostatečnému množství stejných mutací v kohortě pacientů s GCK-MODY.

Short Report

HbA1c-based Diabetes Diagnosis Among Patients with Glucokinase Mutation (GCK-MODY) is Affected by a Genetic Variant of Glucose-6-Phosphatase (G6PC2)

Short title: Genetic modulator of GCK-MODY

#M Borowiec¹, #W Fendler¹, P Dusatkova², K Antosik¹, S Pruhova², O Cinek², M Mysliwiec³, P Jarosz-Chobot⁴, MT Malecki⁵, W Mlynarski¹

#M. Borowiec and W. Fendler contributed equally to this study

¹Department of Paediatrics, Oncology, Haematology and Diabetology, Medical University of Lodz, Poland

²Department of Paediatrics, University Hospital Motol, Second Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

³Department of Paediatrics, Oncology, Haematology and Endocrinology, Medical University of Gdansk, Poland

⁴Department of Paediatrics, Endocrinology and Diabetes, Silesian Medical University of Katowice, Poland

⁵Department of Metabolic Diseases, Collegium Medicum Jagiellonian University of Cracow, Poland

Corresponding author:

Wojciech Mlynarski, MD, PhD

Department of Paediatrics, Oncology, Haematology and Diabetology

36/50 Sporna Str. 91-738 Lodz, Poland

Phone 48 42 617 77 69, Fax: 48 42 617 77 98

Email: Wojciech.Mlynarski@umed.lodz.pl

Word count: Main text - 1413; Abstract - 247

Abstract

Aims: Genetic variation at the rs560887 locus of the glucose-6-phosphatase, catalytic 2 gene (*G6PC2*) is known to affect regulation of fasting glycaemia. We determined the rs560887 genotype of patients with monogenic diabetes and glucokinase gene mutations (GCK-MODY) and correlated the genotypes with HbA1c levels.

Methods: Patients from GCK-MODY families were recruited from two large cohorts from Poland (N=128) and Czech Republic (N=158). Genotypes at rs560887 polymorphic site in *G6PC2* were examined using real-time quantitative-PCR. The effect of rs560887 genotype on age at diagnosis of GCK-MODY and initial HbA1c

levels were evaluated separately within both cohorts. Following that, a metaanalysis of rs560887 genotype–HbA1c associations of both Polish and Czech cohorts was performed to confirm homogeneity of findings and validate cohort-specific results.

Results: GG homozygosity at rs560887 was associated with marginally elevated HbA1c levels ($p=0.07$ in both cohorts). The effects observed in both groups were very homogeneous ($Q=0.18$; $p=0.68$). Metaanalysis showed that GG homozygosity at rs560887 was associated with mean HbA1c levels higher by 0.24% [95% Confidence Interval (95%CI): 0.05-0.44] than in individuals with other genotypes. Additionally, metaanalysis of both cohorts showed that GG homozygous individuals had higher odds of reaching the 6.5% (48 mmol/mol) diagnostic threshold of diabetes of the ADA; (OR=1.90; 95%CI =1.07-3.36; $p=0.03$). No such effects was observed for age at diagnosis of diabetes.

Conclusions: Variation at the rs560887 locus of *G6PC2* is associated with a more severe GCK-MODY phenotype; GG homozygotes are more likely to meet diagnostic criteria for diabetes based on HbA1c level.

Keywords: MODY; Glucose Metabolism; Diagnosis

Abbreviations: *G6PC2* – glucose-6 phosphatase catalytic subunit 2 gene; *GCK* – glucokinase gene; GCK-MODY – monogenic diabetes caused by mutations in *GCK*; *GCKR* – glucokinase regulator gene;

Introduction

Mutations in the glucokinase gene (*GCK*) result in a phenotype of fasting hyperglycaemia (GCK-MODY) [1]. Recent reports show that genetic variation of the glucose-6-phosphatase, catalytic 2 gene (*G6PC2*) may affect fasting glycaemia and HbA1c levels [2,3]. Carriage of the G allele at polymorphic site rs560887 in *G6PC2* was implicated both in elevated fasting plasma glucose and higher HbA1c levels resulting in elevated risk of developing impaired fasting glucose [4]. Although Edghill and co-workers found no clearly pathogenic mutations in *G6PC2* in patients with diabetes of monogenic origin [5], we hypothesized that the rs560887 polymorphism in *G6PC2* may result in a more pronounced clinical picture of GCK-MODY, due to higher HbA1c levels and more frequent diagnosis of diabetes in such individuals.

Patients and Methods

The Institutional Ethics Committee approved the study and informed consent was obtained from all patients. The characteristics of the Polish cohort of patients with GCK-MODY were described earlier [6]. For validation purposes, clinical data were obtained from the MODY registry in the Czech Republic [7]. Patients without data on

initial HbA1c levels were excluded from analysis. Genotyping at rs560887 was performed by means of allele-specific real-time quantitative PCR using a commercially available assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at the Polish centre.

The analysis covered the probands from GCK-MODY families who were diagnosed with diabetes using the ADA criteria based on glucose level only. Additionally, HbA1c measurement was evaluated as a diagnostic tool according to the current ADA recommendations in patients with GCK-MODY. In the Polish cohort, HbA1c was measured by using high-performance liquid chromatography and the Bio-Rad VARIANT program (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), certified by the National Glycohaemoglobin Standardization Programme (NGSP) as meeting the DCCT standard. At the Czech centre, HbA1c values were obtained by using definitive boronate affinity HPLC technology–PDQ plus (Primus Corporation, Kansas City, MO, USA). Mean HbA1c in controls in both centres were estimated at $5.9 \pm 0.15\%$ (41 ± 1.5 mmol/mol) during the study period.

Continuous variables were presented as medians and interquartile ranges (25-75%) and compared using the Mann-Whitney U test. Categorical variables were presented as numbers (Ns) and percentages and compared by using Pearson's Chi-square or Fisher's two-tailed exact test. Odds ratios (ORs) with 95% Confidence Intervals (95%CI) were calculated where possible.

Despite the expected homogeneity of both groups, it was deemed likely that cohort-specific effects resulting from different screening approaches or time of data collection could be important. Two possible options to factoring in such effect were: a metaanalysis or multivariate regression modelling adjusting for centre-dependent factors. The latter approach, would average the results of the two cohorts and most likely fail to detect any group-specific factor interactions due to limited priori statistical power resulting from an impossibility to account for all potential confounders. The metaanalysis however, would cover all such unknown group-specific effects by computing an aggregate effect without transformations or averaging of the results over the two cohorts. Therefore, a decision was made that it was better suited for the primary analysis of study results. Metaanalyses were performed using the Hedges' g statistic and the DerSimonian and Laird method for fixed and random effects model evaluation. Heterogeneity of each model was analyzed using the Q statistic and the Breslow-Day test. A p value of <0.05 was considered significant.

Results

The whole Polish and Czech cohorts consisted of 128 and 154 probands with GCK-MODY, respectively. Full clinical data on age at evaluation and initial HbA1c were

obtained for 79 Polish patients (61.7%) and 120 Czech patients (77.9%). No differences in age at onset or gender distribution between patients included and excluded from the study ($p=0.12$ and 0.90 respectively). The remaining groups were homogenous for age at diagnosis, gender and metabolic control (Table 1).

Genotype frequencies for rs560887 of *G6PC2* did not differ between the Polish and the Czech cohorts ($p=0.58$) and did not deviate significantly from Hardy-Weinberg expectations in either group ($p=0.36$ and 0.78 , respectively). HbA1c levels at diabetes onset were higher by $0.24\%/2.4$ mmol/mol (95%CI = 0.05 to 0.44% / 0.5 to 4.4 mmol/mol; $p=0.01$) in GG homozygotes than in A allele carriers. GG homozygotes were nearly twice as likely (OR=1.90; 95%CI = 1.07 to 3.36 ; $p=0.03$) to reach diagnostic threshold for diabetes of 6.5% proposed by the ADA [8] (Figure 1). Multivariate regression analysis with adjustment for study centre yielded results convergent with those shown in the study - increase of HbA1c by 0.23% (2.3 mmol/mol) in GG homozygotes after adjustment for cohort ($p=0.047$). Differences of age at onset between GG homozygous patients and A allele carriers were not statistically significant (12.62 ± 7.83 years in GG homozygotes and 13.48 ± 7.95 in A allele carriers; $p=0.40$). No cohort-dependent differences of age at onset were observed in the Polish and Czech subgroups ($p=0.09$ and $p=0.39$ respectively). In a control group of 84 healthy volunteers of Polish origin, genotype frequencies at rs560887 equalled: AA – 7.1% (N=6), AG – 42.9% (N=36) and GG – 50.0% (N=42) and did not differ from both the Polish ($p=0.49$) or Czech ($p=0.38$) cohorts showing no overrepresentation of either genotype in GCK-MODY patients.

Discussion

The GCK-MODY patients show a mild phenotype with fasting hyperglycaemia or diabetes without ketoacidosis and the majority of cases does not any kind of treatment. As the main feature of GCK-MODY is elevated blood glucose, genetic variability associated with elevated blood glucose levels may lead to a more severe clinical course of diabetes and poorer metabolic control. Results of our study show that rs560887 may indeed affect HbA1c levels, which can have clinical consequences in GCK-MODY individuals. Firstly, HbA1c exceeding the 6.5% (48 mmol/mol) threshold is a criterion for diagnosis of diabetes with all its therapeutical and psychosocial consequences. Secondly, worse metabolic control in patients with GCK mutations may potentially make patients less likely to enter genetic screening. . Finally, higher HbA1c levels may be associated with greater risk of diabetic complications, although data confirming this effect in GCK-MODY patients is lacking. These factors support the initial hypothesis that *G6PC2* may be a factor influencing

the clinical picture of GCK-MODY through altered detection rate, higher HbA1c levels, and possibly greater need for additional therapeutic interventions.

The effect of *G6PC2* polymorphism on HbA1c level was similar in both cohorts, and no subgroup of patients with particular mutations could be identified. The effect of *G6PC2* on elevating HbA1c levels seems conserved regardless of population or presence of *GCK* mutation. As shown in a recent metaanalysis of genome-wide association studies the effect of rs560887 may result in meeting the HbA1c threshold and influencing and potentially resulting in reclassification of patients screened for diabetes using HbA1c [2]. Presented results show that the odds of crossing the diagnostic HbA1c threshold in patients with GCK-MODY are greater in GG homozygous patients, making them more likely to be diagnosed with diabetes. Effects of rs560887 on fasting glucose may be additive to those of specific *GCK* mutations, exacerbating the clinical phenotype of diabetes. Unfortunately, the numbers of particular mutations were not sufficient to perform formal testing of polymorphism–mutation interaction effects.

Other polymorphic sites known to be associated with plasma glucose concentration through altered *GCK* activity were reported within the *GCK* promoter (rs1799884) and the *GCKR* (glucokinase regulator) structural gene (rs1260326) [9]. However, the Authors considered effects of both these polymorphisms' effects to be impossible to be measured accurately within the presented study. The rs1799884 was excluded due to potential linkage disequilibrium of the polymorphic site with mutations located within the same haplotype. The second had to be ruled out due to known direct interaction of *GCKR* with *GCK*, which could be altered by specific mutations of the latter [10]. As the biologic impact of all 96 different mutations observed in the studied groups was unknown, and bioinformatic models offer no definite proof as to which mutations would be most detrimental for protein interaction, the authors refrained from using the above-mentioned polymorphic sites in their analysis. Different study approaches are required to prove whether these *GCK* modulators may actually affect the clinical spectrum of GCK-MODY. Papers on the effects of variability in *G6PC2* also report a potential effect of the rs552976 locus on HbA1c. [2] However, as both remain in strong linkage according to HapMap data ($D' = 0.9$ in the European population) the study was limited to only to one of these in order to decrease redundancy and multiple hypothesis testing.

