



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA  
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA

DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOTECNOLOGIE MEDICHE E MEDICINA MOLECOLARE

XXII CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO

**MUTAZIONI DEL GENE INS COME CAUSA DI DIABETE NEONATALE  
PERMANENTE/DELL'INFANZIA**

Dr. Carlo Colombo

A.A. 2009/2010

Docente Guida/Tutor: Prof. Fabrizio Barbetti

Coordinatore: Prof. Giorgio Federici

# INDICE

## **1) Introduzione**

- 1.1 Il diabete neonatale: caratteristiche cliniche
- 1.2 I geni coinvolti nel diabete neonatale
- 1.3 L'insulina: struttura genica e mutazioni "storiche"
- 1.4 Modelli murini di mutazioni nel gene dell'insulina
- 1.5 L'insulina: struttura proteica e secrezione
- 1.6 Lo stress del reticolo endoplasmatico e il diabete di tipo 2

## **2) Materiali e metodi**

- 2.1 Estrazione del DNA
- 2.2 PCR di KCNJ11
- 2.3 PCR dell'insulina e digestioni enzimatiche
- 2.4 Sequenziamento nucleotidico
- 2.5 Clonaggio del gene dell'insulina e mutagenesi sito-specifica
- 2.6 Trasfezione in INS1-E e esperimenti di immunofluorescenza
- 2.7 Linea cellulare HEK293
- 2.8 Saggi di ER stress: XBP1 e grp78
- 2.9 Pulse-chase
- 2.10 Saggi di apoptosi
- 2.11 Modelli tridimensionali al computer

## **3) Scopo della tesi**

## **4) Risultati**

### 4.1 Studio della casistica PNDM:

- analisi molecolare
- caratteristiche cliniche
- differenze cliniche tra pazienti PNDM mutati in INS e pazienti PNDM mutati in altri geni

#### 4.2 Studi funzionali delle mutazioni insulina:

- esperimenti in vitro sul linee cellulari
- misurazione dell'ER-stress
- misurazione dell'apoptosi cellulare

#### 4.3 screening per mutazioni in tipe 1 like pazienti diabetici:

- caratteristiche cliniche

### **5) Discussione**

### **6) Riassunto**

### **7) Bibliografia**

## INTRODUZIONE

### **Il Diabete Neonatale: caratteristiche cliniche**

Il Diabete Mellito (più comunemente conosciuto col solo nome di "diabete") è una patologia piuttosto comune contraddistinta da un errato controllo del livello di glucosio circolante.

Si distingue principalmente in due classi: il diabete di tipo 1 (dove le  $\beta$ -cellule sono completamente eliminate da una reazione autoimmune) e il diabete di tipo 2 (dove si assiste a un malfunzionamento delle  $\beta$ -cellule che porta a un'insufficiente risposta secretoria allo stimolo glicemico)

In aggiunta a questi esiste inoltre un forma di diabete che colpisce ~ 1:150.000 nati in Italia, conosciuta come Diabete Neonatale (1,2), causata da un difetto nella massa  $\beta$ -cellulare pancreatica e/o nella sua funzionalità e di carattere tipicamente monogenico. Si divide principalmente in due varianti cliniche:

1) Diabete Neonatale Transitorio (TNDM) definito come iperglicemia insorgente nei primi tre mesi di vita ma che normalmente recede entro 6 mesi dalla nascita per ricomparire in alcuni casi come diabete di tipo 2 nell'adolescenza.

2) Diabete Neonatale Permanente (PNDM) definito come iperglicemia insorgente nei primi 6 mesi di vita e richiedente trattamento insulinico per tutta la durata della vita. Si distingue clinicamente dal diabete di tipo 1 classico per l'età di insorgenza (che nel diabete autoimmune non è mai antecedente il sesto mese) e per la totale assenza dei cinque autoanticorpi specifici (ICA, GADA, IA-2A, IAA, ZnT8A)

Solitamente il fenotipo diabetico si manifesta isolatamente, ma in circa il 25% dei casi può essere associato a ritardo nello sviluppo e problemi muscolari. In alcuni rari casi, si assiste anche ad episodi di epilessia. Quest'ultima condizione è conosciuta come sindrome DEND (developmental delay, epilepsy and neonatal diabetes) (3,4,5).

## **I geni coinvolti nel diabete neonatale**

Nel corso degli ultimi anni sono stati compiuti notevoli passi in avanti nell'identificare le cause genetiche del diabete neonatale.

In particolare, per quanto riguarda il TNDM, è stato dimostrato come sia spesso associato ad anomalie nel cromosoma 6, inclusa una isodisomia uniparentale con duplicazione paterna della porzione 6q24 (6). Una seconda causa per il TNDM è invece da ricercarsi in mutazioni attivanti del gene *ABCC8* codificante per la subunità SUR1 e in mutazioni nel gene *KCNJ11* codificante per la subunità Kir6.2, entrambe appartenenti al canale del potassio delle  $\beta$ -cellule pancreatiche (7,8) (vd. avanti). In più, la subunità SUR1 costituisce il recettore per le sulfaniluree, una classe di antiglicemizzanti orali utilizzati da molti anni nel trattamento del diabete.

Per quanto riguarda invece il PNDM, circa il 50% dei casi nella casistica italiana è da attribuirsi a mutazioni attivanti del gene *KCNJ11* codificante per la subunità Kir6.2 del canale del  $K^+$  delle  $\beta$ -cellule pancreatiche (10,11,12). Tale canale è un ottamero proteico costituito da un tetramero esterno di SUR1 e un tetramero più interno di Kir6.2, delimitante il poro del canale stesso.

Conseguentemente all'aumento dell'uptake di glucosio da parte della cellula e al suo ingresso nel ciclo di Krebs, si ottiene un innalzamento del rapporto ATP/ADP intracellulare che causa la chiusura del canale del  $K^+$ . Tale chiusura causa a sua volta un'onda di depolarizzazione che provoca l'apertura di un canale del  $Ca^{2+}$  a valle. L'ingresso di ioni  $Ca^{2+}$  costituisce il segnale per la fusione delle vescicole di insulina alla membrana cellulare con conseguente fuoriuscita dell'insulina stessa (vd fig.1).

Mutazioni attivanti di Kir6.2 mantengono il canale in condizione di chiusura ed impediscono pertanto il rilascio dell'insulina. E' importante rilevare come l'azione delle sulfaniluree sulla subunità SUR1 permetta la riapertura del canale del  $K^+$  ed il ripristino della corretta fisiologia  $\beta$ -cellulare. Tutto ciò ha importanti ricadute terapeutiche, in quanto pazienti PNDM recanti mutazioni nel gene *KCNJ11* possono solitamente essere svezzati dalla terapia insulinica comune per essere trattati con antidiabetici orali come la glibenclamide, ottenendo inoltre un miglior controllo della glicemia (testimoniato dall'abbassamento dei livelli di emoglobina glicata) e un

miglioramento nel comportamento neuromuscolare (13,14,15,16).

E' da sottolineare come esistano anche mutazioni inattivanti di Kir6.2 che, mantenendo costitutiva la secrezione insulinica, comportano al contrario un fenotipo ipoglicemico (17,18).

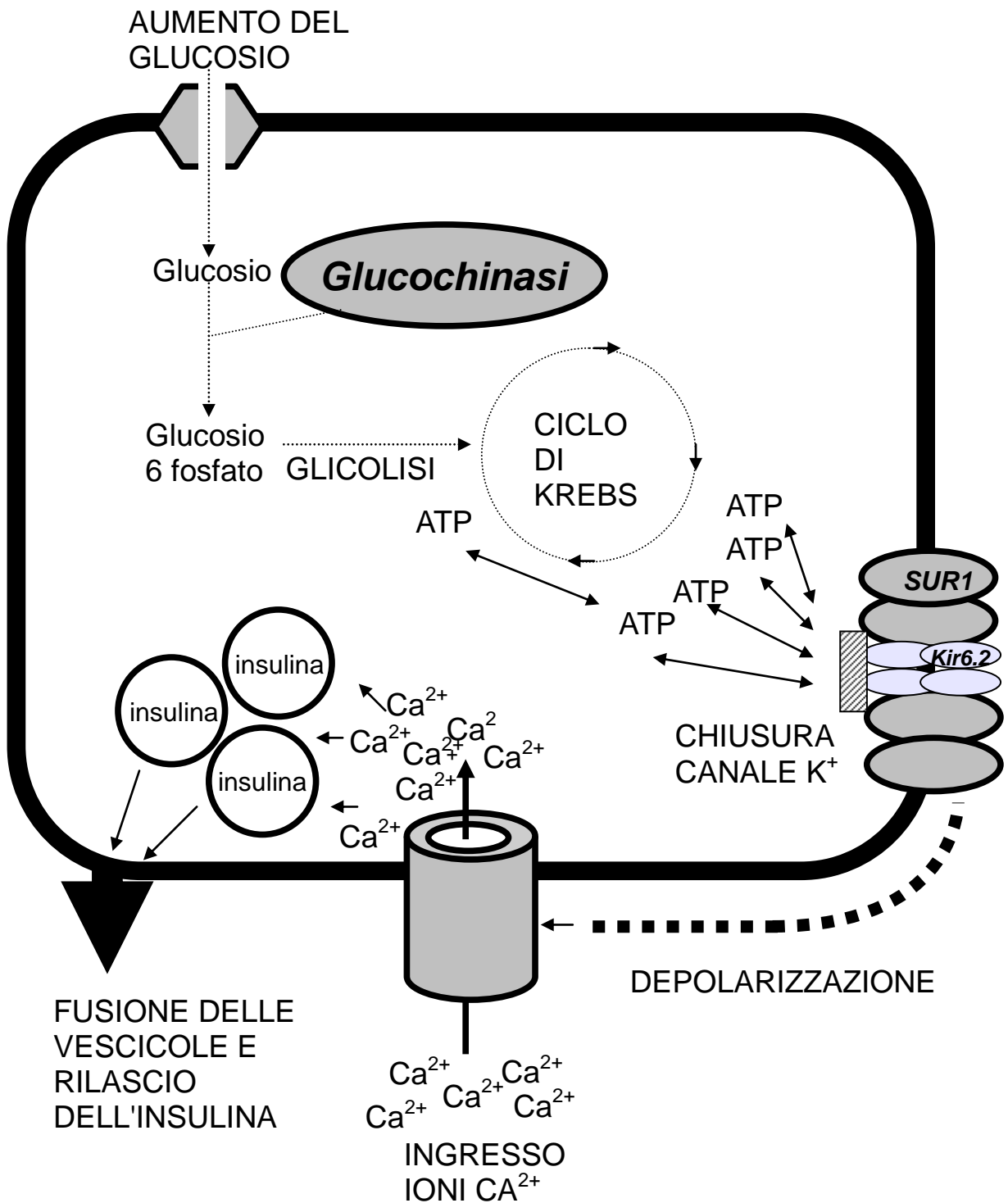


Fig.1: secrezione dei granuli di insulina in seguito all'aumento di glucosio circolante. Ruolo del canale del K<sup>+</sup>.

