

**DNA-MODY 1-3 (HNF4A, GCK, HNF1A), sekvens med Big Dye Direct****DNA-MODY 1-3 (HNF4 $\alpha$ , GCK, HNF1 $\alpha$ ), sekvens med Big Dye<sup>®</sup>Direct****Bakgrund, indikation och tolkning**MODY 1 (HNF4 $\alpha$ )

MODY 2 (GCK)

MODY 3 (HNF1 $\alpha$ )

MODY är en autosomt dominant form av diabetes och karakteriseras av defekter i pancreas betaceller och en sjukdomsdebut under ungdomsåren (oftast innan 25 års ålder). Genetisk test behövs för en formell MODY-diagnos och minst sex gener associerade till MODY har identifierats. Bortsett från MODY 2 så orsakas alla de övriga MODY-formerna av mutationer i olika transkriptionsfaktorer.

**MODY 1** orsakas av mutationer i genen för Hepatocyte Nuclear Factor-4a (HNF4 $\alpha$ ), och ses i ca 10 % av MODY-fallen. Fenotypen för MODY 1 liknar den för MODY 3 (se nedan).

**MODY 2** ses hos 20-30% av alla MODY-fall. Den orsakas av mutationer i genen för det glykolytiska enzymet Glucokinase (GCK) och associeras med mild, stabil, kronisk hyperglykemi. Graviditetsdiabetes förekommer ofta hos kvinnor med mutationer i GCK-genen.

**MODY 3**, med mutationer i genen för Hepatocyte Nuclear Factor -1a (HNF1 $\alpha$ ), står för ca 70 % av alla MODY-subtyper och associeras med ett allvarligt diabetesförlopp. Behandling med sulphonylureapreparat sänker glukosnivåerna i MODY 3.

**Analysprincip**

Sekvenseringsmetoden syftar till att sekvensbestämma samtliga exon och exon/intron grän-ser. Till detta används kitet Big Dye<sup>®</sup> Direct Cycle Sequencing Kit. Först utförs den primära PCR-reaktionen, då delar av den specifika genen amplifieras ifrån isolerat genomiskt DNA med genspecifika, tailade (M13) primers. Därefter renas den primära PCR-produkten och sekvens-PCR med universella primers utförs. Efter rening av sekvenseringsprodukterna analyseras proverna med kapillärgelelektrofores. Sekvensdata produceras genom att "basecall-ling" utförs på rådata. Data jämförs sedan sinsemellan och mot en känd referenssekvens genom analys med SeqScape.

**Referensintervall**

Ej tillämbart.

Metodbeskrivning

**DNA-MODY 1-3 (HNF4A, GCK, HNF1A), sekvens med Big Dye Direct**Gäller för  
Klinisk kemi

LU

**Metodkaraktistika****Interferenser och felkällor**

Om DNA-provet innehåller kontamination som t.ex. inhibitorer så ser vi det som frånvaro av signal och ett omprov får göras. Principiellt kan andra homologa DNA-sekvenser hybridisera med primers och ge felaktig information. Detta har eliminerats i den initiala optimeringen av metoden och sedermera validerats. Alignment av provsekvens med referenssekvens visar detta i så fall. Eftersom sekvensdatabasen innehåller många sekvenser och vi normalt genererar mycket DNA-sekvens från varje individ erhålls en mycket god bild av polymorfimönstret för varje individ. Detta kan användas för att konfirmera korrektheten hos DNA sekvensen.

**Mätområde**

HNF4α NCBI RefSeqGene NG\_009818.1

GCK NCBI RefSeqGene NG\_008847.1

HNF1α NCBI RefSeqGene NG\_011731.2

Se bilaga 1, Samtliga primers MODY.

Se även under rubriken "Tekniskt/medicinskt godkännande" där rapporteringsgränserna anges.

**Detektionsgräns**

4 ng patient-DNA används per reaktion. Nedre detektionsgräns har ej fastställts.

**Mätosäkerhet**

Ej tillämbart.

**Spårbarhet**

HNF4α NCBI RefSeqGene NG\_009818.1, ID 2465

GCK NCBI RefSeqGene NG\_008847.1, ID 6927

HNF1α NCBI RefSeqGene NG\_011731.2, ID 3172

Gen	RefSeq
HNF4A	NG_009818.1
	NM_175914.4
	NP_787110.2
GCK	NG_008847.1
	NM_000162.3
	NP_000153.1

Metodbeskrivning

**DNA-MODY 1-3 (HNF4A, GCK, HNF1A), sekvens med Big Dye Direct**Gäller för  
Klinisk kemi

LU

HNF1A	NG_011731.2
	NM_000545.5
	NP_000536.5

Samtliga primers blastades med NCBI PRIMER BLAST, se MODY samlingsvalidering.

**Imprecision**

Ackrediterings-CV är ej tillämpbar på kvalitativ analys.

**Riktighet**

Metodens riktighet är ställd mot referenssekvens HNF4 $\alpha$  NCBI RefSeqGene NG\_009818.1, GCK NCBI RefSeqGene NG\_008847.1 och HNF1 $\alpha$  NCBI RefSeqGene NG\_011731.2 samt att metodens riktighet bedöms efter jämförelse med publicerade sekvenser på tidigare utförd sekvensering.

Tolv patienter och tolv kontroller har analyserats för genetisk variation i de tre studerade ge-nerna. Samtliga polymorfier med höga "Minor allele frequencies" som kunde förväntas detekteras i materialet har också detekterats. De tolv kända genvarianter som tidigare detekterats i en oberoende sekvensering har återfunnits i den nuvarande undersökningen. Konklusion: Metoden fungerar väl. Se MODY samlingsvalidering.

**Ackreditering**

Metoden är ackrediterad.

**Referenser**

1. Hattersley A. Maturity-onset diabetes of the young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity. Diabet Med, 1998, 15, 15-24.
2. HGMD®;The Human Gene Mutation Database  
<https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=HNF4A>  
<https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=hnf4atv8>  
<https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=GCK>  
<https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=HNF1A>
3. [S. Ellard](#),<sup>1,2</sup> [C. Bellanné-Chantelot](#),<sup>3</sup> [A. T. Hattersley](#),<sup>1</sup> and European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) MODY group Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. Diabetologia. 2008 April; 51(4): 546–553.

**DNA-MODY 1-3 (HNF4A, GCK, HNF1A), sekvens med Big Dye Direct**

- 
- Osbak KK, Colclough K, Saint-Martin C, Beer NL, Bellanné-Chantelot C, Ellard S, Gloyn AL. Hum Mutat. 2009 Nov;30(11):1512-26. doi: 10.1002/humu.21110. Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia.
  - LOVD; leiden open access database  
*HNF4A* [http://grenada.lumc.nl/LOVD2/diabetes/variants.php?action=search\\_all](http://grenada.lumc.nl/LOVD2/diabetes/variants.php?action=search_all)  
*GCK* [http://grenada.lumc.nl/LOVD2/diabetes/variants.php?select\\_db=GCK&action=search\\_all](http://grenada.lumc.nl/LOVD2/diabetes/variants.php?select_db=GCK&action=search_all)  
*HNF1A*  
[http://grenada.lumc.nl/LOVD2/diabetes/variants.php?select\\_db=HNF1A&action=search\\_all](http://grenada.lumc.nl/LOVD2/diabetes/variants.php?select_db=HNF1A&action=search_all)
  - Isoformer NCBI; The National Center for Biotechnology Information  
*HNF4A* [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_175914.4](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_175914.4)