In conclusion, the *G6PC2* polymorphic site rs560887 is associated with higher levels of HbA1c in patients with GCK-MODY. This may translate toward higher detection rates of GCK-MODY among GG homozygotes if the HbA1c criterion is used.

Acknowledgements: The project was funded by the Innovative Economy Operational Program – Activity 1.2 (the TEAM Program coordinated by the Foundation for Polish Science); Ministry of Science and Higher Education – grant numbers: N402 478137 and N407 022535. Recruitment of the Czech patients was supported by an institutional grant from the Czech Ministry of Health (NT11402). Maciej Malecki has received financial support from the European Union Framework Programme 7 CEED3 grant.

Declaration of Conflicting Interests – None of the authors have any conflicting interests, financial or otherwise, related to the preparation and publication of this manuscript.

References

- [1] Ellard S, Bellanne-Chantelot C, Hattersley AT. Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia* 2008; **51**: 546-553.
- [2] Soranzo N, Sanna S, Wheeler E, Gieger C, Radke D, Dupuis J *et al.* Common variants at 10 genomic loci influence haemoglobin A(C) levels via glycaemic and nonglycaemic pathways. *Diabetes* 2010; **59**: 3229-3239.
- [3] Bouatia-Naji N, Rocheleau G, Van LL, Lemaire K, Schuit F, Cavalcanti-Proenca C *et al.* A polymorphism within the G6PC2 gene is associated with fasting plasma glucose levels. *Science* 2008; **320**: 1085-1088.
- [4] Renstrom F, Shungin D, Johansson I, Florez JC, Hallmans G, Hu FB *et al.* Genetic predisposition to long-term nondiabetic deteriorations in glucose homeostasis: Ten-year follow-up of the GLACIER study. *Diabetes* 2011; **60**: 345-354.
- [5] Edghill EL, McCulloch L, Fulton P, Beer N, Hattersley AT, Gloyn AL. Mutations in the third gene shown to alter fasting glucose levels in the population (G6PC2) are not a common cause of monogenic forms of pancreatic B-cell dysfunction. *Diabet Med* 2009; **26**: 113-114.
- [6] Borowiec M, Antosik K, Fendler W, Deja G, Jarosz-Chobot P, Mysliwiec M *et al.* Novel glucokinase mutations in patients with monogenic diabetes - clinical outline of GCK-MD and potential for founder effect in Slavic population. *Clin Genet* 2011, doi: 10.1111/j.1399-0004.2011.01656.x. [epub ahead of print]

- [7] Pruhova S, Dusatkova P, Sumnik Z, Kolouskova S, Pedersen O, Hansen T *et al.* Glucokinase diabetes in 103 families from a country-based study in the Czech Republic: geographically restricted distribution of two prevalent GCK mutations. *Pediatr Diabetes* 2010; **11**: 529-535.
- [8] Diagnosis and classification of diabetes mellitus *Diabetes Care* 2011; **34** **Suppl 1**: S62-S69.
- [9] Reiling E, van 't RE, Groenewoud MJ, Welschen LM, van Hove EC, Nijpels G *et al.* Combined effects of single-nucleotide polymorphisms in GCK, GCKR, G6PC2 and MTNR1B on fasting plasma glucose and type 2 diabetes risk. *Diabetologia* 2009; **52**: 1866-1870.
- [10] Garcia-Herrero CM, Galan M, Vincent O, Flandez B, Gargallo M, Delgado-Alvarez E *et al.* Functional analysis of human glucokinase gene mutations causing MODY2: exploring the regulatory mechanisms of glucokinase activity. *Diabetologia* 2007; **50**: 325-333.

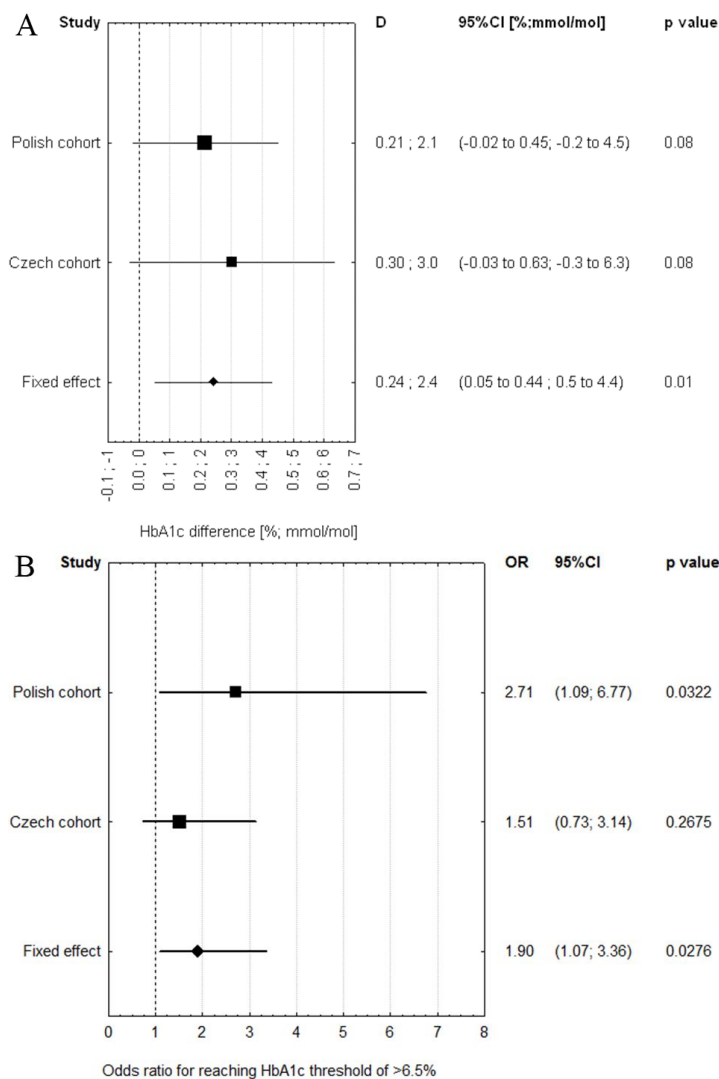
Table 1 – Clinical characteristics and *G6PC2* rs560887 genotype distributions in the study groups. Data are presented as medians with interquartile ranges or numbers and % where appropriate. N/A – not available.

	Polish cohort	Czech cohort	p value
Variable	Median (25-75%)	Median (25-75%)	
Age at diagnosis [years]	11 (6.3-14.7)	12.0 (7.0 – 15.0)	0.69
Total cholesterol [mmol/l]	4.31 (3.78 – 4.99)	N/A	N/A
HDL [mmol/l]	1.16 (0.93 – 1.50)	N/A	N/A
Triglycerides [mmol/l]	0.83 (0.64 – 1.21)	N/A	N/A
HbA1c [%;mmol/mol]	6.50 (6.10-6.75); 48 (41-50)	6.50 (6.18-7.05); 48 (44-54)	0.11
	N (%)	N (%)	p value
Male sex [n, (%)]	41 (51.9%)	63 (52.5%)	0.92
rs560887 genotype	N (%)	N (%)	p value
GG	38 (48.1%)	50 (41.7%)	0.58
GA	31 (39.2%)	56 (46.7%)	
AA	10 (12.7%)	14 (11.7%)	

Figure captions

Figure 1: A – Metaanalysis of the effect of the GG genotype contrasted with A allele carriage at rs560887 in Polish and Czech cohorts on mean glycated haemoglobin levels (HbA1c). As the results were homogenous, with a Q value of 0.18 and p=0.68, the fixed effects model was used. D – difference of means; 95%CI – 95% Confidence Interval. A difference of 0.1% equals 1 mmol/mol within the observed range of values.

B – Metaanalysis of the association between crossing the 6.5% (48 mmol/mol) threshold of HbA1c with the GG genotype contrasted with A allele carriage at rs560887. OR – odds ratio. As the results were homogenous, with a Q value of 0.96 and p=0.33, the fixed effects model was used.



5. Závěr

Předkládaná dizertační práce je dílčím výsledkem systematického studia MODY diabetu v České republice, který započal již před 13 lety díky MUDr. Štěpánce Průhové, Ph.D. a Prof. MUDr. Janu Leblovi, CSc.

Pomocí molekulárně-genetických metod jsme prokázali diagnózu MODY u více než 240 českých rodin, z nichž u některých jsme popsali i vzácné formy tohoto onemocnění (**kapitoly 4.3 a 4.5**). Na druhou stranu jsme ukázali, že některé subtypy MODY se pravděpodobně vyskytují pouze v některých populacích pacientů s diabetem (**kapitola 4.4**). V českém registru monogenního diabetu je nejčastěji zastoupen subtyp GCK-MODY, což je ve shodě s převažujícím způsobem příchodu pacientů suspektních na MODY, kteří se spíše rekrutují z pediatrických ambulancí (**kapitola 4.1**). U pacientů s GCK-MODY jsme se rovněž zaměřili na studium makrovaskulárních komplikací spojených s hyperglykemií, které ukázalo, že ani několik desetiletí života s vyšší glykemií nezvyšuje u pacientů s GCK-MODY riziko vzniku aterosklerózy (**kapitola 4.6**). Podle výsledků společné práce s polskými kolegy však může být u těchto pacientů hladina HbA_{1c} modulována polymorfizmy v genu G6PC2, jehož proteinový produkt interaguje s glukokinázou (**kapitola 4.7**). Studium ancestrálních mutací v genu GCK u českých a polských rodin jsme hlouběji porozuměli populační genetice subtypu GCK-MODY (**kapitola 4.2**).

I naše práce tudíž ukazuje důležitost molekulárně-genetického vyšetření genů způsobujících MODY. Neprokáže se tím pouze příčina onemocnění, ale získáme možnost vysvětlit klinické znaky asociované s MODY, stanovit prognózu vývoje diabetu a v neposlední řadě dává výsledek genetiky MODY ošetřujícím lékařům prostor k optimalizaci léčby pacienta. Z hlediska rodiny pacientů s MODY je důležitým benefitem možnost prediktivního testování příbuzných, čímž je možné zabránit budoucím komplikacím spojených s diabetem.

Charakterizace MODY genů přispěla k významnému zlepšení znalostí o homeostáze glukózy v posledních desetiletích a v budoucnosti může pomoci při definování nových cílů léčby diabetu.

5.1 Směry dalšího výzkumu

Ve výzkumné části projektu bychom se rádi v budoucnosti zabývali hledáním nových MODY genů ve skupině českých rodin klinicky odpovídajícím MODY avšak bez nalezené kauzální mutace (MODYX), funkčními analýzami

patogenity nových, dosud nepopsaných mutací v nejběžnějších MODY genech a rovněž se zaměříme na studium kvality života rodin s MODY.

6. Seznam citované literatury

American Diabetes Association (ADA): Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. National Diabetes Data Group. *Diabetes*, 1979. 28(12): 1039-57.

American Diabetes Association (ADA): Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 2011. 34 (Suppl 1): S62-9.

Ahlgren U., Jonsson J., Jonsson L., Simu K. and Edlund H.: beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev*, 1998. 12(12): 1763-8.

Aittoniemi J., Fotinou C., Craig T. J., de Wet H., Proks P. and Ashcroft F. M.: Review. SUR1: a unique ATP-binding cassette protein that functions as an ion channel regulator. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2009. 364(1514): 257-67.

Aminbakhsh A. and Mancini G. B.: Carotid intima-media thickness measurements: what defines an abnormality? A systematic review. *Clin Invest Med*, 1999. 22(4): 149-57.