Recentemente è stato completato nel nostro laboratorio uno screening per mutazioni sull'altra subunità del canale del K<sup>+</sup> (tetramero SUR1) che ha messo in evidenza come mutazioni nel gene ABCC8 siano a loro volta responsabili di circa il 9% dei casi PNDM da noi selezionati (unpublished data).

Al momento attuale siamo quindi in grado di identificare la causa genetica in circa l'80% dei casi di PNDM con esordio entro il 6° mese dalla nascita.

Esistono infine altri casi estremamente rari di PNDM, spesso con caratteristiche sindromiche, le cui cause genetiche sono invece da attribuirsi a:

- mutazioni omozigoti o eterozigoti composte nel gene della Glucochinasi (GCK) (19)
- mutazioni omozigoti o eterozigoti composte nel gene dell'insulin promoter factor 1 (IPF-1), associate ad agenesia pancreatica (20)
- mutazioni in EIF2AK3, associate alla sindrome di Wolcott-Rallison che combina il diabete insulino-dipendente con difetti ossei e ritardo nella crescita (21,22)
- mutazioni nel gene FOXP3, associate alle sindrome IPEX (immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) che comporta severi fenomeni di autoimmunità che portano spesso al decesso entro i primi due anni di vita (23)
- mutazioni in PTF1A, associate ad agenesia pancreatica e cerebellare con conseguente morte entro i primi sei mesi di vita (24)
- mutazioni in GLIS3, associate a ipotiroidismo congenito, glaucoma congenito, fibrosi epatica e rene policistico (25)

### **L'insulina: struttura genica e mutazioni "storiche"**

Il gene dell'insulina (INS/NM\_000207.2/NP\_000198.1) è composto da 3 esoni di rispettivamente 80, 204 e 219 paia di basi situati nella regione p15.5 del cromosoma 11.

Il promotore in *cis* del gene INS inizia a ~ -300 basi al 5' (26) . L'ATG iniziale si trova nell'esone 2 mentre il codone di stop TAG è situato nell'esone 3.

E' stato dimostrato come la trascrizione del gene dell'insulina sia influenzata dal

numero di VNTR presenti nel locus IDDM2 del cromosoma 11 a monte del gene INS (27, 28); in particolare un elevato numero di VNTR è associato a un minor livello trascrizionale e viceversa. Sembra invece avere minore importanza nella regolazione trascrizionale lo splicing alternativo dovuto al polimorfismo IVS1-6A/T (- 23*Hph*I+/- ) (29,30).

Nel corso degli anni il gene INS è stato sottoposto a screening per la ricerca di mutazioni in diverse casistiche di pazienti diabetici. Nonostante questo sforzo considerevole, le mutazioni scoperte sono risultate poche e non associate a fenotipi diabetici rilevanti, come illustrato nella tabella sottostante (31-39).

cDNA location	Protein location	Phenotype	Nucleotide & systematic name	Mutated insulin nomenclature		
				Original	Standard	HGVS
Exon 2	$\beta$ -chain	hyperproinsulinemia	c.100C>G	H <sup>B10</sup> D (Providence)	H34D	p.Hys34Asp
Exon 2	$\beta$ -chain	Diabetes/ hyperinsulinemia	c.143T>C	F <sup>B24</sup> S (Los Angeles)	F48S	p.Phe48Ser
Exon 2	$\beta$ -chain	Diabetes/ hyperinsulinemia	c.147C>G	F <sup>B25</sup> L (Chicago)	F49L	p.Phe49Leu
Exon 3	KR junction	Hyperproinsulinemia	c.266G>A	R65H (proinsulin Tokio)	R89H	p.Arg89Hys
Exon 3	KR junction	Hyperproinsulinemia	c.266G>T	R65L (proinsulin Kyoto)	R89L	p.Arg89Leu
Exon 3	KR junction	Hyperproinsulinemia	c.266G>C	R65P	R89P	p.Arg89Pro
Exon 3	$\alpha$ -chain	Hyperinsulinemia	c.274G>T	V <sup>A3</sup> L	V92L	p.Val92Leu

Al momento di iniziare questo progetto di dottorato non è ancora stato tentato uno screening su una casistica di pazienti affetti da Diabete Neonatale Permanente.

### **Modelli murini di mutazioni nel gene dell'insulina**

E' da notare come mutazioni spontanee nel gene dell'insulina 2 (Ins2) di topo siano state trovate invece in due modelli di diabete murino, il topo Akita e il topo Munich



(40, 41), recanti rispettivamente la mutazione C96Y e C95S. Analogamente a quanto sarebbe atteso nell'umano, tali mutazioni comportano la rottura di un ponte intercatena  $\alpha$ - $\beta$  nel caso Akita, e del ponte intracatena  $\alpha$  nel caso Munich. I due modelli murini presentano un fenotipo diabetico simile, associabile al Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) umano, con un innalzamento della glicemia tra la terza e la quarta settimana di vita (corrispondenti al momento dello svezzamento dei cuccioli dalla madre), ipoinsulinemia, polidipsia e poliuria, ridotte dimensioni delle isole pancreatiche e ridotta massa  $\beta$ -cellulare. Unitamente a questi caratteri si è osservata una riduzione nella capacità di sopravvivenza, specialmente negli esemplari maschi.

E' stato inoltre dimostrato come questo fenotipo sia attribuibile ad un'aumentata apoptosi  $\beta$ -cellulare causata dall'accumulo dell'insulina mutata nell'ER che avrebbe quindi un effetto proteotossico (42, 43, 44).

### **L'insulina: struttura proteica e secrezione**

L'insulina è il principale ormone deputato alla regolazione del livello del glucosio circolante ed è prodotta e secreta dalla  $\beta$ -cellule pancreatiche. In presenza di un innalzamento della glicemia le  $\beta$ -cellule secernono mediante esocitosi l'insulina precedentemente immagazzinata nei granuli secretori e allo stesso tempo danno il via alla sintesi di nuova insulina (45).

L'ormone maturo è un prodotto posttraduzionale di una singola catena polipeptidica conosciuta come preproinsulina e composta da 110 aminoacidi. I primi 24 aminoacidi all'estremità N-terminale costituiscono il peptide segnale e vengono rimossi mediante taglio proteolitico successivamente all'import nel reticolo endoplasmatico (ER).

Il frammento così ottenuto (proinsulina) è formato a sua volta da un frammento N-terminale di 30 aminoacidi che andrà a costituire la catena  $\beta$  dell'insulina matura, un frammento C-terminale di 21 aminoacidi che andrà a costituire la catena  $\alpha$  dell'insulina matura e un frammento intermedio di 31 aminoacidi denominato C-peptide.

Il C-peptide è connesso alla catena  $\beta$  dalla coppia di aminoacidi R55 e R56 e alla

catena  $\alpha$  dalla coppia di aminoacidi K88 e R89. Tali doppiette aminoacidiche costituiscono il sito di taglio di un specifico set di proteasi per la rimozione del C-peptide (e delle doppiette stesse) durante le fasi di maturazione dell'insulina (45).

Una volta entrata nel lume dell'ER, la proinsulina va incontro al processo di folding durante il quale vengono formati i tre ponti disolfuro che si ritroveranno nella forma matura: un ponte intracatena  $\alpha$  (A6-A11) e due ponti intercatena  $\alpha$  e  $\beta$  (A7-B7 e B19-A20) (46). La proteina correttamente foldata prosegue verso l'apparato di Golgi dove viene rimosso il C-peptide e viene impacchettata nei granuli secretori sotto forma di cristalli esamerici coordinati attorno a un atomo di  $Zn^{2+}$ .

La secrezione dell'insulina è riassunta schematicamente in Fig.2:

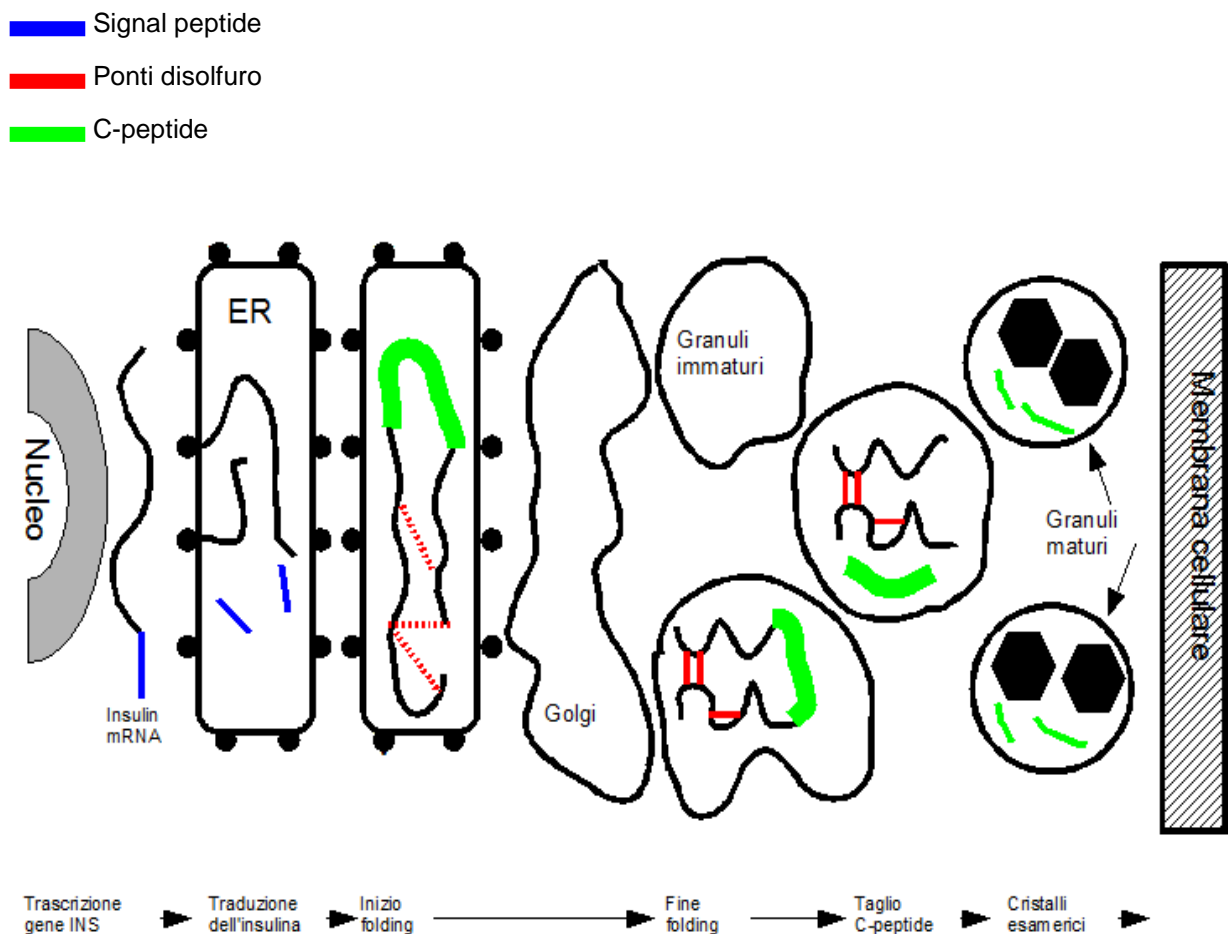


Fig.2: sintesi e secrezione dell'insulina

## Lo stress del reticolo endoplasmatico e il diabete di tipo 2

Il reticolo endoplasmatico (ER) è il principale comparto cellulare dove avvengono la sintesi e il folding delle proteine. In questo processo giocano un ruolo importante le chaperonine e le molteplici disulfide-isomerase (ad es. PDI) che catalizzano la formazione dei ponti disolfuro (46). Le proteine correttamente sintetizzate e ripiegate sono in grado di raggiungere la loro destinazione finale, mentre le proteine misfolded fuoriescono dall'ER e vanno incontro a degradazione ad opera dei proteosomi citoplasmatici.

La capacità dell'ER di processare proteine è relativamente limitata e un eccessivo accumulo di proteine unfolded o misfolded comporta una condizione di ER-stress che, se sostenuta nel tempo, può portare a gravi patologie come ad esempio l'Alzheimer, il Parkinson o le malattie da accumulo di prioni (47,48).

L'ER risponde a una condizione di stress attivando pathway specifici che vanno sotto il nome di UPR (unfolded protein response), EOR (ER-overload response) e ERAD (ER-associated degradation) che hanno tutti lo scopo di rallentare la sintesi di nuove proteine, accelerare il processo di traslocazione e degradazione delle proteine misfolded e aumentare la capacità di folding dell'ER (49).

In particolare, nei mammiferi l'UPR è sotto il controllo di tre principali fattori; IRE1 $\alpha/\beta$ , PERK e ATF6 (vd fig.3). Questi sono solitamente presenti nella membrana dell'ER e mantenuti in uno stato inattivo dall'associazione con la chaperonina BiP (anche chiamata GRP78 o HSPA5). L'aumentata richiesta di BiP causata da una maggiore quantità di proteine da foldare causa il distacco di BiP da IRE1 $\alpha/\beta$ , PERK e ATF6e la loro conseguente attivazione che avviene in questo modo:

- IRE1 omodimerizza e autofosforila. Nella sua forma attivata è in grado di rimuovere una porzione di 21bp dall'mRNA di XBP1 (X-box protein 1) che in questo modo codifica per una forma attiva di XBP1 stesso che può così stimolare la trascrizione di altre chaperonine.
- anche PERK è in grado di omodimerizzare ed autofosforilarsi. Nella sua forma attiva fosforila eIF-2 $\alpha$  (eukariotic translation initiation factor, presente nel complesso ribosomale) e di ridurre la sintesi generale delle proteine.

- ATF6 trasloca nel Golgi dove viene tagliato ad opera delle proteasi S1P e S2P. La sua porzione N-terminale è così in grado di spostarsi nel nucleo dove attiva la trascrizione di XBP1.

Una prolungata condizione di ER-stress porta la cellula incontro ad un processo apoptotico (49, 50). Nonostante non siano ancora stati chiariti i legami molecolari esistenti tra i pathway UPR, EOR e ERAD e i segnali apoptotici, numerosi fattori responsabili dell'apoptosi cellulare indotta da ER-stress sono stati identificati. Tra questi si ricordano i membri della famiglia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bax, Bak e Bik), CHOP/Gadd153, VCP, ALG-2 e tutti i membri della famiglia delle caspasi.

Inoltre va ricordato come i fattori sopraelencati IRE1, PERK e ATF6 siano tutti coinvolti nella regolazione dell'espressione di CHOP.

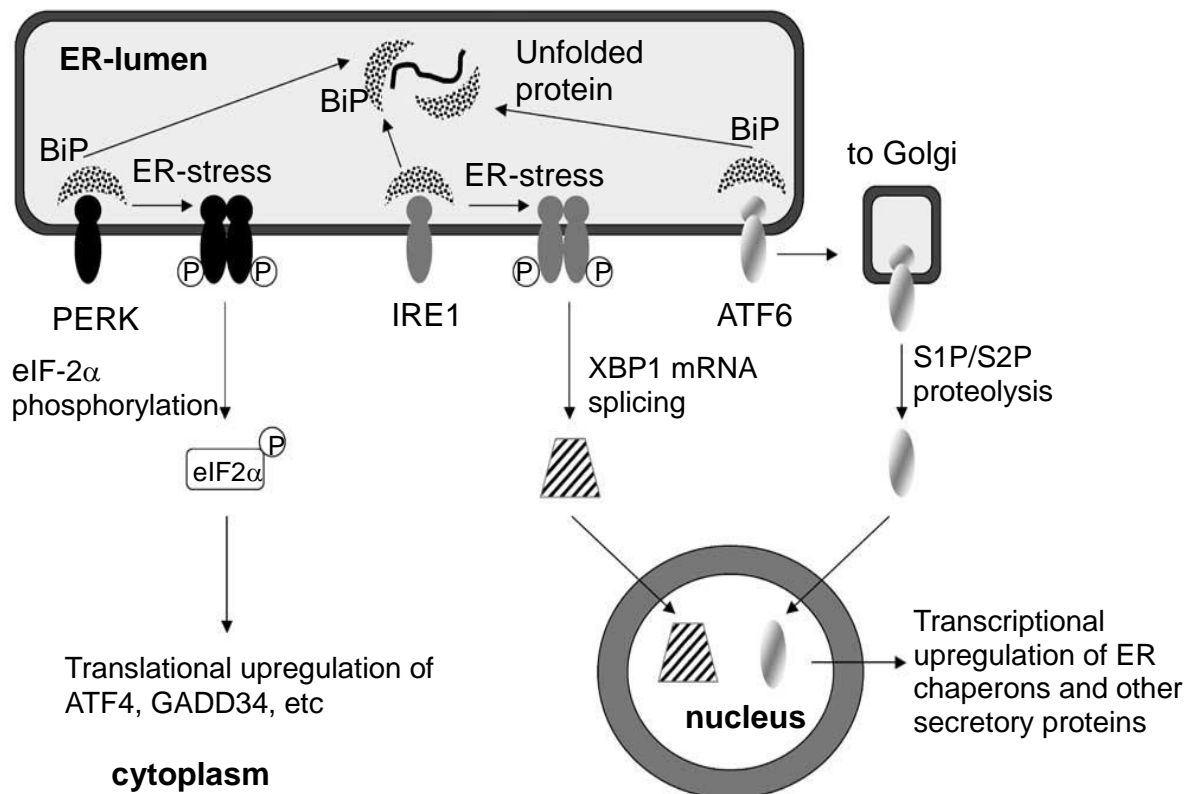


Fig.3: attivazione di IRE1, PERK e ATF6 in seguito a condizioni di ER-stress

Nel corso degli ultimi anni sono state inoltre accumulate molteplici evidenze su come l'ER stress possa essere implicato anche nel diabete di tipo 2, in particolar modo negli individui affetti da obesità (51, 52). E' stato infatti messo in luce come l'insufficiente secrezione insulinica in questi pazienti sia da attribuirsi a una riduzione della massa  $\beta$ -cellulare, a sua volta imputabile ad eventi apoptotici. Anche nel caso delle  $\beta$ -cellule di individui obesi è stata infatti verificata l'attivazione dei fattori IRE1, PERK e ATF6, indicatori di una condizione di ER-stress che prelude all'apoptosi cellulare. Al momento sono invece meno chiari i fattori direttamente responsabili dell'apoptosi stessa. Alcuni studi sembrano suggerire un ruolo predominante per le caspasi 3 e 9 ma l'argomento è ancora oggetto di discussione.

## **MATERIALI E METODI:**

### **Estrazione del DNA**

3-10 ml di sangue sono estratti, dopo consenso informato, da pazienti affetti da PNDM e dai loro genitori e parenti. Tutti gli studi descritti sono stati approvati dal comitato etico della SIEDP (Società Italiana di Endocrinologia e Diabetologia Pediatrica).

Il DNA viene estratto mediante il Kit Nucleon BACC3 (GE Healthcare #RPN8512) seguendo il protocollo della ditta fornitrice.