Araki E., Oyadomari S. and Mori M.: Impact of endoplasmic reticulum stress pathway on pancreatic beta-cells and diabetes mellitus. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2003. 228(10): 1213-7.

Babenko A. P., Polak M., Cave H., Busiah K., Czernichow P., Scharfmann R., Bryan J., Aguilar-Bryan L., Vaxillaire M. and Froguel P.: Activating mutations in the *ABCC8* gene in neonatal diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 2006. 355(5): 456-66.

Bach I. and 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): 4229-42.

Bailyes E. M. and Hutton J. C.: Kinetic analysis of the type-1 proinsulin endopeptidase by a monoclonal antibody-based immunoabsorbent assay. *Biochem J*, 1992. 286: 223-9.

Barbacci E., Chalkiadaki A., Masdeu C., Haumaitre C., Lokmane L., Loirat C., Cloarec S., Talianidis I., Bellanne-Chantelot C. and Cereghini S.: HNF1beta/TCF2 mutations impair transactivation potential through altered co-regulator recruitment. *Hum Mol Genet*, 2004. 13(24): 3139-49.

Barrett T. G.: Mitochondrial diabetes, DIDMOAD and other inherited diabetes syndromes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2001. 15(3): 325-43.

Bell G. I., Xiang K. S., Newman M. V., Wu S. H., Wright L. G., Fajans S. S., Spielman R. S. and Cox N. J.: Gene for non-insulin-dependent diabetes mellitus

(maturity-onset diabetes of the young subtype) is linked to DNA polymorphism on human chromosome 20q. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(4): 1484-8.

Bellanne-Chantelot C., Chauveau D., Gautier J. F., Dubois-Laforgue D., Clauin S., Beaufile S., Wilhelm J. M., Boitard C., Noel L. H., Velho G. and Timsit J.: Clinical spectrum associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations. *Ann Intern Med*, 2004. 140(7): 510-7.

Bellanne-Chantelot C., Clauin S., Chauveau D., Collin P., Daumont M., Douillard C., Dubois-Laforgue D., Dusselier L., Gautier J. F., Jadoul M., Laloï-Michelin M., Jacquesson L., Larger E., Louis J., Nicolino M., Subra J. F., Wilhem J. M., Young J., Velho G. and Timsit J.: Large genomic rearrangements in the hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) gene are the most frequent cause of maturity-onset diabetes of the young type 5. *Diabetes*, 2005. 54(11): 3126-32.

Bennett S. T., Wilson A. J., Cucca F., Nerup J., Pociot F., McKinney P. A., Barnett A. H., Bain S. C. and Todd J. A.: IDDM2-VNTR-encoded susceptibility to type 1 diabetes: dominant protection and parental transmission of alleles of the insulin gene-linked minisatellite locus. *J Autoimmun*, 1996. 9(3): 415-21.

Bieker J. J.: Kruppel-like factors: three fingers in many pies. *J Biol Chem*, 2001. 276(37): 34355-8.

Bingham C., Ellard S., Allen L., Bulman M., Shepherd M., Frayling T., Berry P. J., Clark P. M., Lindner T., Bell G. I., Ryffel G. U., Nicholls A. J. and Hattersley A. T.: Abnormal nephron development associated with a frameshift mutation in the transcription factor hepatocyte nuclear factor-1 beta. *Kidney Int*, 2000. 57(3): 898-907.

Bjorkhaug L., Sagen J. V., Thorsby P., Sovik O., Molven A. and Njolstad P. R.: Hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene mutations and diabetes in Norway. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. 88(2): 920-31.

Black A. R., Black J. D. and Azizkhan-Clifford J.: Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol*, 2001. 188(2): 143-60.

Boesgaard T. W., Pruhova S., Andersson E. A., Cinek O., Obermannova B., Lauenborg J., Damm P., Bergholdt R., Pociot F., Pisinger C., Barbetti F., Lebl J., Pedersen O. and Hansen T.: Further evidence that mutations in INS can be a rare cause of Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY). *BMC Med Genet*, 2010. 11(42).

Bogan A. A., Dallas-Yang Q., Ruse M. D., Jr., Maeda Y., Jiang G., Nepomuceno L., Scanlan T. S., Cohen F. E. and Sladek F. M.: Analysis of protein

dimerization and ligand binding of orphan receptor HNF4 α . *J Mol Biol*, 2000. 302(4): 831-51.

Boj S. F., Parrizas M., Maestro M. A. and Ferrer J.: A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(25): 14481-6.

Bonfanti R., Colombo C., Nocerino V., Massa O., Lampasona V., Iafusco D., Viscardi M., Chiumello G., Meschi F. and Barbetti F.: Insulin gene mutations as cause of diabetes in children negative for five type 1 diabetes autoantibodies. *Diabetes Care*, 2009. 32(1): 123-5.

Bonnefond A., Lomber G., Buttar N., Busiah K., Vaillant E., Lobbens S., Yengo L., Dechaume A., Mignot B., Simon A., Scharfmann R., Neve B., Tanyolac S., Hodoglugil U., Pattou F., Cave H., Iovanna J., Stein R., Polak M., Vaxillaire M., Froguel P. and Urrutia R.: Disruption of a novel Kruppel-like transcription factor p300-regulated pathway for insulin biosynthesis revealed by studies of the c.-331 INS mutation found in neonatal diabetes mellitus. *J Biol Chem*, 2011. 286(32): 28414-24.

Borowiec M., Liew C. W., Thompson R., Boonyasrisawat W., Hu J., Mlynarski W. M., El Khattabi I., Kim S. H., Marselli L., Rich S. S., Krolewski A. S., Bonner-Weir S., Sharma A., Sale M., Mychaleckyj J. C., Kulkarni R. N. and Doria A.: 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): 14460-5.

Bottini N., Vang T., Cucca F., Mustelin T.: Role of PTPN22 in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. *Semin Immunol*, 2006. 18(4):207-13.

Bouatia-Naji N., Rocheleau G., Van Lommel L., Lemaire K., Schuit F., Cavalcanti-Proenca C., Marchand M., Hartikainen A. L., Sovio U., De Graeve F., Rung J., Vaxillaire M., Tichet J., Marre M., Balkau B., Weill J., Elliott P., Jarvelin M. R., Meyre D., Polychronakos C., Dina C., Sladek R. and Froguel P.: A polymorphism within the G6PC2 gene is associated with fasting plasma glucose levels. *Science*, 2008. 320(5879): 1085-8.

Boutin P., Vasseur F., Samson C., Wahl C. and Froguel P.: Routine mutation screening of HNF-1 α and GCK genes in MODY diagnosis: how effective are the techniques of DHPLC and direct sequencing used in combination? *Diabetologia*, 2001. 44(6): 775-8.

Bowman P., Flanagan S. E., Edghill E. L., Damhuis A., Shepherd M. H., Paisey R., Hattersley A. T. and Ellard S.: Heterozygous ABCC8 mutations are a cause of MODY. *Diabetologia*, 2011. 55(1): 123-7.

Bruneau N., Nganga A., Fisher E. A. and Lombardo D.: O-Glycosylation of C-terminal tandem-repeated sequences regulates the secretion of rat pancreatic bile salt-dependent lipase. *J Biol Chem*, 1997. 272(43): 27353-61.

Buck A., Buchholz M., Wagner M., Adler G., Gress T. and Ellenrieder V.: The tumor suppressor KLF11 mediates a novel mechanism in transforming growth factor beta-induced growth inhibition that is inactivated in pancreatic cancer. *Mol Cancer Res*, 2006. 4(11): 861-72.

Burke C. V., Buettger C. W., Davis E. A., McClane S. J., Matschinsky F. M. and Raper S. E.: Cell-biological assessment of human glucokinase mutants causing maturity-onset diabetes of the young type 2 (MODY-2) or glucokinase-linked hyperinsulinaemia (GK-HI). *Biochem J*, 1999. 342: 345-52.

Cardenas M. L., Cornish-Bowden A. and Ureta T.: Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim Biophys Acta*, 1998. 1401(3): 242-64.

Coffinier C., Barra J., Babinet C. and Yaniv M.: Expression of the vHNF1/HNF1beta homeoprotein gene during mouse organogenesis. *Mech Dev*, 1999. 89(1-2): 211-3.

Davies J. L., Kawaguchi Y., Bennett S. T., Copeman J. B., Cordell H. J., Pritchard L. E., Reed P. W., Gough S. C., Jenkins S. C., Palmer S. M. and et al.: A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature*, 1994. 371(6493): 130-6.

Dean S., Tang J. I., Seckl J. R. and Nyirenda M. J.: Developmental and tissue-specific regulation of hepatocyte nuclear factor 4-alpha (HNF4-alpha) isoforms in rodents. *Gene Expr*, 2010. 14(6): 337-44.

Desoye G. and Shafrir E.: Placental metabolism and its regulation in health and diabetes. *Mol Aspects Med*, 1994. 15(6): 505-682.

Dhe-Paganon S., Duda K., Iwamoto M., Chi Y. I. and Shoelson S. E.: Crystal structure of the HNF4 alpha ligand binding domain in complex with endogenous fatty acid ligand. *J Biol Chem*, 2002. 277(41): 37973-6.

Dipple K. M. and McCabe E. R.: Modifier genes convert "simple" Mendelian disorders to complex traits. *Mol Genet Metab*, 2000. 71(1-2): 43-50.

Djaberi R., Beishuizen E. D., Pereira A. M., Rabelink T. J., Smit J. W., Tamsma J. T., Huisman M. V. and Jukema J. W.: Non-invasive cardiac imaging techniques and vascular tools for the assessment of cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*, 2008. 51(9): 1581-93.

Dohrmann C., Gruss P. and Lemaire L.: Pax genes and the differentiation of hormone-producing endocrine cells in the pancreas. *Mech Dev*, 2000. 92(1): 47-54.

Duncan S. A., Navas M. A., Dufort D., Rossant J. and Stoffel M.: Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. *Science*, 1998. 281(5377): 692-5.

Dupont S., Vionnet N., Chevre J. C., Gallina S., Dina C., Seino Y., Yamada Y. and Froguel P.: No evidence of linkage or diabetes-associated mutations in the transcription factors BETA2/NEUROD1 and PAX4 in Type II diabetes in France. *Diabetologia*, 1999. 42(4): 480-4.

Dymecki S. M., Niederhuber J. E. and Desiderio S. V.: Specific expression of a tyrosine kinase gene, *blk*, in B lymphoid cells. *Science*, 1990. 247(4940): 332-6.

Edghill E. L., Flanagan S. E., Patch A. M., Boustred C., Parrish A., Shields B., Shepherd M. H., Hussain K., Kapoor R. R., Malecki M., MacDonald M. J., Stoy J., Steiner D. F., Philipson L. H., Bell G. I., Hattersley A. T. and Ellard S.: Insulin mutation screening in 1,044 patients with diabetes: mutations in the *INS* gene are a common cause of neonatal diabetes but a rare cause of diabetes diagnosed in childhood or adulthood. *Diabetes*, 2008. 57(4): 1034-42.

Edghill E. L., Minton J. A., Groves C. J., Flanagan S. E., Patch A. M., Rubio-Cabezas O., Shepherd M., Lenzen S., McCarthy M. I., Ellard S. and Hattersley A. T.: Sequencing of candidate genes selected by beta cell experts in monogenic diabetes of unknown aetiology. *JOP*, 2010. 11(1): 14-7.

Eide S. A., Raeder H., Johansson S., Midthjell K., Sovik O., Njolstad P. R. and Molven A.: Prevalence of *HNF1A* (*MODY3*) mutations in a Norwegian population (the HUNT2 Study). *Diabet Med*, 2008. 25(7): 775-81.

Ellard S. and 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. 27(9): 854-69.

Ellard S., Bellanne-Chantelot C. and Hattersley A. T.: Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia*, 2008. 51(4): 546-53.

Estalella I., Rica I., Perez de Nanclares G., Bilbao J. R., Vazquez J. A., San Pedro J. I., Busturia M. A. and 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): 538-46.

Eto K., Sakura H., Shimokawa K., Kadowaki H., Hagura R., Akanuma Y., Yazaki Y. and Kadowaki T.: Sequence variations of the glucokinase gene in Japanese subjects with *NIDDM*. *Diabetes*, 1993. 42(8): 1133-7.

Fajans S. S., Bell G. I., Paz V. P., Below J. E., Cox N. J., Martin C., Thomas I. H. and Chen M.: Obesity and hyperinsulinemia in a family with pancreatic agenesis and MODY caused by the IPF1 mutation Pro63fsX60. *Transl Res*, 2010. 156(1): 7-14.

Fajans S. S. and Conn J. W.: Studies on a test for the prediction of diabetes mellitus. *J Mich State Med Soc*, 1954. 53(10, Part 1): 1126-31.

Fajans S. S.: Leucine-Induced Hypoglycemia. *N Engl J Med*, 1965. 272(1224-7).

Fajans S. S.: Maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Diabetes Metab Rev*, 1989. 5(7): 579-606.

Fajans S. S., Bell G. I. and Polonsky K. S.: Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med*, 2001. 345(13): 971-80.

Fajans S. S. and Bell G. I.: Macrosomia and neonatal hypoglycaemia in RW pedigree subjects with a mutation (Q268X) in the gene encoding hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4A). *Diabetologia*, 2007. 50(12): 2600-1.

Fajans S. S. and Bell G. I.: MODY: history, genetics, pathophysiology, and clinical decision making. *Diabetes Care*, 2011. 34(8): 1878-84.

Feigerlova E., Pruhova S., Dittertova L., Lebl J., Pinterova D., Kolostova K., Cerna M., Pedersen O. and Hansen T.: Aetiological heterogeneity of asymptomatic hyperglycaemia in children and adolescents. *Eur J Pediatr*, 2006. 165(7): 446-52.

Fernandez-Zapico M. E., van Velkinburgh J. C., Gutierrez-Aguilar R., Neve B., Froguel P., Urrutia R. and Stein R.: MODY7 gene, KLF11, is a novel p300-dependent regulator of Pdx-1 (MODY4) transcription in pancreatic islet beta cells. *J Biol Chem*, 2009. 284(52): 36482-90.

Ferrer J.: A genetic switch in pancreatic beta-cells: implications for differentiation and haploinsufficiency. *Diabetes*, 2002. 51(8): 2355-62.

Flanagan S. E., Patch A. M., Mackay D. J., Edghill E. L., Gloyn A. L., Robinson D., Shield J. P., Temple K., Ellard S. and Hattersley A. T.: Mutations in ATP-sensitive K⁺ channel genes cause transient neonatal diabetes and permanent diabetes in childhood or adulthood. *Diabetes*, 2007. 56(7): 1930-7.

Frayling T. M., Bulman M. P., Appleton M., Hattersley A. T. and Ellard S.: A rapid screening method for hepatocyte nuclear factor 1 alpha frameshift mutations; prevalence in maturity-onset diabetes of the young and late-onset non-insulin dependent diabetes. *Hum Genet*, 1997. 101(3): 351-4.

Frayling T. M., Evans J. C., Bulman M. P., Pearson E., Allen L., Owen K., Bingham C., Hannemann M., Shepherd M., Ellard S. and Hattersley A. T.: beta-cell

genes and diabetes: molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors. *Diabetes*, 2001. 50(Suppl 1): S94-100.

Froguel P., Vaxillaire M., Sun F., Velho G., Zouali H., Butel M. O., Lesage S., Vionnet N., Clement K., Fougere F. and et al.: Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*, 1992. 356(6365): 162-4.

Furuta H., Iwasaki N., Oda N., Hinokio Y., Horikawa Y., Yamagata K., Yano N., Sugahiro J., Ogata M., Ohgawara H., Omori Y., Iwamoto Y. and Bell G. I.: Organization and partial sequence of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha/MODY1 gene and identification of a missense mutation, R127W, in a Japanese family with MODY. *Diabetes*, 1997. 46(10): 1652-7.

Garcia-Herrero C. M., Galan M., Vincent O., Flandez B., Gargallo M., Delgado-Alvarez E., Blazquez E. and Navas M. A.: Functional analysis of human glucokinase gene mutations causing MODY2: exploring the regulatory mechanisms of glucokinase activity. *Diabetologia*, 2007. 50(2): 325-33.

Garin I., Edghill E. L., Akerman I., Rubio-Cabezas O., Rica I., Locke J. M., Maestro M. A., Alshaikh A., Bundak R., del Castillo G., Deeb A., Deiss D., Fernandez J. M., Godbole K., Hussain K., O'Connell M., Klupa T., Kolouskova S., Mohsin F., Perlman K., Sumnik Z., Rial J. M., Ugarte E., Vasanthi T., Johnstone K., Flanagan S. E., Martinez R., Castano C., Patch A. M., Fernandez-Rebollo E., Raile K., Morgan N., Harries L. W., Castano L., Ellard S., Ferrer J., Perez de Nanclares G. and Hattersley A. T.: Recessive mutations in the INS gene result in neonatal diabetes through reduced insulin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(7): 3105-10.

Giuffrida F. M. and Reis A. F.: Genetic and clinical characteristics of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes Obes Metab*, 2005. 7(4): 318-26.

Gloyn A. L., Pearson E. R., Antcliff J. F., Proks P., Bruining G. J., Slingerland A. S., Howard N., Srinivasan S., Silva J. M., Molnes J., Edghill E. L., Frayling T. M., Temple I. K., Mackay D., Shield J. P., Sumnik Z., van Rhijn A., Wales J. K., Clark P., Gorman S., Aisenberg J., Ellard S., Njolstad P. R., Ashcroft F. M. and Hattersley A. T.: Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N Engl J Med*, 2004. 350(18): 1838-49.

Gloyn A. L., Odili S., Zelent D., Buettger C., Castleden H. A., Steele A. M., Stride A., Shiota C., Magnuson M. A., Lorini R., d'Annunzio G., Stanley C. A., Kwagh J., van Schaftingen E., Veiga-da-Cunha M., Barbetti F., Dunten P., Han Y., Grimsby J., Taub R., Ellard S., Hattersley A. T. and Matschinsky F. M.: Insights into the

structure and regulation of glucokinase from a novel mutation (V62M), which causes maturity-onset diabetes of the young. *J Biol Chem*, 2005. 280(14): 14105-13.

Gonsorcikova L., Pruhova S., Cinek O., Ek J., Pelikanova T., Jorgensen T., Eiberg H., Pedersen O., Hansen T. and Lebl J.: Autosomal inheritance of diabetes in two families characterized by obesity and a novel H241Q mutation in NEUROD1. *Pediatr Diabetes*, 2008. 9(4): 367-72.

Gonsorcikova L., Vaxillaire M., Pruhova S., Dechaume A., Dusatkova P., Cinek O., Pedersen O., Froguel P., Hansen T. and Lebl J.: Familial mild hyperglycemia associated with a novel ABCC8-V84I mutation within three generations. *Pediatr Diabetes*, 2011. 12(3): 266-9.

Gragoli C., Lindner T., Cockburn B. N., Kaisaki P. J., Gragnoli F., Marozzi G. and Bell G. I.: Maturity-onset diabetes of the young due to a mutation in the hepatocyte nuclear factor-4 alpha binding site in the promoter of the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene. *Diabetes*, 1997. 46(10): 1648-51.

Gragoli C., Stanojevic V., Gorini A., Von Preussenthal G. M., Thomas M. K. and Habener J. F.: IPF-1/MODY4 gene missense mutation in an Italian family with type 2 and gestational diabetes. *Metabolism*, 2005. 54(8): 983-8.

Groop L. and Lyssenko V.: Genetics of type 2 diabetes. An overview. *Endocrinol Nutr*, 2009. 56(Suppl 4): 34-7.

Grupe A., Hultgren B., Ryan A., Ma Y. H., Bauer M. and Stewart T. A.: Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic beta cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis. *Cell*, 1995. 83(1): 69-78.

Hanefeld M., Koehler C., Henkel E., Fuecker K., Schaper F. and Temelkova-Kurktschiev T.: Post-challenge hyperglycaemia relates more strongly than fasting hyperglycaemia with carotid intima-media thickness: the RIAD Study. Risk Factors in Impaired Glucose Tolerance for Atherosclerosis and Diabetes. *Diabet Med*, 2000. 17(12): 835-40.

Hansen S. K., Parrizas M., Jensen M. L., Pruhova S., Ek J., Boj S. F., Johansen A., Maestro M. A., Rivera F., Eiberg H., Andel M., Lebl J., Pedersen O., Ferrer J. and Hansen T.: Genetic evidence that HNF-1alpha-dependent transcriptional control of HNF-4alpha is essential for human pancreatic beta cell function. *J Clin Invest*, 2002. 110(6): 827-33.

Harries L. W., Locke J. M., Shields B., Hanley N. A., Hanley K. P., Steele A., Njolstad P. R., Ellard S. and Hattersley A. T.: The diabetic phenotype in HNF4A mutation carriers is moderated by the expression of HNF4A isoforms from the P1 promoter during fetal development. *Diabetes*, 2008. 57(6): 1745-52.

Hattersley A. T., Turner R. C., Permutt M. A., Patel P., Tanizawa Y., Chiu K. C., O'Rahilly S., Watkins P. J. and Wainscoat J. S.: Linkage of type 2 diabetes to the glucokinase gene. *Lancet*, 1992. 339(8805): 1307-10.

Hattersley A. T., Beards F., Ballantyne E., Appleton M., Harvey R. and Ellard S.: Mutations in the glucokinase gene of the fetus result in reduced birth weight. *Nat Genet*, 1998. 19(3): 268-70.

Hattersley A. T. and Pearson E. R.: Minireview: pharmacogenetics and beyond: the interaction of therapeutic response, beta-cell physiology, and genetics in diabetes. *Endocrinology*, 2006. 147(6): 2657-63.

Henderson M., Levy E., Delvin E., Losekoot M. and Lambert M.: Prevalence and clinical phenotype of the p.Val226Met glucokinase gene mutation in French Canadians in Quebec, Canada. *Mol Genet Metab*, 2007. 90(1): 87-92.

Heni M., Ketterer C., Hart L. M., Ranta F., van Haeften T. W., Eekhoff E. M., Dekker J. M., Boomsma D. I., Nijpels G., Kramer M. H., Diamant M., Simonis-Bik A. M., Heine R. J., de Geus E. J., Schafer S. A., Machicao F., Ullrich S., Thamer C., Stefan N., Staiger H., Haring H. U. and Fritsche A.: The impact of genetic variation in the G6PC2 gene on insulin secretion depends on glycemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010. 95(12): E479-84.

Higuchi S., Nakamura Y. and Saito S.: Characterization of a VNTR polymorphism in the coding region of the CEL gene. *J Hum Genet*, 2002. 47(4): 213-5.

Horikawa Y., Iwasaki N., Hara M., Furuta H., Hinokio Y., Cockburn B. N., Lindner T., Yamagata K., Ogata M., Tomonaga O., Kuroki H., Kasahara T., Iwamoto Y. and Bell G. I.: Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat Genet*, 1997. 17(4): 384-5.