### **PCR di KCNJ11**

Una casistica iniziale di 37 pazienti affetti da PNDM è stata inizialmente sottoposta ad analisi molecolare per mutazioni nel gene KCNJ11 (11) e nel gene GCK. 19 pazienti sono risultati positivi a mutazioni in KCNJ11 mentre 1 è risultato essere mutante omozigote in GCK. I rimanenti 17 casi sono stati sottoposti a screening per mutazioni nel gene INS. A questi sono stati successivamente aggiunti 2 pazienti danesi affetti da diabete infantile e gentilmente offerti dal prof. Torben Hansen (Steno Diabetes Center, Gentofte, Denmark)

### **PCR dell'insulina e digestioni enzimatiche**

150-200 ng di DNA sono utilizzati per l'amplificazione degli esoni 2 e 3 del gene INS (l'esone 1 è inizialmente escluso in quanto non codificante).

I primers utilizzati per la PCR sono i seguenti:

- esone 2: 5' CACCTGGCCTTCAGCCTGC 3' (forward)  
5' TTCTGCCCATGCTGGGTGG 3' (reverse)
- esone 3: 5' CTCCCTGACTGTGTCCTCC 3' (forward)  
5' GACACACAGACGGCACAGC 3' (reverse)

In posizione 5' dei primers forward reverse sono state aggiunte rispettivamente le sequenze universali M13-for (5' TGTAACACGACGGCCAGT 3') e M13-rev (5' CAGGAAACAGCTATGACC 3') per facilitare il successivo sequenziamento dei prodotti di PCR.

Le condizioni di PCR per entrambi i frammenti sono 35 cicli di PCR a 94°C x 30", 60°C x 1', 72°C per 1'

Le digestioni di controllo con *SpeI*, *HphI* e *HpaII* sono effettuate a 37°C per 2h e corse su gel d'agarosio al 2%.

### **Sequenziamento nucleotidico**

La purificazione dei frammenti di PCR e dei prodotti di sequenziamento è effettuata con il kit Agencourt AMPure (Beckman Coulter #A29152) seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

10ng di frammento purificato sono sottoposti a PCR di sequenziamento con il Kit BigDye utilizzando gli oligo M13for e M13rev come innesco di reazione (Applied Biosystems). Le condizioni della PCR di sequenziamento sono le seguenti: 25 cicli da 96°C x 10", 50°C X 5", 60°C x 4'.

Il prodotto di sequenziamento è successivamente purificato mediante resina Agencourt CleanSEQ (Beckman Coulter #A29151) seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

L'elettroforesi di sequenziamento è effettuata in un sistema AB3730 (Applied Biosystems).

### **Clonaggio del gene insulina e mutagenesi sito specifica**

Il cDNA dell'insulina (gentilmente fornito da H. Lou, NIH, Bethesda, Maryland, USA) è stato amplificato coi seguenti primers contenenti i siti di restrizione per HindIII e EcoRI:

5' CCTAGTTGAGAAGCTTGTCTTCTGCCATGGCCCTG 3' e

5' CCTAGTTGAGGAATTCTCCATCTCTCTCGGTGCAGG 3'.

Il prodotto di amplificazione è stato digerito con EcoRI e HindIII, corso in gel d'agarosio all'1%, purificato utilizzando il Kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) e clonato nel vettore d'espressione pCDNA3.1 (+) (Invitrogen).

Tutti i mutanti insulina e i controlli sono stati ottenuti mediante mutagenesi sito specifica sul vettore pCDNA3.1-insulina utilizzando il kit QuickChangeII (Stratagene). Tutti i costrutti sono stati sequenziati in forward e reverse, utilizzando i primer T7 e BGH-rev come innesco, per verificarne la correttezza.

L'isolamento dell'allele mutato L<sup>B15</sup>Y<sup>B16</sup>delinsH è stato ottenuto clonando il prodotto di amplificazione dell'esone 2 nel vettore pCRII-TOPO del sistema di clonaggio TOPO TA cloning (Invitrogen, #K4500-01). Per il suo sequenziamento, il frammento è stato prima riamplicato con i primer exon2 forward e exon2 reverse e poi sequenziato con M13for e M13rev.

### **Trasfezione in INS1-E e esperimenti di immunofluorescenza**

Le cellule INS-1E (gentilmente fornite da C.Wollheim, University Medical Centre, Geneva, Switzerland) sono una linea di insulinoma di ratto e sono, assieme alle linee murine Min6 e AtT20 (ATCC #CCL-89), la linea d'elezione per lo studio della fisiologia  $\beta$ -cellulare, in particolare per quanto riguarda il folding e la secrezione dell'insulina.

Le INS-1E sono fatte crescere in RPMI (Invitrogen) supplementato con 2mM L-glutamina, 10mM HEPES, 50 $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoetanololo, 10% FBS, 100 IU/ml penicillin, e 100 $\mu$ g/ml streptomycin in un incubatore a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>.

Le cellule sono trasfettate all'80% di confluenza mediante Lipofectamina 2000 (Invitrogen) secondo protocollo fornito dal produttore con tutti i mutanti a disposizione (ad eccezione di L<sup>B6V</sup>). A 48h e a 96h le cellule sono state fissate in 4% di paraformaldeide per 10', lavate in PBS1x, permeabilizzate in PBS/0,2% Triton X-100 per 15', bloccate in PBS/10%FBS per 30', incubate con anticorpo monoclonale primario (antiproinsulina umana, Abcam# ab8301) diluito 1:300 per 1h a 37°C, lavato



3 volte con PBS/0,5% Tween, incubato con anticorpo secondario goat anti-mouse coniugato con AlexaFluor 594 F(ab')<sub>2</sub> (Invitrogen, #A11020) diluito 1:500 per 1h' a 37°C, lavato 3 volte con PBS/0,5% Tween e montato su vetrino con glicerolo 50%. E' da notare come l'anticorpo primario utilizzato non presenta alcuna crossreattività nè con la proinsulina 1 nè con la proinsulina 2 di ratto.

Le cellule esprimenti insulina sono visualizzate con un microscopio a fluorescenza Nikon TE2000-E Eclipse e vengono contate singolarmente lungo due diametri della piastra per effettuare una stima del loro numero totale mediante campionamento.

Le immagini sono acquisite con il software Metamorph (Molecular Devices).

### **Linea cellulare HEK293**

La linea cellulare HEK293 (ATCC #CRL-1573) è una linea tumorale di cellule embrionali renali umane molto utilizzate in esperimenti che richiedono folding e secrezione di proteine. Nel caso dell'insulina umana va inoltre ricordato come le HEK293 non siano in grado di rimuovere il C-peptide come normalmente avviene nelle linee  $\beta$ -cellulari. Il terreno di coltura solitamente usato per il loro mantenimento è il Dulbecco's Medium (DMEM) al 10% FBS.

### **Saggi di ER stress: XBP1 e grp78**

Nella misurazione dello splicing alternativo di XBP1 la linea HEK293 è trasfettata con tutti i costrutti a disposizione (eccetto L<sup>B6V</sup>) mediante Lipofectamina 2000 secondo protocollo fornito dal produttore.

Dopo 24h le cellule vengono raccolte per tripsinizzazione e piastrate 1 : 2 in una nuova piastra. Dopo altre 24h (cioè a 48h dalla trasfezione) le cellule sono raccolte mediante tripsinizzazione e l'RNA totale è estratto con Trizol (Invitrogen #15596-026).

1 $\mu$ g di RNA totale è retrotrascritto con il Kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, #12371-019) e 50ng di cDNA sono utilizzati per

l'amplificazione del frammento di interesse.

I primer usati sono:

- XBP1 for: 5' CCTTGTAGTTGAGAACCAGG 3'

- XBP1 rev: 5' GGGGCTTGGTATATATGTGG 3'

Le condizioni di amplificazione utilizzate sono: 35 cicli a 94°C x 30", 56°C x 1', 72°C x 1'.

I frammenti ottenuti (rispettivamente di 442bp e di 416bp) sono separati mediante elettroforesi sul gel d'agarosio al 2% e l'analisi densitometrica è effettuata tramite il software GelDoc2000 (Bio-Rad).

Per la misurazione dei livelli di Grp78, le cellule HEK293 sono trasfettate mediante il seguente protocollo (trasfezione con Calcio Fosfato):

- si prepara una soluzione HBS 2x composta da 50mM Hepes pH 7.1, 280mM NaCl, 1,5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

- per una piastra da 60mm si preparano 2 tubi

- 1 tubo contenente 300µl HBS 2x

- 1 tubo contenente 12µg DNA, 2mM CaCl<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O a 300µl

- la soluzione HBS viene mantenuta in agitazione soffiando aria con un pipettatore mentre

quella contenente CaCl<sub>2</sub>-DNA viene aggiunta goccia a goccia.

- la miscela viene lasciata incubare per 30' a RT e poi aggiunta alle cellule.

A 9h, 16h e 24h le cellule sono raccolte con un scraper e lisate in buffer di lisi (contenente 0,5% Triton X-100, 1mM DTT, 1mM PMSF, 4mg/ml aprotinina e 2µg/ml pepstatina). Gli estratti proteici sono poi caricati in SDS-PAGE al 10% e blottati su filtro di nitrocellulosa. La colorazione dei filtri viene eseguita mediante ibridazione con anticorpi primari anti-GRP78 diluiti 1:1000 (Affinity Bioreagents #PA1-41051) seguita da ibridazione con anticorpi secondari (goat anti-rabbit) coniugati con perossidasi per chemiluminescenza. La normalizzazione dei carichi è fatta con anticorpi anti-β tubulina umana (Santa Cruz Biotechnology) diluiti 1:1000 e ibridati col medesimo anticorpo secondario.

## **Pulse-chase**

La biosintesi dell'insulina umana nelle sue versioni wt e mutate è seguita mediante pulse-chase. Cellule HEK293 trasfettate sono preincubate in DMEM privo di Met/Cys, pulse-labeled con aminoacidi marcati con  $^{35}\text{S}$  e infine "chased" in DMEM completo. Le cellule trasfettate sono lisate in 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 0,2% deossicolato, 100mM NaCl, 10mM EDTA e 25mM Tris pH 7,4 in presenza di un cocktail di inibitori della proteasi. Il lisato cellulare e il terreno sono sottoposti a immunoprecipitazione con anticorpi anti-insulina e i campioni sono analizzati con Tris-tricina-urea-SDS PAGE.