Howles P. N., Carter C. P. and Hui D. Y.: Dietary free and esterified cholesterol absorption in cholesterol esterase (bile salt-stimulated lipase) gene-targeted mice. *J Biol Chem*, 1996. 271(12): 7196-202.

Hu C., Zhang R., Wang C., Yu W., Lu J., Ma X., Wang J., Jiang F., Tang S., Bao Y., Xiang K. and Jia W.: Effects of GCK, GCKR, G6PC2 and MTNR1B variants on glucose metabolism and insulin secretion. *PLoS One*, 2010. 5(7): e11761.

Hui D. Y.: Molecular biology of enzymes involved with cholesterol ester hydrolysis in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta*, 1996. 1303(1): 1-14.

Huopio H., Shyng S. L., Otonkoski T. and Nichols C. G.: K(ATP) channels and insulin secretion disorders. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002. 283(2): E207-16.

Huopio H., Otonkoski T., Vauhkonen I., Reimann F., Ashcroft F. M. and Laakso M.: A new subtype of autosomal dominant diabetes attributable to a mutation in the gene for sulfonylurea receptor 1. *Lancet*, 2003. 361(9354): 301-7.

Hwang J. S., Shin C. H., Yang S. W., Jung S. Y. and Huh N.: Genetic and clinical characteristics of Korean maturity-onset diabetes of the young (MODY) patients. *Diabetes Res Clin Pract*, 2006. 74(1): 75-81.

Chan K. W., Zhang H. and Logothetis D. E.: N-terminal transmembrane domain of the SUR controls trafficking and gating of Kir6 channel subunits. *EMBO J*, 2003. 22(15): 3833-43.

Chen R., Hussain K., Al-Ali M., Dattani M. T., Hindmarsh P., Jones P. M. and Marsh P.: Neonatal and late-onset diabetes mellitus caused by failure of pancreatic development: report of 4 more cases and a review of the literature. *Pediatrics*, 2008. 121(6): e1541-7.

Chen Y. Z., Gao Q., Zhao X. Z., Bennett C. L., Xiong X. S., Mei C. L., Shi Y. Q. and Chen X. M.: Systematic review of TCF2 anomalies in renal cysts and diabetes syndrome/maturity onset diabetes of the young type 5. *Chin Med J (Engl)*, 2010. 123(22): 3326-33.

Chuzhanova N., Abeysinghe S. S., Krawczak M. and Cooper D. N.: Translocation and gross deletion breakpoints in human inherited disease and cancer II: Potential involvement of repetitive sequence elements in secondary structure formation between DNA ends. *Hum Mutat*, 2003. 22(3): 245-51.

Ishizaka N., Ishizaka Y., Yamakado M., Toda E., Koike K. and Nagai R.: Association between metabolic syndrome and carotid atherosclerosis in individuals without diabetes based on the oral glucose tolerance test. *Atherosclerosis*, 2009. 204(2): 619-23.

Isomaa B., Henricsson M., Lehto M., Forsblom C., Karanko S., Sarelin L., Hagglom M. and Groop L.: Chronic diabetic complications in patients with MODY3 diabetes. *Diabetologia*, 1998. 41(4): 467-73.

Ilyedjian P. B.: Molecular physiology of mammalian glucokinase. *Cell Mol Life Sci*, 2009. 66(1): 27-42.

Jetton T. L., Liang Y., Pettepher C. C., Zimmerman E. C., Cox F. G., Horvath K., Matschinsky F. M. and Magnuson M. A.: Analysis of upstream glucokinase promoter activity in transgenic mice and identification of glucokinase in rare neuroendocrine cells in the brain and gut. *J Biol Chem*, 1994. 269(5): 3641-54.

Jo W., Endo M., Ishizu K., Nakamura A. and Tajima T.: A novel PAX4 mutation in a Japanese patient with maturity-onset diabetes of the young. *Tohoku J Exp Med*, 2011. 223(2): 113-8.

Johansen A., Ek J., Mortensen H. B., Pedersen O. and 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(8): 4607-14.

Johansson B. B., Torsvik J., Bjorkhaug L., Vesterhus M., Ragvin A., Tjora E., Fjeld K., Hoem D., Johansson S., Raeder H., Lindquist S., Hernell O., Cnop M., Saraste J., Flatmark T., Molven A. and Njolstad P. R.: Diabetes and pancreatic exocrine dysfunction due to mutations in the carboxyl ester lipase gene-maturity onset diabetes of the young (CEL-MODY): a protein misfolding disease. *J Biol Chem*, 2011. 286(40): 34593-605.

Johnson J. D., Ahmed N. T., Luciani D. S., Han Z., Tran H., Fujita J., Misler S., Edlund H. and Polonsky K. S.: Increased islet apoptosis in Pdx1^{+/-} mice. *J Clin Invest*, 2003. 111(8): 1147-60.

Jonsson J., Carlsson L., Edlund T. and Edlund H.: Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*, 1994. 371(6498): 606-9.

Kaisaki P. J., Menzel S., Lindner T., Oda N., Rjasanowski I., Sahn J., Meincke G., Schulze J., Schmechel H., Petzold C., Ledermann H. M., Sachse G., Boriraj V. V., Menzel R., Kerner W., Turner R. C., Yamagata K. and Bell G. I.: 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): 528-35.

Kamata K., Mitsuya M., Nishimura T., Eiki J. and Nagata Y.: Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure*, 2004. 12(3): 429-38.

Kaneto H., Miyagawa J., Kajimoto Y., Yamamoto K., Watada H., Umayahara Y., Hanafusa T., Matsuzawa Y., Yamasaki Y., Higashiyama S. and Taniguchi N.: Expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor during pancreas development. A potential role of PDX-1 in transcriptional activation. *J Biol Chem*, 1997. 272(46): 29137-43.

Kapoor R. R., Locke J., Colclough K., Wales J., Conn J. J., Hattersley A. T., Ellard S. and Hussain K.: Persistent hyperinsulinemic hypoglycemia and maturity-onset diabetes of the young due to heterozygous HNF4A mutations. *Diabetes*, 2008. 57(6): 1659-63.

Kaprio J., Tuomilehto J., Koskenvuo M., Romanov K., Reunanen A., Eriksson J., Stengard J. and Kesaniemi Y. A.: Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia*, 1992. 35(11): 1060-7.

Kitanaka S., Miki Y., Hayashi Y. and Igarashi T.: Promoter-specific repression of hepatocyte nuclear factor (HNF)-1 beta and HNF-1 alpha transcriptional activity by an HNF-1 beta missense mutant associated with Type 5 maturity-onset diabetes of the young with hepatic and biliary manifestations. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(3): 1369-78.

Koster J. C., Marshall B. A., Ensor N., Corbett J. A. and Nichols C. G.: Targeted overactivity of beta cell K(ATP) channels induces profound neonatal diabetes. *Cell*, 2000. 100(6): 645-54.

Kristinsson S. Y., Thorolfsdottir E. T., Talseth B., Steingrimsson E., Thorsson A. V., Helgason T., Hreidarsson A. B. and Arngrimsson R.: MODY in Iceland is associated with mutations in HNF-1alpha and a novel mutation in NeuroD1. *Diabetologia*, 2001. 44(11): 2098-103.

Kropff J., Selwood M. P., McCarthy M. I., Farmer A. J. and Owen K. R.: Prevalence of monogenic diabetes in young adults: a community-based, cross-sectional study in Oxfordshire, UK. *Diabetologia*, 2011. 54(5): 1261-3.

Ledermann H. M.: Is maturity onset diabetes at young age (MODY) more common in Europe than previously assumed? *Lancet*, 1995. 345(8950): 648.

Lee Y. H., Sauer B. and Gonzalez F. J.: Laron dwarfism and non-insulin-dependent diabetes mellitus in the Hnf-1alpha knockout mouse. *Mol Cell Biol*, 1998. 18(5): 3059-68.

Lehto M., Tuomi T., Mahtani M. M., Widen E., Forsblom C., Sarelin L., Gullstrom M., Isomaa B., Lehtovirta M., Hyrkko A., Kanninen T., Orho M., Manley S., Turner R. C., Bretin T., Kirby A., Thomas J., Duyk G., Lander E., Taskinen M. R. and Groop L.: Characterization of the MODY3 phenotype. Early-onset diabetes caused by an insulin secretion defect. *J Clin Invest*, 1997. 99(4): 582-91.

Lindner T. H., Cockburn B. N. and Bell G. I.: Molecular genetics of MODY in Germany. *Diabetologia*, 1999. 42(1): 121-3.

Liu L., Furuta H., Minami A., Zheng T., Jia W., Nanjo K. and Xiang K.: A novel mutation, Ser159Pro in the NeuroD1/BETA2 gene contributes to the development of diabetes in a Chinese potential MODY family. *Mol Cell Biochem*, 2007. 303(1-2): 115-20.

Liu M., Haataja L., Wright J., Wickramasinghe N. P., Hua Q. X., Phillips N. F., Barbetti F., Weiss M. A. and Arvan P.: Mutant INS-gene induced diabetes of youth: proinsulin cysteine residues impose dominant-negative inhibition on wild-type proinsulin transport. *PLoS One*, 2010. 5(10): e13333.

Lombardo D.: Bile salt-dependent lipase: its pathophysiological implications. *Biochim Biophys Acta*, 2001. 1533(1): 1-28.

Lombardo F., De Luca F., Rosano M., Sferlazzas C., Lucanto C., Arrigo T., Messina M. F., Crisafulli G., Wasniewska M., Valenzise M. and Cucinotta D.: Natural history of glucose tolerance, beta-cell function and peripheral insulin sensitivity in cystic fibrosis patients with fasting euglycemia. *Eur J Endocrinol*, 2003. 149(1): 53-9.

Lorini R., Klersy C., d'Annunzio G., Massa O., Minuto N., Iafusco D., Bellanne-Chantelot C., Frongia A. P., Toni S., Meschi F., Cerutti F. and Barbetti F.: Maturity-onset diabetes of the young in children with incidental hyperglycemia: a multicenter Italian study of 172 families. *Diabetes Care*, 2009. 32(10): 1864-6.

Maassen J. A.: Mitochondrial diabetes: pathophysiology, clinical presentation, and genetic analysis. *Am J Med Genet*, 2002. 115(1): 66-70.

Madsen O. D., Jensen J., Petersen H. V., Pedersen E. E., Oster A., Andersen F. G., Jorgensen M. C., Jensen P. B., Larsson L. I. and Serup P.: Transcription factors contributing to the pancreatic beta-cell phenotype. *Horm Metab Res*, 1997. 29(6): 265-70.

Maestro M. A., Boj S. F., Luco R. F., Pierreux C. E., Cabedo J., Servitja J. M., German M. S., Rousseau G. G., Lemaigre F. P. and Ferrer J.: Hnf6 and Tcf2 (MODY5) are linked in a gene network operating in a precursor cell domain of the embryonic pancreas. *Hum Mol Genet*, 2003. 12(24): 3307-14.

Malecki M. T., Jhala U. S., Antonellis A., Fields L., Doria A., Orban T., Saad M., Warram J. H., Montminy M. and Krolewski A. S.: Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet*, 1999. 23(3): 323-8.

Marselli L., Thorne J., Ahn Y. B., Omer A., SgROI D. C., Libermann T., Otu H. H., Sharma A., Bonner-Weir S. and Weir G. C.: Gene expression of purified beta-cell tissue obtained from human pancreas with laser capture microdissection. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. 93(3): 1046-53.

Marshak S., Benshushan E., Shoshkes M., Havin L., Cerasi E. and Melloul D.: Functional conservation of regulatory elements in the pdx-1 gene: PDX-1 and hepatocyte nuclear factor 3beta transcription factors mediate beta-cell-specific expression. *Mol Cell Biol*, 2000. 20(20): 7583-90.

Martin D., Bellanne-Chantelot C., Deschamps I., Froguel P., Robert J. J. and Velho G.: Long-term follow-up of oral glucose tolerance test-derived glucose tolerance and insulin secretion and insulin sensitivity indexes in subjects with glucokinase mutations (MODY2). *Diabetes Care*, 2008. 31(7): 1321-3.

Marz W., Nauck M., Hoffmann M. M., Nagel D., Boehm B. O., Koenig W., Rothenbacher D. and Winkelmann B. R.: G(-30)A polymorphism in the pancreatic

promoter of the glucokinase gene associated with angiographic coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation*, 2004. 109(23): 2844-9.

McDonald T. J., Shields B. M., Lawry J., Owen K. R., Gloyn A. L., Ellard S. and Hattersley A. T.: High-sensitivity CRP discriminates HNF1A-MODY from other subtypes of diabetes. *Diabetes Care*, 2011. 34(8): 1860-2.

McNeill A. M., Rosamond W. D., Girman C. J., Heiss G., Golden S. H., Duncan B. B., East H. E. and Ballantyne C.: Prevalence of coronary heart disease and carotid arterial thickening in patients with the metabolic syndrome (The ARIC Study). *Am J Cardiol*, 2004. 94(10): 1249-54.

Melloul D., Marshak S. and Cerasi E.: Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia*, 2002. 45(3): 309-26.

Miquerol L., Lopez S., Cartier N., Tulliez M., Raymondjean M. and Kahn A.: Expression of the L-type pyruvate kinase gene and the hepatocyte nuclear factor 4 transcription factor in exocrine and endocrine pancreas. *J Biol Chem*, 1994. 269(12): 8944-51.

Miralles F., Battelino T., Czernichow P. and Scharfmann R.: TGF-beta plays a key role in morphogenesis of the pancreatic islets of Langerhans by controlling the activity of the matrix metalloproteinase MMP-2. *J Cell Biol*, 1998. 143(3): 827-36.

Molven A., Ringdal M., Nordbo A. M., Raeder H., Stoy J., Lipkind G. M., Steiner D. F., Philipson L. H., Bergmann I., Aarskog D., Undlien D. E., Joner G., Sovik O., Bell G. I. and Njolstad P. R.: Mutations in the insulin gene can cause MODY and autoantibody-negative type 1 diabetes. *Diabetes*, 2008. 57(4): 1131-5.

Murphy R., Ellard S. and Hattersley A. T.: Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2008. 4(4): 200-13.

Naya F. J., Stellrecht C. M. and Tsai M. J.: Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev*, 1995. 9(8): 1009-19.

Naya F. J., Huang H. P., Qiu Y., Mutoh H., DeMayo F. J., Leiter A. B. and Tsai M. J.: Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev*, 1997. 11(18): 2323-34.

Naylor R. and Philipson L. H.: Who should have genetic testing for maturity-onset diabetes of the young? *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2011. 75(4): 422-6.

Neve B., Fernandez-Zapico M. E., Ashkenazi-Katalan V., Dina C., Hamid Y. H., Joly E., Vaillant E., Benmezroua Y., Durand E., Bakaher N., Delannoy V., Vaxillaire M., Cook T., Dallinga-Thie G. M., Jansen H., Charles M. A., Clement K.,

Galan P., Hercberg S., Helbecque N., Charpentier G., Prentki M., Hansen T., Pedersen O., Urrutia R., Melloul D. and Froguel P.: 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): 4807-12.

Ng S. B., Turner E. H., Robertson P. D., Flygare S. D., Bigham A. W., Lee C., Shaffer T., Wong M., Bhattacharjee A., Eichler E. E., Bamshad M., Nickerson D. A. and Shendure J.: Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature*, 2009. 461(7261): 272-6.

Nishigori H., Yamada S., Kohama T., Tomura H., Sho K., Horikawa Y., Bell G. I., Takeuchi T. and Takeda J.: Frameshift mutation, A263fsinsGG, in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene associated with diabetes and renal dysfunction. *Diabetes*, 1998. 47(8): 1354-5.

Niskanen L., Rauramaa R., Miettinen H., Haffner S. M., Mercuri M. and Uusitupa M.: Carotid artery intima-media thickness in elderly patients with NIDDM and in nondiabetic subjects. *Stroke*, 1996. 27(11): 1986-92.

Nistico L., Buzzetti R., Pritchard L. E., Van der Auwera B., Giovannini C., Bosi E., Larrad M. T., Rios M. S., Chow C. C., Cockram C. S., Jacobs K., Mijovic C., Bain S. C., Barnett A. H., Vandewalle C. L., Schuit F., Gorus F. K., Tosi R., Pozzilli P. and Todd J. A.: The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Belgian Diabetes Registry. Hum Mol Genet*, 1996. 5(7): 1075-80.

Niu X., Perakakis N., Laubner K., Limbert C., Stahl T., Brendel M. D., Bretzel R. G., Seufert J. and Path G.: Human Kruppel-like factor 11 inhibits human proinsulin promoter activity in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 2007. 50(7): 1433-41.

Njolstad P. R., Sovik O., Cuesta-Munoz A., Bjorkhaug L., Massa O., Barbetti F., Undlien D. E., Shiota C., Magnuson M. A., Molven A., Matschinsky F. M. and Bell G. I.: Neonatal diabetes mellitus due to complete glucokinase deficiency. *N Engl J Med*, 2001. 344(21): 1588-92.

Nyunt O., Wu J. Y., McGown I. N., Harris M., Huynh T., Leong G. M., Cowley D. M. and Cotterill A. M.: Investigating maturity onset diabetes of the young. *Clin Biochem Rev*, 2009. 30(2): 67-74.

Okita K., Yang Q., Yamagata K., Hangenfeldt K. A., Miyagawa J., Kajimoto Y., Nakajima H., Namba M., Wollheim C. B., Hanafusa T. and Matsuzawa Y.: Human insulin gene is a target gene of hepatocyte nuclear factor-1alpha (HNF-1alpha) and HNF-1beta. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 263(2): 566-9.

Ong K. K., Phillips D. I., Fall C., Poulton J., Bennett S. T., Golding J., Todd J. A. and Dunger D. B.: The insulin gene VNTR, type 2 diabetes and birth weight. *Nat Genet*, 1999. 21(3): 262-3.

Osbak K. K., Colclough K., Saint-Martin C., Beer N. L., Bellanne-Chantelot C., Ellard S. and Gloyn A. L.: Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Hum Mutat*, 2009. 30(11): 1512-26.

Page R. C., Hattersley A. T., Levy J. C., Barrow B., Patel P., Lo D., Wainscoat J. S., Permutt M. A., Bell G. I. and Turner R. C.: Clinical characteristics of subjects with a missense mutation in glucokinase. *Diabet Med*, 1995. 12(3): 209-17.

Panzram G. and Adolph W.: Heterogeneity of maturity onset diabetes at young age (MODY). *Lancet*, 1981. 2(8253): 986.

Pearson E. R., Liddell W. G., Shepherd M., Corral R. J. and Hattersley A. T.: Sensitivity to sulphonylureas in patients with hepatocyte nuclear factor-1alpha gene mutations: evidence for pharmacogenetics in diabetes. *Diabet Med*, 2000. 17(7): 543-5.

Pearson E. R., Starkey B. J., Powell R. J., Gribble F. M., Clark P. M. and Hattersley A. T.: Genetic cause of hyperglycaemia and response to treatment in diabetes. *Lancet*, 2003. 362(9392): 1275-81.

Pearson E. R., Pruhova S., Tack C. J., Johansen A., Castleden H. A., Lumb P. J., Wierzbicki A. S., Clark P. M., Lebl J., Pedersen O., Ellard S., Hansen T. and Hattersley A. T.: Molecular genetics and phenotypic characteristics of MODY caused by hepatocyte nuclear factor 4alpha mutations in a large European collection. *Diabetologia*, 2005. 48(5): 878-85.

Pearson E. R., Flechtner I., Njolstad P. R., Malecki M. T., Flanagan S. E., Larkin B., Ashcroft F. M., Klimes I., Codner E., Iotova V., Slingerland A. S., Shield J., Robert J. J., Holst J. J., Clark P. M., Ellard S., Sovik O., Polak M. and Hattersley A. T.: Switching from insulin to oral sulfonylureas in patients with diabetes due to Kir6.2 mutations. *N Engl J Med*, 2006. 355(5): 467-77.

Pearson E. R., Boj S. F., Steele A. M., Barrett T., Stals K., Shield J. P., Ellard S., Ferrer J. and Hattersley A. T.: Macrosomia and hyperinsulinaemic hypoglycaemia in patients with heterozygous mutations in the HNF4A gene. *PLoS Med*, 2007. 4(4): e118.

Pinterova D., Ek J., Kolostova K., Pruhova S., Novota P., Romzova M., Feigerlova E., Cerna M., Lebl J., Pedersen O. and Hansen T.: Six novel mutations in the GCK gene in MODY patients. *Clin Genet*, 2007. 71(1): 95-6.

Plengvidhya N., Kooptiwut S., Songtawee N., Doi A., Furuta H., Nishi M., Nanjo K., Tantibhedhyangkul W., Boonyasrisawat W., Yenchitsomanus P. T., Doria A. and Banchuin N.: PAX4 mutations in Thais with maturity onset diabetes of the young. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. 92(7): 2821-6.

Polak M. and Shield J.: Neonatal and very-early-onset diabetes mellitus. *Semin Neonatol*, 2004. 9(1): 59-65.

Polak M., Dechaume A., Cave H., Nimri R., Crosnier H., Sulmont V., de Kerdanet M., Scharfmann R., Lebenthal Y., Froguel P. and Vaxillaire M.: Heterozygous missense mutations in the insulin gene are linked to permanent diabetes appearing in the neonatal period or in early infancy: a report from the French ND (Neonatal Diabetes) Study Group. *Diabetes*, 2008. 57(4): 1115-9.

Pontoglio M., Barra J., Hadchouel M., Doyen A., Kress C., Bach J. P., Babinet C. and Yaniv M.: Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell*, 1996. 84(4): 575-85.

Pontoglio M., Prie D., Cheret C., Doyen A., Leroy C., Froguel P., Velho G., Yaniv M. and Friedlander G.: HNF1alpha controls renal glucose reabsorption in mouse and man. *EMBO Rep*, 2000. 1(4): 359-65.

Porter J. R. and Barrett T. G.: Monogenic syndromes of abnormal glucose homeostasis: clinical review and relevance to the understanding of the pathology of insulin resistance and beta cell failure. *J Med Genet*, 2005. 42(12): 893-902.

Proks P., Girard C., Baevre H., Njolstad P. R. and Ashcroft F. M.: Functional effects of mutations at F35 in the NH2-terminus of Kir6.2 (KCNJ11), causing neonatal diabetes, and response to sulfonylurea therapy. *Diabetes*, 2006. 55(6): 1731-7.

Pruhova S., Ek J., Lebl J., Sumnik Z., Saudek F., Andel M., Pedersen O. and Hansen T.: Genetic epidemiology of MODY in the Czech republic: new mutations in the MODY genes HNF-4alpha, GCK and HNF-1alpha. *Diabetologia*, 2003. 46(2): 291-5.

Pruhova S., Dusatkova P., Sumnik Z., Kolouskova S., Pedersen O., Hansen T., Cinek O. and Lebl J.: Glucokinase diabetes in 103 families from a country-based study in the Czech Republic: geographically restricted distribution of two prevalent GCK mutations. *Pediatr Diabetes*, 2010. 11(8): 529-35.