Per quantificare la secrezione di proinsulina, le cellule sono lavate 40h dopo la trasfezione e quindi incubate per 16h in serum-free DMEM contenente glucosio 25,5mM e 0,2% albumina di siero bovino (RIA-grade). I terreni di incubazione sono raccolti e sono raccolte aliquote per la misurazione dell'immunoreattività totale dei peptidi contenenti insulina (i.e. proinsulina) usando un anti-rat insulina RIA (Millipore) che reagisce sia con l'insulina WT che mutata.

## **Saggi di apoptosi**

Per la determinazione dell'apoptosi cellulare nelle HEK293 vengono utilizzati due diversi saggi: il saggio dell'Annexin V per la misurazione della early e late apoptosi e il saggio del Propidio Ioduro (P.I.) per la misurazione della frammentazione del DNA (indice di avanzato stato di apoptosi).

Nel saggio dell'Annexin V le HEK293 sono piastrate in una 24-wells (150.000 cells/well) 24h prima della trasfezione. Cellule al 50-60% di confluenza sono trasfettate transientemente mediante Lipofectamina con tutti i costrutti disponibili di insulina (eccetto L<sup>B6V</sup>). Le cellule sono raccolte 24h e 48h dopo la trasfezione mediante tripsinizzazione e messe in DMEM. Il terreno di coltura è conservato e aggiunto al corrispondente campione per sottoporre al saggio anche le cellule staccate (che, a maggior ragione, sono quelle andate incontro ad apoptosi). Il saggio

dell'Annexin V è eseguito mediante un apposito Kit (Calbiochem #PF032) seguendo il protocollo fornito. Il numero delle cellule apoptotiche e la loro ripartizione in fase "early" e "late" è ottenuto con un citometro a flusso FACSCalibur (Becton Dickinson). Nel saggio del P.I., le cellule sono trasfettate e raccolte allo stesso modo. Successivamente vengono fissate con etanolo freddo al 70%, trattate con RNAsi e colorate con 20ng/ml di P.I.

Il numero delle cellule apoptotiche è misurato mediante citofluorimetria a flusso.

La percentuale di cellule apoptotiche nelle HEK293 non trasfettate usate come controllo (4% di media su 5 esperimenti) è sottratto dalla percentuale di cellule apoptotiche osservate nella trasfezione con le insuline WT e mutate.

Analoghi procedimenti sono stati utilizzati per la misura dell'apoptosi spontanea nelle linee cellulari INS-1E e Min6.

### **Modelli tridimensionali al computer**

I modelli computerizzati delle forme WT e mutate dell'insulina sono stati generati per omologia con l'insulina bovina come template, usando il Modeller software versione 8.1 (<http://www.salilab.org/modeller>).

La predizione di presenza e taglio proteolitico del signal peptide è stata fatta usando il SignalP 3.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>).

## SCOPO DELLA TESI

In primo luogo, scopo dell'attuale tesi di dottorato è verificare se mutazioni nel gene dell'insulina umana possano essere responsabili del Diabete Neonatale Permanente.

Uno screening molecolare sarà effettuato a partire da una casistica di 17 pazienti affetti da PNDM e negativi per mutazioni nel gene KCNJ11 e GCK. L'analisi molecolare degli altri geni causativi per la patologia non verrà svolta in quanto si tratta di casi molto rari e sempre associati a quadri clinici complessi.

I pazienti della nostra casistica sono inoltre negativi a 1 o più antigeni responsabili per l'autoimmunità specifica del diabete di tipo 1. Pazienti con positività anche ad uno solo degli autoanticorpi non sono presi in considerazione.

Nel caso venissero trovate mutazioni, si cercherà di fornire la spiegazione biochimica al fenotipo diabetico. Date le pubblicazioni presenti in letteratura a proposito del topo diabetico Akita (presentante una mutazione spontanea nel gene dell'insulina 2), la nostra ipotesi di lavoro è che mutazioni nel gene dell'insulina possano portare ad apoptosi  $\beta$ -cellulare indotta da stress del reticolo endoplasmatico.

In ogni caso il nostro screening permetterà di creare un'ulteriore sottocasistica su cui testare altri geni candidati per il PNDM, i primi dei quali saranno:

1) IAPP = Islet amyloid polipeptide. Si tratta di un proteina particolarmente abbondante nelle  $\beta$ -cellule pancreatiche e cosecreta con l'insulina, per la quale è stata notata spesso associazione con fenotipi diabetici (53). Il meccanismo di malattia ipotizzato in questo caso, analogamente a quanto ipotizzato nel caso dell'insulina, prevederebbe l'apoptosi  $\beta$ -cellulare indotta da una condizione di ER-stress perdurante nel tempo causata da mutazioni nel gene di IAPP.

2) Neurogenin 3. E' un fattore di trascrizione coinvolto nello sviluppo embrionale delle isole pancreatiche. Modelli murini di knock-out per Ngn3 hanno dimostrato l'assenza di isole pancreatiche e conseguente diabete alla nascita (54). I rari casi di pazienti mutati in Ngn3 presentano diarrea secretoria associata a diabete non autoimmune. Data l'esiguità della casistica di mutanti Ngn3, non si può escludere a priori che mutazioni

meno gravi in Ngn3 possano dare origine al solo fenotipo diabetico (55).

3) CaV1.2 = Canale del calcio voltaggio dipendenti. CaV1.2, codificato dal gene CACNA1C, è espresso preferenzialmente nella membrana della  $\beta$ -cellule pancreatiche e pare il primo responsabile di reagire all'onda di depolarizzazione causata dall'ingresso degli ioni  $K^+$  attraverso il complesso Kir6.2/SUR1 e quindi, in ultima analisi, della secrezione di depositi di insulina (56).

# RISULTATI

## PARTE 1: Studio della casistica PNDM

### Analisi molecolare.

L'analisi molecolare della casistica a nostra disposizione ha portato all'identificazione di 7 nuove mutazioni eterozigoti nel gene INS in 9 probandi italiani affetti da PNDM o da diabete ad esordio infantile. Si tratta per la maggior parte di mutazioni *de novo* a parte gli unici due casi in cui genitori affetti presentano la stessa mutazioni dei figli. Nessun parente non affetto reca mutazioni nel gene INS. Gli alberi genealogici e le mutazioni sono riassunti in figura 4.

La mutazione C<sup>A6</sup>Y è stata identificata anche in un probando danese con esordio del diabete a 3 mesi. Sfortunatamente, il DNA dei due figli di tale probando aventi anch'essi diabete con esordio a 6,5 e 2,5 mesi non è stato disponibile per le analisi. Va inoltre ricordato come sia stato eseguito il sequenziamento di ~ 200 soggetti italiani normoglicemici come controllo e non sia stata trovata alcuna mutazione. E' da notare come tutte le mutazioni riscontrate nei soggetti PNDM siano diverse da quelle precedentemente descritte in letteratura riguardanti i casi di iperinsulinemia e iperproinsulinemia familiare.

In figura 5 vengono riassunti i residui aminoacidici coinvolti nelle mutazioni. E' da notare come 3 di esse (C<sup>A6</sup>Y, Y<sup>A19</sup>X e R65C) comportino l'inserimento o la rimozione di una cisteina (con conseguente disparità dei gruppi tiolici presenti), 2 di esse siano localizzate vicino alla C<sup>B7</sup>Y (L<sup>B6</sup>P e L<sup>B6</sup>V) mentre per le ultime 2 (L<sup>B11</sup>P e L<sup>B15</sup>Y<sup>B16</sup>delinsH) è lecito supporre che possano introdurre distorsioni nella struttura secondaria.

E' stata inoltre effettuata un'analisi comparativa tra le sequenze aminoacidiche dell'insulina in svariati organismi superiori per valutare il grado di conservazione dei residui aminoacidici dai mammiferi superiori fino alla classe degli agnati (Mixine Glutinosa = lampreda) e, come si può vedere in figura 6, tutti i residui mutati nei casi

PNDM sono altamente conservati.