R Development Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna. 2001

Raeder H., Johansson S., Holm P. I., Haldorsen I. S., Mas E., Sbarra V., Neramoen I., Eide S. A., Grevle L., Bjorkhaug L., Sagen J. V., Aksnes L., Sovik O., Lombardo D., Molven A. and Njolstad P. R.: Mutations in the CEL VNTR cause a

syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction. *Nat Genet*, 2006. 38(1): 54-62.

Raeder H., Haldorsen I. S., Erslund L., Gruner R., Taxt T., Sovik O., Molven A. and Njolstad P. R.: Pancreatic lipomatosis is a structural marker in nondiabetic children with mutations in carboxyl-ester lipase. *Diabetes*, 2007. 56(2): 444-9.

Reue K., Zambaux J., Wong H., Lee G., Leete T. H., Ronk M., Shively J. E., Sternby B., Borgstrom B., Ameis D. and et al.: cDNA cloning of carboxyl ester lipase from human pancreas reveals a unique proline-rich repeat unit. *J Lipid Res*, 1991. 32(2): 267-76.

Risch N.: Genetics of IDDM: evidence for complex inheritance with HLA. *Genet Epidemiol*, 1989. 6(1): 143-8.

Rodriguez B. L., Abbott R. D., Fujimoto W., Waitzfelder B., Chen R., Masaki K., Schatz I., Petrovitch H., Ross W., Yano K., Blanchette P. L. and Curb J. D.: The American Diabetes Association and World Health Organization classifications for diabetes: their impact on diabetes prevalence and total and cardiovascular disease mortality in elderly Japanese-American men. *Diabetes Care*, 2002. 25(6): 951-5.

Rubio-Cabezas O., Minton J. A., Kantor I., Williams D., Ellard S. and Hattersley A. T.: Homozygous mutations in NEUROD1 are responsible for a novel syndrome of permanent neonatal diabetes and neurological abnormalities. *Diabetes*, 2010. 59(9): 2326-31.

Rubio-Cabezas O., Jensen J. N., Hodgson M. I., Codner E., Ellard S., Serup P. and Hattersley A. T.: Permanent Neonatal Diabetes and Enteric Anendocrinosis Associated With Biallelic Mutations in NEUROG3. *Diabetes*, 2011a. 60(4): 1349-53.

Rubio-Cabezas O., Klupa T. and Malecki M. T.: Permanent neonatal diabetes mellitus--the importance of diabetes differential diagnosis in neonates and infants. *Eur J Clin Invest*, 2011b. 41(3): 323-33.

Sagen J. V., Baumann M. E., Salvesen H. B., Molven A., Sovik O. and Njolstad P. R.: Diagnostic screening of NEUROD1 (MODY6) in subjects with MODY or gestational diabetes mellitus. *Diabet Med*, 2005. 22(8): 1012-5.

Sagen J. V., Bjorkhaug L., Molnes J., Raeder H., Grevle L., Sovik O., Molven A. and Njolstad P. R.: Diagnostic screening of MODY2/GCK mutations in the Norwegian MODY Registry. *Pediatr Diabetes*, 2008. 9(5): 442-9.

Saker P. J., Hattersley A. T., Barrow B., Hammersley M. S., McLellan J. A., Lo Y. M., Olds R. J., Gillmer M. D., Holman R. R. and Turner R. C.: High prevalence of a missense mutation of the glucokinase gene in gestational diabetic patients due to a founder-effect in a local population. *Diabetologia*, 1996. 39(11): 1325-8.

Sanger F. and Thompson E. O.: The amino-acid sequence in the glyceryl chain of insulin. II. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. *Biochem J*, 1953a. 53(3): 366-74.

Sanger F. and Thompson E. O.: The amino-acid sequence in the glyceryl chain of insulin. I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem J*, 1953b. 53(3): 353-66.

Servitja J. M. and Ferrer J.: Transcriptional networks controlling pancreatic development and beta cell function. *Diabetologia*, 2004. 47(4): 597-613.

Sharma A., Moore M., Marcora E., Lee J. E., Qiu Y., Samaras S. and Stein R.: The NeuroD1/BETA2 sequences essential for insulin gene transcription colocalize with those necessary for neurogenesis and p300/CREB binding protein binding. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(1): 704-13.

Shendure J. and Ji H.: Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*, 2008. 26(10): 1135-45.

Shepherd M., Ellis I., Ahmad A. M., Todd P. J., Bowen-Jones D., Mannion G., Ellard S., Sparkes A. C. and Hattersley A. T.: Predictive genetic testing in maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Diabet Med*, 2001. 18(5): 417-21.

Shepherd M. and Hattersley A. T.: '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): 144-7.

Shield J. P., Gardner R. J., Wadsworth E. J., Whiteford M. L., James R. S., Robinson D. O., Baum J. D. and Temple I. K.: Aetiopathology and genetic basis of neonatal diabetes. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 1997. 76(1): F39-42.

Shields B. M., Spyer G., Slingerland A. S., Knight B. A., Ellard S., Clark P. M., Hauguel-de Mouzon S. and Hattersley A. T.: Mutations in the glucokinase gene of the fetus result in reduced placental weight. *Diabetes Care*, 2008. 31(4): 753-7.

Shields B. M., Hicks S., Shepherd M. H., Colclough K., Hattersley A. T. and Ellard S.: Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing? *Diabetologia*, 2010. 53(12): 2504-8.

Shih D. Q. and Stoffel M.: Dissecting the transcriptional network of pancreatic islets during development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(25): 14189-91.

Shih D. Q., Heimesaat M., Kuwajima S., Stein R., Wright C. V. and Stoffel M.: Profound defects in pancreatic beta-cell function in mice with combined heterozygous mutations in Pdx-1, Hnf-1alpha, and Hnf-3beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(6): 3818-23.

Schober E., Rami B., Grabert M., Thon A., Kapellen T., Reinehr T. and Holl R. W.: 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. *Diabet Med*, 2009. 26(5): 466-73.

Schwitzgebel V. M., Mamin A., Brun T., Ritz-Laser B., Zaiko M., Maret A., Jornayvaz F. R., Theintz G. E., Michielin O., Melloul D. and Philippe J.: Agenesis of human pancreas due to decreased half-life of insulin promoter factor 1. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. 88(9): 4398-406.

Sladek F. M., Zhong W. M., Lai E. and Darnell J. E., Jr.: Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev*, 1990. 4(12B): 2353-65.

Smith S. B., Ee H. C., Connors J. R. and German M. S.: Paired-homeodomain transcription factor PAX4 acts as a transcriptional repressor in early pancreatic development. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(12): 8272-80.

Smith S. B., Watada H., Scheel D. W., Mrejen C. and German M. S.: Autoregulation and maturity onset diabetes of the young transcription factors control the human PAX4 promoter. *J Biol Chem*, 2000. 275(47): 36910-9.

Smyth D. J., Cooper J. D., Bailey R., Field S., Burren O., Smink L. J., Guja C., Ionescu-Tirgoviste C., Widmer B., Dunger D. B., Savage D. A., Walker N. M., Clayton D. G. and Todd J. A.: A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nat Genet*, 2006. 38(6): 617-9.

Song C. Z., Gavriilidis G., Asano H. and Stamatoyannopoulos G.: Functional study of transcription factor KLF11 by targeted gene inactivation. *Blood Cells Mol Dis*, 2005. 34(1): 53-9.

Soranzo N., Sanna S., Wheeler E., Gieger C., Radke D., Dupuis J., Bouatia-Naji N., Langenberg C., Prokopenko I., Stolerman E., Sandhu M. S., Heeney M. M., Devaney J. M., Reilly M. P., Ricketts S. L., Stewart A. F., Voight B. F., Willenborg C., Wright B., Altshuler D., Arking D., Balkau B., Barnes D., Boerwinkle E., Boehm B., Bonnefond A., Bonnycastle L. L., Boomsma D. I., Bornstein S. R., Bottcher Y., Bumpstead S., Burnett-Miller M. S., Campbell H., Cao A., Chambers J., Clark R., Collins F. S., Coresh J., de Geus E. J., Dei M., Deloukas P., Doring A., Egan J. M., Elosua R., Ferrucci L., Forouhi N., Fox C. S., Franklin C., Franzosi M. G., Gallina S., Goel A., Graessler J., Grallert H., Greinacher A., Hadley D., Hall A., Hamsten A., Hayward C., Heath S., Herder C., Homuth G., Hottenga J. J., Hunter-Merrill R., Illig T., Jackson A. U., Jula A., Kleber M., Knouff C. W., Kong A., Kooner J., Kottgen A.,

Kovacs P., Krohn K., Kuhnel B., Kuusisto J., Laakso M., Lathrop M., Lecoeur C., Li M., Loos R. J., Luan J., Lyssenko V., Magi R., Magnusson P. K., Malarstig A., Mangino M., Martinez-Larrad M. T., Marz W., McArdle W. L., McPherson R., Meisinger C., Meitinger T., Melander O., Mohlke K. L., Mooser V. E., Morken M. A., Narisu N., Nathan D. M., Nauck M., O'Donnell C., Oexle K., Olla N., Pankow J. S., Payne F., Peden J. F., Pedersen N. L., Peltonen L., Perola M., Polasek O., Porcu E., Rader D. J., Rathmann W., Ripatti S., Rocheleau G., Roden M., Rudan I., Salomaa V., Saxena R., Schlessinger D., Schunkert H., Schwarz P., Seedorf U., Selvin E., Serrano-Rios M., Shrader P., Silveira A., Siscovick D., Song K., Spector T. D., Stefansson K., Steinthorsdottir V., Strachan D. P., Strawbridge R., Stumvoll M., Surakka I., Swift A. J., Tanaka T., Teumer A., Thorleifsson G., Thorsteinsdottir U., Tonjes A., Usala G., Vitart V., Volzke H., Wallaschofski H., Waterworth D. M., Watkins H., Wichmann H. E., Wild S. H., Willemsen G., Williams G. H., Wilson J. F., Winkelmann J., Wright A. F., Zabena C., Zhao J. H., Epstein S. E., Erdmann J., Hakonarson H. H., Kathiresan S., Khaw K. T., Roberts R., Samani N. J., Fleming M. D., Sladek R., Abecasis G., Boehnke M., Froguel P., Groop L., McCarthy M. I., Kao W. H., Florez J. C., Uda M., Wareham N. J., Barroso I. and Meigs J. B.: Common variants at 10 genomic loci influence hemoglobin A(C) levels via glycemc and nonglycemc pathways. *Diabetes*, 2010. 59(12): 3229-39.

Sosa-Pineda B., Chowdhury K., Torres M., Oliver G. and Gruss P.: The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature*, 1997. 386(6623): 399-402.

Sovik O., Njolstad P., Folling I., Sagen J., Cockburn B. N. and Bell G. I.: Hyperexcitability to sulphonylurea in MODY3. *Diabetologia*, 1998. 41(5): 607-8.

Steele A. M., Shields B. M., Shepherd M., Ellard S., Hattersley A. T. and Pearson E. R.: Increased all-cause and cardiovascular mortality in monogenic diabetes as a result of mutations in the HNF1A gene. *Diabet Med*, 2010. 27(2): 157-61.

Stenson P. D., Mort M., Ball E. V., Howells K., Phillips A. D., Thomas N. S. and Cooper D. N.: The Human Gene Mutation Database: 2008 update. *Genome Med*, 2009. 1(1): 13.

Stoffel M. and Duncan S. A.: The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4alpha regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(24): 13209-14.

Stoffers D. A., Ferrer J., Clarke W. L. and Habener J. F.: Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet*, 1997a. 17(2): 138-9.

Stoffers D. A., Zinkin N. T., Stanojevic V., Clarke W. L. and Habener J. F.: Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet*, 1997b. 15(1): 106-10.