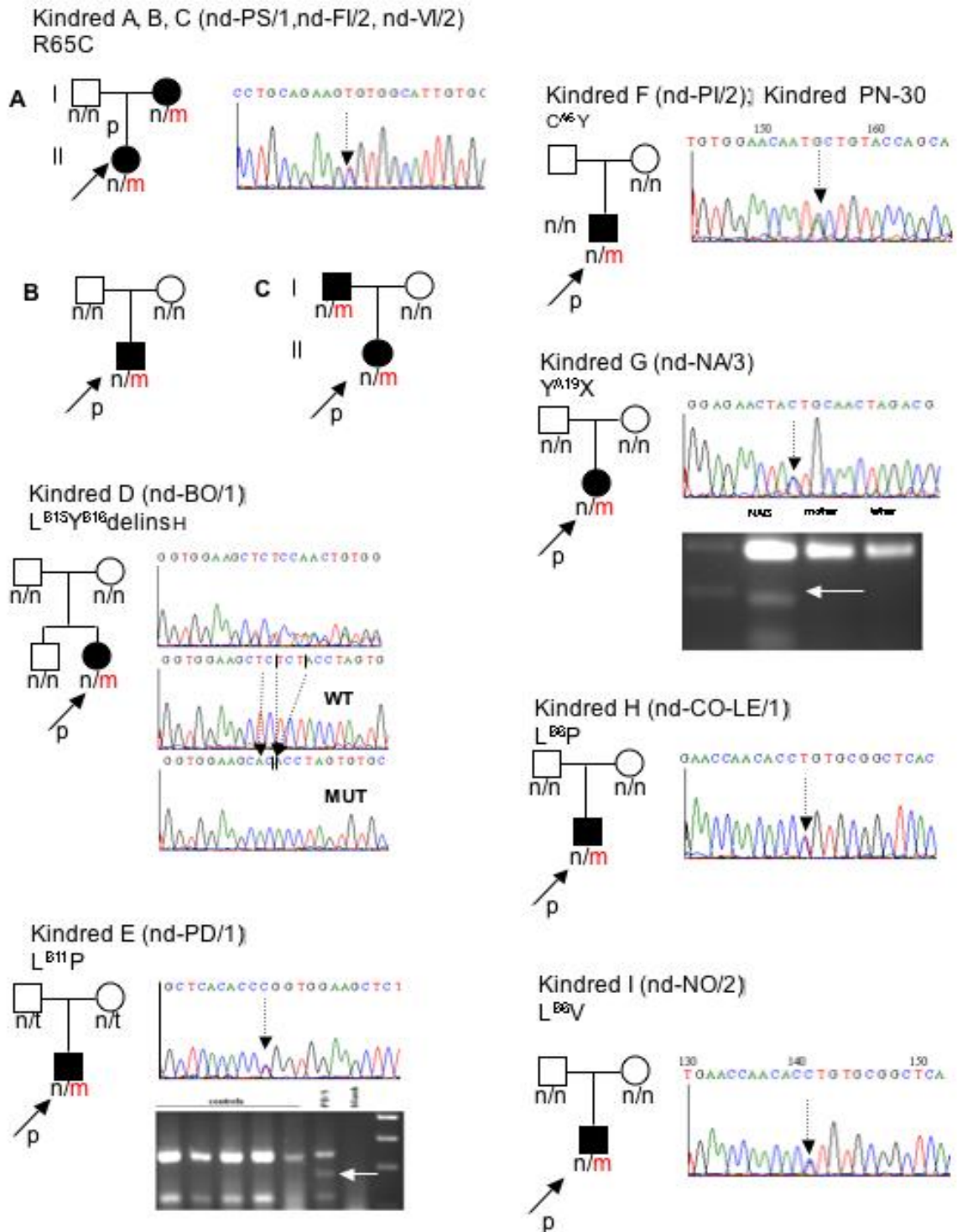


Fig.4: Alberi genealogici dei pazienti affetti da PNDM e sequenze nucleotidiche del gene INS e delle sue mutazioni. Le mutazioni LB11P e YA19X sono confermate per digestione con *HpaII* e *SpeI* rispettivamente.



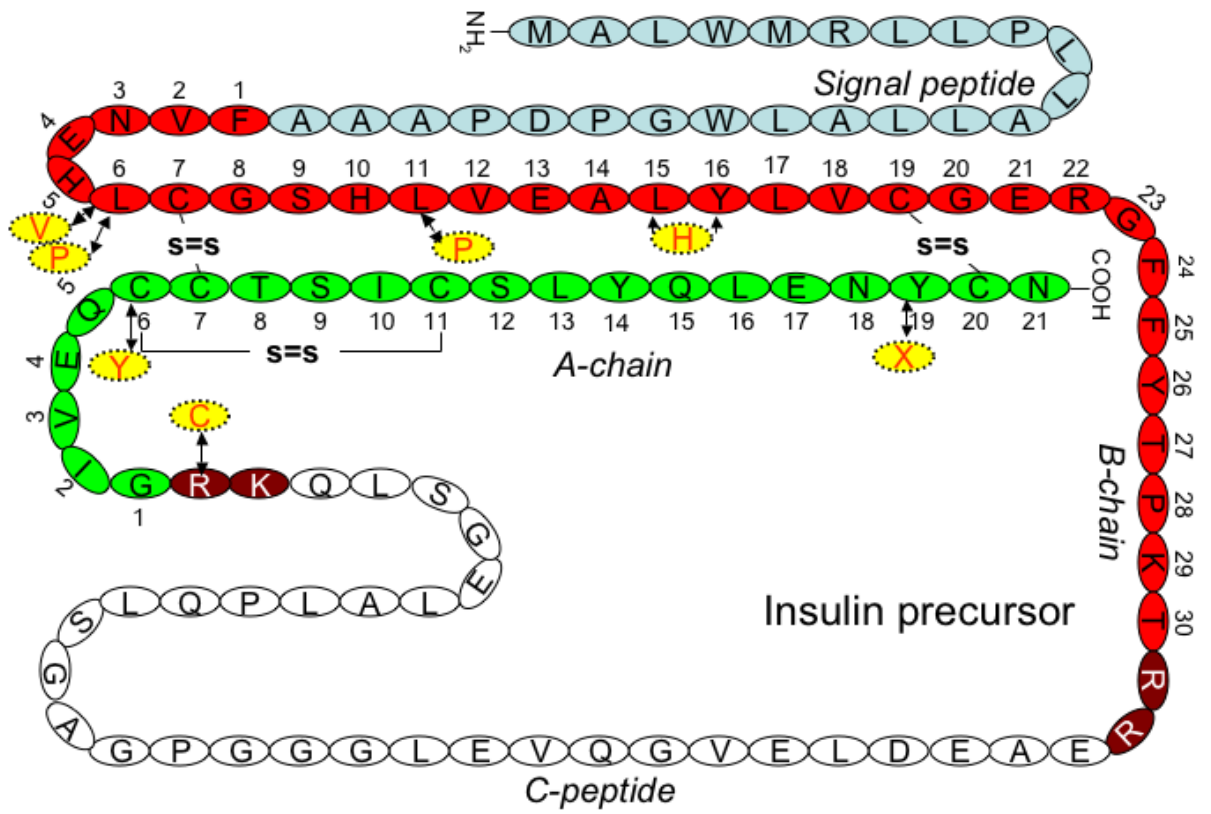


Fig.5 Struttura secondaria dell'insulina umana e mutazioni riscontrate in pazienti affetti da PNDM

$\beta$ -chain	C-peptide
H.S. FVNQH <b>I</b> CGSH <b>I</b> VEAL <b>I</b> LV <b>C</b> GER <b>G</b> FF <b>F</b> YTPKT-	RR <b>E</b> AEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGS--LQ <b>K</b> R
R.N. FVKQH <b>I</b> CGSH <b>I</b> VEAL <b>I</b> LV <b>C</b> GER <b>G</b> FF <b>F</b> YTPMS-	RR <b>E</b> VEDPQVAQLELGGGPGAGDLQTLALEVA--RQ <b>K</b> R
M.M. FVKQH <b>I</b> CGPH <b>I</b> VEAL <b>I</b> LV <b>C</b> GER <b>G</b> FF <b>F</b> YTPKS-	RR <b>E</b> VEDPQVEQLELGGSP--GDLQTLALEVA--RQ <b>K</b> R
G.G. --NQH <b>I</b> CGSH <b>I</b> VEAL <b>I</b> LV <b>C</b> GER <b>G</b> FF <b>F</b> YSPKA-	RR <b>D</b> VEQPLVSSPLRG---EAGVLPFQQEEYE--KV <b>K</b> R
X.T. --NQH <b>I</b> CGSH <b>I</b> VEAL <b>I</b> LV <b>C</b> DR <b>G</b> FF <b>F</b> YYPKI-	KR <b>D</b> IEQAMVNGPQDN---ELDGMQLQPQEYQ--KM <b>K</b> R
D.R. --SQH <b>I</b> CGSS <b>I</b> VDAL <b>I</b> LV <b>C</b> GR <b>G</b> FF <b>F</b> YTNRG-	RR <b>D</b> LETLLALLSNLAGYEAADA-DPLKEKVM--KM <b>K</b> R
M.G. ----H <b>I</b> CGKD <b>I</b> VNAL <b>I</b> I <b>A</b> CG <b>V</b> R <b>G</b> FF <b>F</b> YDPTKM	KR <b>D</b> TGALAAFLPLAYAEDNESQDDESIGINEVLKS <b>K</b> R

$\alpha$ -chain
H.S. <b>G</b> IVE <b>Q</b> C <b>I</b> CTSI <b>C</b> SLY <b>Q</b> LE <b>N</b> Y <b>C</b> N
R.N. <b>G</b> IV <b>D</b> <b>Q</b> C <b>I</b> CTSI <b>C</b> SLY <b>Q</b> LE <b>N</b> Y <b>C</b> N
M.M. <b>G</b> IV <b>D</b> <b>Q</b> C <b>I</b> CTSI <b>C</b> SLY <b>Q</b> LE <b>N</b> Y <b>C</b> N
G.G. <b>G</b> IVE <b>Q</b> C <b>H</b> N <b>T</b> C <b>S</b> LY <b>Q</b> LE <b>N</b> Y <b>C</b> N
X.T. <b>G</b> IVE <b>Q</b> C <b>H</b> S <b>T</b> C <b>S</b> LF <b>Q</b> LE <b>S</b> Y <b>C</b> N
D.R. <b>G</b> IVE <b>Q</b> C <b>H</b> R <b>P</b> C <b>T</b> IY <b>H</b> LE <b>D</b> Y <b>C</b> S
M.G. <b>G</b> IVE <b>Q</b> C <b>H</b> K <b>R</b> C <b>S</b> IY <b>D</b> LE <b>N</b> Y <b>C</b> N

Fig.6: Allineamento delle sequenze aminoacidiche delle insuline di Homo Sapiens (HS), Rattus Norvegicus (RN), Mus Musculus (MM), Gallus Gallus (GG), Xenopus Tropicalis (XT), Danio Rerio (DR) e Mixine Glutinosa (MG). In rosso sono evidenziati gli aminoacidi conservati in tutte le specie; in verde gli aminoacidi mutati nei pazienti PNDM.

## **Caratteristiche cliniche**

Com'è logico supporre per un difetto in un gene espresso esclusivamente nella  $\beta$ -cellule pancreatiche, tutti i pazienti affetti non presentano altre caratteristiche cliniche rilevanti oltre al diabete.

Tutti i pazienti sono nati dopo gravidanze senza eventi di rilievo; le loro caratteristiche cliniche principali sono riassunte in tabella 1. In tre soggetti (kindreds E, G e H) la difficoltà ad aumentare di peso e le ricorrenti infezioni hanno portato ad ulteriori analisi e quindi alla diagnosi di diabete. Nel caso invece del paziente II-1 del kindred A, la glicosuria era continuamente controllata dalla madre (a sua volta affetta di PNDM) fino a trovare positività nel pannolino al 76 giorno dopo il parto. Infine, gli altri 6 pazienti sono stati portati all'ospedale locale a causa di severa iperglicemia con chetosi.