Stone M. A., Camosso-Stefinovic J., Wilkinson J., de Lusignan S., Hattersley A. T. and Khunti K.: Incorrect and incomplete coding and classification of diabetes: a systematic review. *Diabet Med*, 2010. 27(5): 491-7.

Stoy J., Edghill E. L., Flanagan S. E., Ye H., Paz V. P., Pluzhnikov A., Below J. E., Hayes M. G., Cox N. J., Lipkind G. M., Lipton R. B., Greeley S. A., Patch A. M., Ellard S., Steiner D. F., Hattersley A. T., Philipson L. H. and Bell G. I.: Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(38): 15040-4.

Stride A., Vaxillaire M., Tuomi T., Barbetti F., Njolstad P. R., Hansen T., Costa A., Conget I., Pedersen O., Sovik O., Lorini R., Groop L., Froguel P. and Hattersley A. T.: The genetic abnormality in the beta cell determines the response to an oral glucose load. *Diabetologia*, 2002. 45(3): 427-35.

Sturis J., Kurland I. J., Byrne M. M., Mosekilde E., Froguel P., Pilkis S. J., Bell G. I. and Polonsky K. S.: Compensation in pancreatic beta-cell function in subjects with glucokinase mutations. *Diabetes*, 1994. 43(5): 718-23.

Suzuki M., Takamisawa I., Suzuki K., Hiuge A., Horio T., Yoshimasa Y. and Harano Y.: Close association of endothelial dysfunction with insulin resistance and carotid wall thickening in hypertension. *Am J Hypertens*, 2004. 17(3): 228-32.

Škrha J., Andělová K., Bendlová B., Broulíková A., Cinek O., Čechurová A., Haluzík M., Jirkovská A., Kalvodová B., Krejčí H., Krupičková Z., Lacigová S., Lebl J., Pelikánová T., Perušičová J., Prázný M., Průhová Š., Rušavý Z., Rybka J., Saudek F., Svačina Š., Šmahelová A., Tesař V. and Widimský jr. J.: *Diabetologie*. Galén, 2009.

Tattersall R. B. and Fajans S. S.: A difference between the inheritance of classical juvenile-onset and maturity-onset type diabetes of young people. *Diabetes*, 1975. 24(1): 44-53.

Tattersall R. B. and Mansell P. I.: Maturity onset-type diabetes of the young (MODY): one condition or many? *Diabet Med*, 1991. 8(5): 402-10.

Temple I. K., Gardner R. J., Robinson D. O., Kibirige M. S., Ferguson A. W., Baum J. D., Barber J. C., James R. S. and Shield J. P.: Further evidence for an imprinted gene for neonatal diabetes localised to chromosome 6q22-q23. *Hum Mol Genet*, 1996. 5(8): 1117-21.

Temple I. K., Gardner R. J., Mackay D. J., Barber J. C., Robinson D. O. and Shield J. P.: Transient neonatal diabetes: widening the understanding of the etiopathogenesis of diabetes. *Diabetes*, 2000. 49(8): 1359-66.

Thomas H., Jaschowitz K., Bulman M., Frayling T. M., Mitchell S. M., Roosen S., Lingott-Frieg A., Tack C. J., Ellard S., Ryffel G. U. and Hattersley A. T.: A distant upstream promoter of the HNF-4alpha gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mol Genet*, 2001. 10(19): 2089-97.

Thomas I. H., Saini N. K., Adhikari A., Lee J. M., Kasa-Vubu J. Z., Vazquez D. M., Menon R. K., Chen M. and Fajans S. S.: Neonatal diabetes mellitus with pancreatic agenesis in an infant with homozygous IPF-1 Pro63fsX60 mutation. *Pediatr Diabetes*, 2009. 10(7): 492-6.

Thomas P. M., Cote G. J., Wohllk N., Haddad B., Mathew P. M., Rabl W., Aguilar-Bryan L., Gagel R. F. and Bryan J.: Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science*, 1995. 268(5209): 426-9.

Todd J. A.: Genetic analysis of type 1 diabetes using whole genome approaches. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(19): 8560-5.

Tominaga M., Eguchi H., Manaka H., Igarashi K., Kato T. and Sekikawa A.: Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. The Funagata Diabetes Study. *Diabetes Care*, 1999. 22(6): 920-4.

Tonooka N., Tomura H., Takahashi Y., Onigata K., Kikuchi N., Horikawa Y., Mori M. and Takeda J.: High frequency of mutations in the HNF-1alpha gene in non-obese patients with diabetes of youth in Japanese and identification of a case of digenic inheritance. *Diabetologia*, 2002. 45(12): 1709-12.

Torsvik J., Johansson S., Johansen A., Ek J., Minton J., Raeder H., Ellard S., Hattersley A., Pedersen O., Hansen T., Molven A. and Njolstad P. R.: Mutations in the VNTR of the carboxyl-ester lipase gene (CEL) are a rare cause of monogenic diabetes. *Hum Genet*, 2010. 127(1): 55-64.

Touboul P. J.: Clinical impact of intima media measurement. *Eur J Ultrasound*, 2002. 16(1-2): 105-13.

Ullrich A., Shine J., Chirgwin J., Pictet R., Tischler E., Rutter W. J. and Goodman H. M.: Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences. *Science*, 1977. 196(4296): 1313-9.

Vaxillaire M., Boccio V., Philippi A., Vigouroux C., Terwilliger J., Passa P., Beckmann J. S., Velho G., Lathrop G. M. and Froguel P.: A gene for maturity onset

diabetes of the young (MODY) maps to chromosome 12q. *Nat Genet*, 1995. 9(4): 418-23.

Velho G., Vaxillaire M., Boccio V., Charpentier G. and Froguel P.: Diabetes complications in NIDDM kindreds linked to the MODY3 locus on chromosome 12q. *Diabetes Care*, 1996. 19(9): 915-9.

Velho G., Blanche H., Vaxillaire M., Bellanne-Chantelot C., Pardini V. C., Timsit J., Passa P., Deschamps I., Robert J. J., Weber I. T., Marotta D., Pilkis S. J., Lipkind G. M., Bell G. I. and Froguel P.: Identification of 14 new glucokinase mutations and description of the clinical profile of 42 MODY-2 families. *Diabetologia*, 1997. 40(2): 217-24.

Vesterhus M., Raeder H., Kurpad A. J., Kawamori D., Molven A., Kulkarni R. N., Kahn C. R. and Njolstad P. R.: Pancreatic function in carboxyl-ester lipase knockout mice. *Pancreatology*, 2010. 10(4): 467-76.

Vionnet N., Stoffel M., Takeda J., Yasuda K., Bell G. I., Zouali H., Lesage S., Velho G., Iris F., Passa P. and et al.: Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*, 1992. 356(6371): 721-2.

von Muhlendahl K. E. and Herkenhoff H.: Long-term course of neonatal diabetes. *N Engl J Med*, 1995. 333(11): 704-8.

Wang H., Antinozzi P. A., Hagenfeldt K. A., Maechler P. and Wollheim C. B.: Molecular targets of a human HNF1 alpha mutation responsible for pancreatic beta-cell dysfunction. *EMBO J*, 2000. 19(16): 4257-64.

Wang J., Elghazi L., Parker S. E., Kizilocak H., Asano M., Sussel L. and Sosa-Pineda B.: The concerted activities of Pax4 and Nkx2.2 are essential to initiate pancreatic beta-cell differentiation. *Dev Biol*, 2004a. 266(1): 178-89.

Wang L., Coffinier C., Thomas M. K., Gresh L., Eddu G., Manor T., Levitsky L. L., Yaniv M. and Rhoads D. B.: Selective deletion of the Hnf1beta (MODY5) gene in beta-cells leads to altered gene expression and defective insulin release. *Endocrinology*, 2004b. 145(8): 3941-9.

Watada H., Mirmira R. G., Leung J. and German M. S.: Transcriptional and translational regulation of beta-cell differentiation factor Nkx6.1. *J Biol Chem*, 2000. 275(44): 34224-30.

Weng J., Ekelund M., Lehto M., Li H., Ekberg G., Frid A., Aberg A., Groop L. C. and Berntorp K.: Screening for MODY mutations, GAD antibodies, and type 1 diabetes--associated HLA genotypes in women with gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 2002. 25(1): 68-71.

Wirsing A., Johnstone K. A., Harries L. W., Ellard S., Ryffel G. U., Stanik J., Gasperikova D., Klimes I. and Murphy R.: Novel monogenic diabetes mutations in the P2 promoter of the HNF4A gene are associated with impaired function in vitro. *Diabet Med*, 2010. 27(6): 631-5.

Wobser H., Dussmann H., Kogel D., Wang H., Reimertz C., Wollheim C. B., Byrne M. M. and Prehn J. H.: Dominant-negative suppression of HNF-1 alpha results in mitochondrial dysfunction, INS-1 cell apoptosis, and increased sensitivity to ceramide-, but not to high glucose-induced cell death. *J Biol Chem*, 2002. 277(8): 6413-21.

World Health Organisation (WHO): Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. The DECODE study group. European Diabetes Epidemiology Group. *Diabetes Epidemiology: Collaborative analysis Of Diagnostic criteria in Europe. Lancet*, 1999. 354(9179): 617-21.

Xu J. Y., Dan Q. H., Chan V., Wat N. M., Tam S., Tiu S. C., Lee K. F., Siu S. C., Tsang M. W., Fung L. M., Chan K. W. and Lam K. S.: Genetic and clinical characteristics of maturity-onset diabetes of the young in Chinese patients. *Eur J Hum Genet*, 2005. 13(4): 422-7.

Yamagata K., Furuta H., Oda N., Kaisaki P. J., Menzel S., Cox N. J., Fajans S. S., Signorini S., Stoffel M. and Bell G. I.: Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature*, 1996a. 384(6608): 458-60.

Yamagata K., Oda N., Kaisaki P. J., Menzel S., Furuta H., Vaxillaire M., Southam L., Cox R. D., Lathrop G. M., Boriraj V. V., Chen X., Cox N. J., Oda Y., Yano H., Le Beau M. M., Yamada S., Nishigori H., Takeda J., Fajans S. S., Hattersley A. T., Iwasaki N., Hansen T., Pedersen O., Polonsky K. S., Bell G. I. and et al.: Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature*, 1996b. 384(6608): 455-8.

Yamagata K., Nammo T., Moriwaki M., Ihara A., Iizuka K., Yang Q., Satoh T., Li M., Uenaka R., Okita K., Iwahashi H., Zhu Q., Cao Y., Imagawa A., Tochino Y., Hanafusa T., Miyagawa J. and Matsuzawa Y.: Overexpression of dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor-1 alpha in pancreatic beta-cells causes abnormal islet architecture with decreased expression of E-cadherin, reduced beta-cell proliferation, and diabetes. *Diabetes*, 2002. 51(1): 114-23.

Yamagata K.: Regulation of pancreatic beta-cell function by the HNF transcription network: lessons from maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Endocr J*, 2003. 50(5): 491-9.

Yang Q., Yamagata K., Fukui K., Cao Y., Nammo T., Iwahashi H., Wang H., Matsumura I., Hanafusa T., Bucala R., Wollheim C. B., Miyagawa J. and Matsuzawa Y.: Hepatocyte nuclear factor-1alpha modulates pancreatic beta-cell growth by regulating the expression of insulin-like growth factor-1 in INS-1 cells. *Diabetes*, 2002. 51(6): 1785-92.

Yoshioka M., Kayo T., Ikeda T. and Koizumi A.: A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diabetes*, 1997. 46(5): 887-94.

Zerangue N., Schwappach B., Jan Y. N. and Jan L. Y.: A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron*, 1999. 22(3): 537-48.