Il C-peptide, misurato 1-56 giorni dopo la diagnosi e durante la terapia insulinica è stato rilevato in 8 probandi (i dati di due probandi e dei due genitori affetti non sono disponibili). Nei kindreds A, II-1 e H, il C-peptide era insolitamente alto (vd tabella 1). Inoltre, l'analisi del C-peptide ripetuta a distanza di tempo in due pazienti sotto terapia insulinica (kindred A, II-1 e kindred F) e in uno trattato con sulfaniluree per 60 giorni e successivamente con una terapia mista sulfaniluree/insulina (kindred H), ha mostrato dei valori decrescenti costantemente. Alla fine dello studio, il C-peptide non risulta più misurabile in tutti i pazienti ad eccezione di 3.

Il livello di glucagone pancreatico basale è stato misurato in 2 pazienti ed è stato trovato pressochè normale (kindred A, I-1, 21,3 ng/dl; kindred D, 16,5 ng/dl). La secrezione del glucagone, determinata in un insulin tolerance test, è aumentata di circa il 50% come risultato dell'ipoglicemia indotta in ambedue i pazienti.

Tab.1 Caratteristiche cliniche dei pazienti e dei loro parenti affetti.

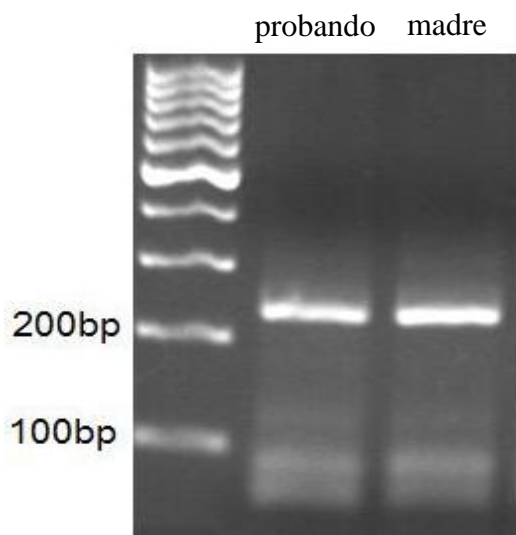
Famiglia	Kindred A		Kindred B	Kindred C		Kindred D	Kindred E	Kindred F	Kindred G	Kindred H	Kindred I
	Probando (II-1)	Madre (I-2)	Probando (II-1)	Probando (II-1)	Padre (I-1)	Probando (II-1)	Probando (II-1)	Probando (II-1)	Probando (II-3)	Probando (II-1)	Probando (II-2)
Mutazione	R65C	R65C	R65C	R65C	R65C	L <sup>B15</sup> Y <sup>B16</sup> delinsH	L <sup>B11</sup> P	C <sup>A6</sup> Y	Y <sup>A19</sup> X	L <sup>B6</sup> P	L <sup>B6</sup> V
All'esordio											
Età	70d <sup>A</sup>	1 year	134 d	86 d	4 years	37 d	69 d	75 d	88 d	139 d <sup>A</sup>	184 d
Presentazione	Hyperglyc.	NA	Ketoacid.	Ketoacid.	Hyperglyc.	Ketoacid.	Hyperglyc.	Ketoacid.	Hyperglyc.	Hyperglyc.	Ketoacid.
Glucosio (mg/dl)	234	NA	612	521	216	594	610	>1000	504	306	702
C-peptide (ng/ml)	8.5 [78d] 3.8 [87d]	NA	0.85 [190d]	0.5 [90d]	NA	0.57 [40d]	0.7 [71d]	0.97 [88d] 0.14 [195d]	NA	3.2 [148d] 4.17 [194d]	0.8 [226d]
Stato attuale											
Età	12 y	41 y	6 y	16 mo	37 y	13 y	21 y	28 mo	13 y	28 mo	30 mo
Dose di insulina (U/kg/day)	1,41	0,67	0,6	0,37	0,83	1	1	0,6	1,14	0,38	0,85
C-peptide (ng/ml)	ND	NA	0,84	ND	NA	ND	ND	ND	ND	ND	0,8

Data la differenza nell'età d'esordio del diabete tra genitore e figlio negli unici due casi familiari a nostra disposizione (Kindred C - 4 anni Vs 3 mesi e Kindred - A 1 anni Vs 2 mesi) abbiamo voluto testare l'ipotesi che tale differenza potesse essere attribuibile a una minore espressione dell'allele mutato nei genitori rispetto all'allele sano, cosa che rallenterebbe l'effetto prototossico dell'allele mutato stesso. Questa eventualità sarebbe possibile se i VNTR nel locus IDDM2 (vd introduzione) fossero distribuiti in modo asimmetrico nel genitore, cioè in numero maggiore sull'allele mutato e in numero minore su quello wt, e in modo simmetrico sul probando.

Per dare un prima valutazione su questa possibilità, abbiamo studiato il polimorfismo -23HphI, al 5' del gene INS, che in più del 99% dei casi vede la T associata a corti VNTR e la A a associata a lunghi VNTR.

L'analisi di restrizione effettuata sull'amplificato dell'esone 2 dell'insulina (vd figura 7) ha però evidenziato come tutti i soggetti in esame presentassero omozigosi A/A nello SNP -23HphI, corrispondente alla presenza di sole bande a 231bp nella corsa elettroforetica. Pertanto non è il livello di espressione dei singoli alleli ad influire sull'età di esordio del diabete ma è più probabile che lo siano le differenze nel corredo genetico dei singoli individui e le componenti ambientali.

Fig.7 = analisi di restrizione del KINDRED A per il polimorfismo -23HphI. Lo stesso pattern di digestione è stato ottenuto anche per il KINDRED C (probando e padre).



### **Differenze cliniche tra pazienti PNDM mutati in INS e pazienti PNDM mutati in altri geni**

Confrontando le caratteristiche cliniche dei pazienti PNDM con mutazioni nel gene INS con quelle dei pazienti PNDM con mutazioni in altri geni (principalmente KCNJ11), emerge quanto segue:

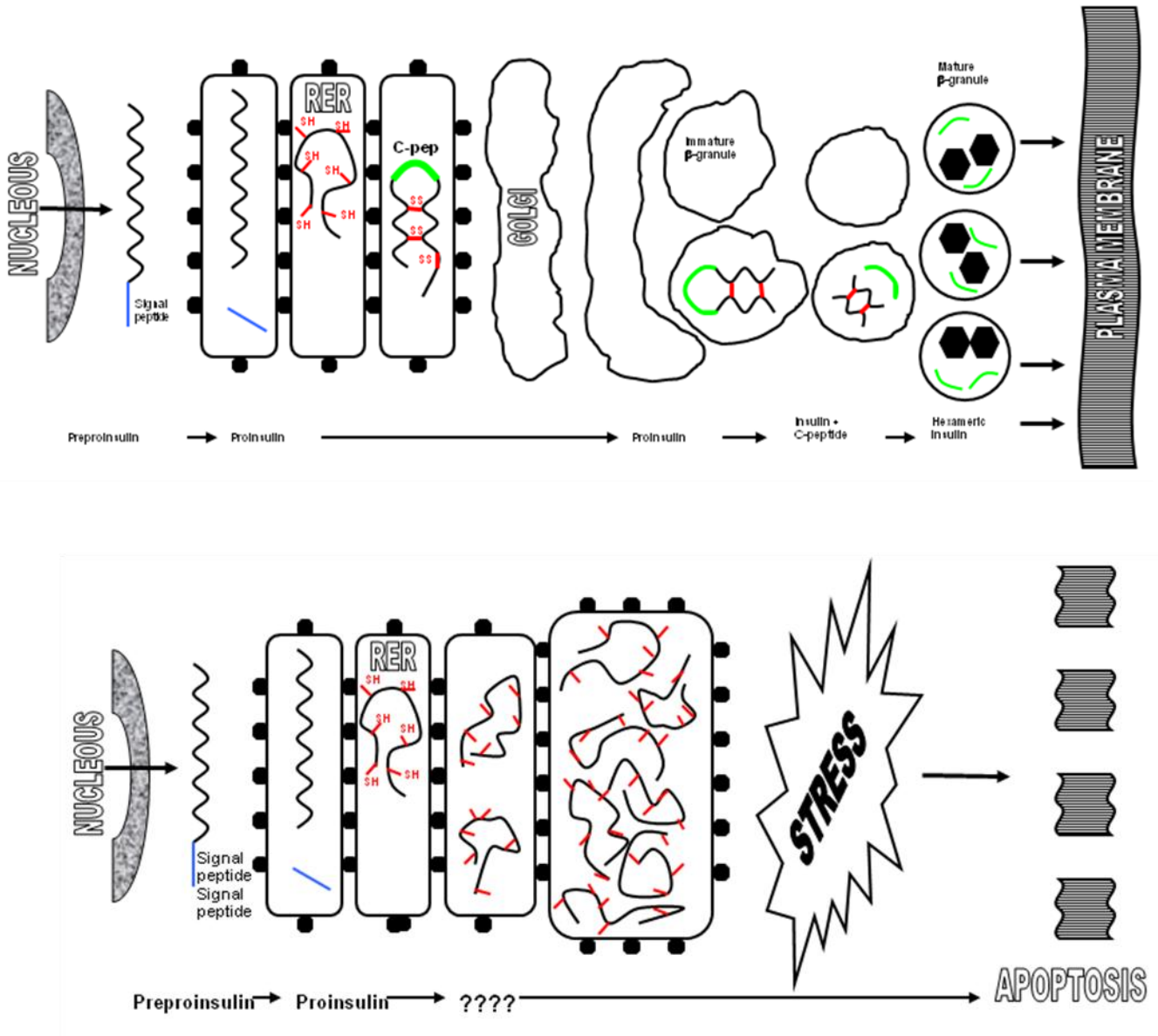
- 1) Il peso alla nascita di tutti i mutanti INS, eccetto il kindred F, è pressochè normale (in media  $3,055 \pm 227g$ ). Questo è palesemente l'opposto di quanto riscontrato con i pazienti mutati in KCNJ11, i quali risultano nettamente sottopeso (in media  $2,455 \pm 370g$ ; p-value  $< 0.00021$  INS Vs KCNJ11).
- 2) Al momento della diagnosi, il C-peptide era appena misurabile in 4 su 10 pazienti mutati in KCNJ11 (11, 14 and Barbetti unpublished) mentre era chiaramente misurabile, e in alcuni casi anche molto alto, in tutti i pazienti mutati in INS in cui è stata fatta l'analisi.
- 3) La diagnosi di diabete in pazienti con mutazioni INS è avvenuta tra i giorni 37-1460 (mediana,  $88 \pm 412.4$ ), cioè circa 5 settimane più tardi che in pazienti mutati in KCNJ11, nei quali la diagnosi è stata fatta tra i giorni 1-220 (mediana  $53 \pm 58,3$ ; p-value  $< 0,07$ ). Va detto però che, escludendo il solo kindred C I-1, il raffronto fra i due

gruppi raggiunga la significatività statistica (mediana  $87 \pm 94,7$ ; p-value  $< 0,00038$ ). E' importante far notare che, da quanto emerge dai nostri studi, il diabete neonatale causato da mutazioni INS può insorgere anche molto dopo il 6° mese di vita, che è il limite minimo accettato per l'insorgenza del diabete di tipo 1 e la sua diagnosi su base clinica. Questa caratteristica è tipica di un'altra forma di diabete neonatale associato alla sindrome Wolcott-Rallison. In questo caso il gene mutato è EIF2AK3, mutazioni nel quale causano un'errata risposta cellulare all'ER stress e un malfunzionamento nella sintesi delle proteine secrete nella  $\beta$ -cellule pancreatiche. Quindi, poiché molte mutazioni INS sono spontanee, tali pazienti non possono essere distinti dai diabetici di tipo 1 (se non con l'analisi degli autoanticorpi). Per questo motivo sarebbe meglio cambiare la definizione di PNDM con quella di *monogenic diabetes of infancy* (MDI), una definizione più generale che include ogni forma di diabete, permanente o transitoria, con esordio durante i primi anni di vita e causata da un difetto in un singolo gene.

## **PARTE 2: studi funzionali delle mutazioni insulina**

Sulla base principalmente delle precedenti conoscenze acquisite studiando il topo Akita (40, 41), ma anche di quanto finora risaputo sulle conseguenze di mutazioni in proteine secrete, il modello ipotizzato per spiegare il fenotipo diabetico dei pazienti mutati in INS presuppone l'incapacità dell'insulina mutata di acquisire la corretta struttura terziaria. Il continuo accumulo di nuova insulina mutata nel reticolo endoplasmatico, reso via via più massiccio con l'insorgere dell'iperglicemia e con l'aumentata richiesta di insulina, è causa di stress nell'ER stesso che non è più in grado di mantenere la fisiologica capacità degradativa delle proteine misfoldate. Inoltre la possibile esposizione di gruppi tiolici liberi potrebbe alterare lo stato ossidoriduttivo dell'ER contribuendo ad aumentarne il livello di stress. In ultima analisi, tutto questo spinge le  $\beta$ -cellule verso l'apoptosi. Tale meccanismo, raffigurato in fig.8, spiegherebbe inoltre il carattere dominante delle mutazioni INS.

Fig.8: Meccanismo di malattia ipotetico per il diabete neonatale permanente. Secrezione di insulina wt (sopra). Accumulo di insulina mutata e conseguente apoptosi b-cellulare (sotto)



Come si può facilmente considerare osservando la fig. 5, le mutazioni trovate inseriscono o eliminano una cisteina (R65C, Y<sup>A19</sup>X, C<sup>A6</sup>Y), introducono una sostituzione in frame dei due aminoacidi Leu15 e Tyr16 con una istidina, oppure sono localizzate a livello del "core" idrofobico dell'insulina sulla superficie di interazione dei dimeri di insulina (L<sup>B6</sup>P, L<sup>B6</sup>V e L<sup>B11</sup>P). Una prima analisi delle ripercussioni delle mutazioni sulla struttura secondaria dell'insulina è stata effettuata mediante computer modeling (vd fig. 9). Tale studio non ha evidenziato particolari differenze di struttura

tra l'insulina wt e le mutazioni  $L^{B6P}$ ,  $L^{B11P}$  e  $C^{A6Y}$ . Va però detto che anche la mutazione h-Akita, cioè l'equivalente umano della mutazione  $C^{A7Y}$  del topo Akita, non ha mostrato grossi stravolgimenti della struttura secondaria. L'unico modello che lasci immaginare una forte distorsione conformazionale è quello prodotto per il mutante  $L^{B15Y^{B16}}$ delinsH, dove è evidente l'effetto della mutazione sulla struttura dell' $\alpha$ -elica.

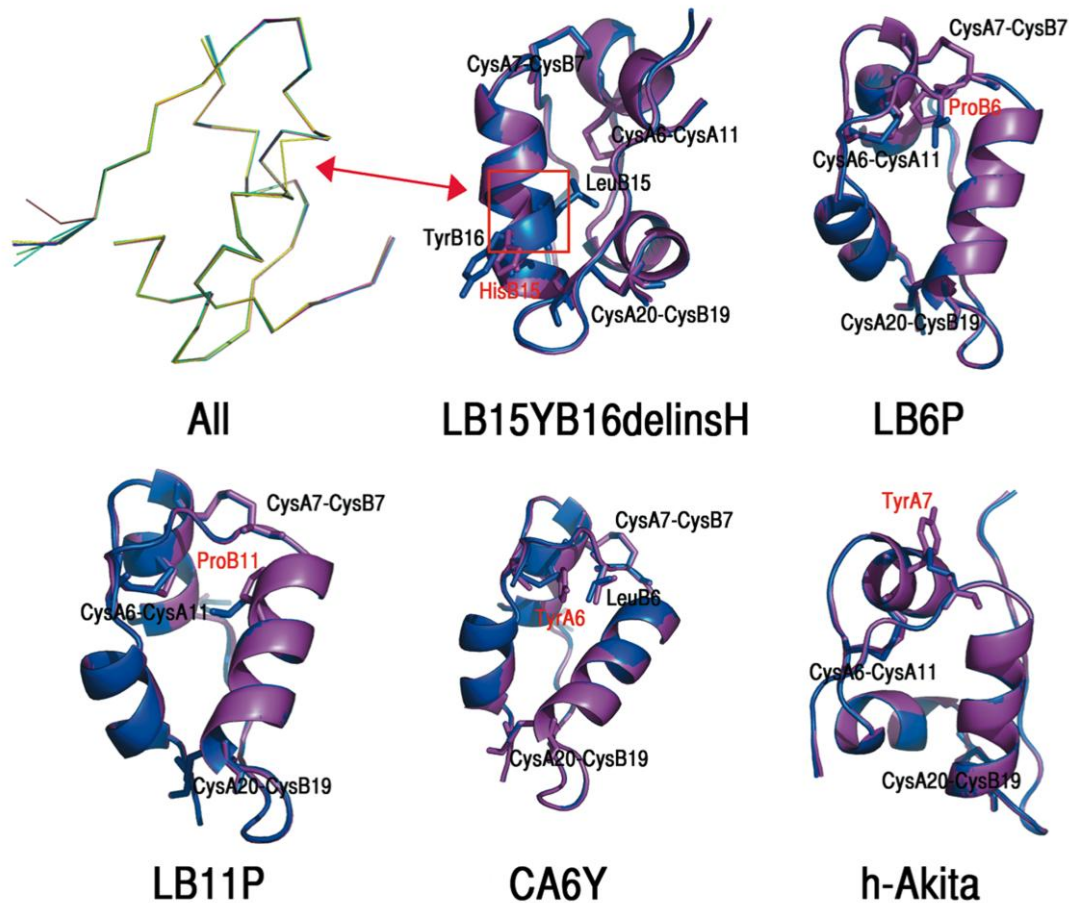


Fig.9: strutture secondarie sovrapposte di insulina wt (blue) e insulina mutata (viola) ottenute mediante computer modeling.

### Esperimenti in vitro sul linee cellulari

Per verificare sperimentalmente gli effetti delle mutazioni insulina sulla normale biochimica cellulare di linee secretorie, tutte le mutazioni riscontrate nei pazienti



PNDM (ad eccezione della L<sup>B6V</sup>) sono state riprodotte nel cDNA dell'insulina wt nel vettore di espressione forte pCDNA3.1+. A queste sono state aggiunte le mutazioni R65L, corrispondente a una mutazione umana non causativa per il PNDM, come controllo negativo e la mutazione h-Akita come controllo positivo.

Esperimenti di pulse-chase sono stati successivamente condotti nella linea cellulare HEK293 con tutte le proteine ricombinanti prodotte allo scopo di valutare gli effetti delle mutazioni sulla secrezione dell'insulina. 3 esperimenti indipendenti sono serviti a misurare l'espressione e la secrezione di proteine marcate in <sup>35</sup>S un'ora dopo la sintesi (vd figura 10A). Dopo l'immunoprecipitazione e l'analisi per Tris-tricina-urea-SDS-PAGE in condizioni non riducenti, la proinsulina-WT e la proinsulina-R65L sono espresse correttamente, con simili frazioni di proinsulina nativa "fast-migrating" e di "slower migrating" di proinsulina non-nativa (46). A un'ora dalla sintesi, sia la proinsulina-WT che la proinsulina-R65L sono efficientemente secrete nel mezzo di coltura.

Al contrario, tutte le mutazioni causative per il PNDM e la mutazione h-Akita mostrano un livello di espressione e di secrezione di proinsulina nativa estremamente ridotto. In un set separato di esperimenti si è visto come le forme non secrete di proinsulina mutata siano degradate intracellularmente (data not shown).

Infine la quantità di proinsulina rilasciata nel mezzo di coltura è stata misurata per RIA, confermando il difetto di secrezione per tutti i mutanti causativi di PNDM (vd figura 10B). Tutte questi dati dimostrano come le mutazioni riscontrate nei pazienti PNDM perturbano la struttura dell'insulina e causino difetti nella sua secrezione.

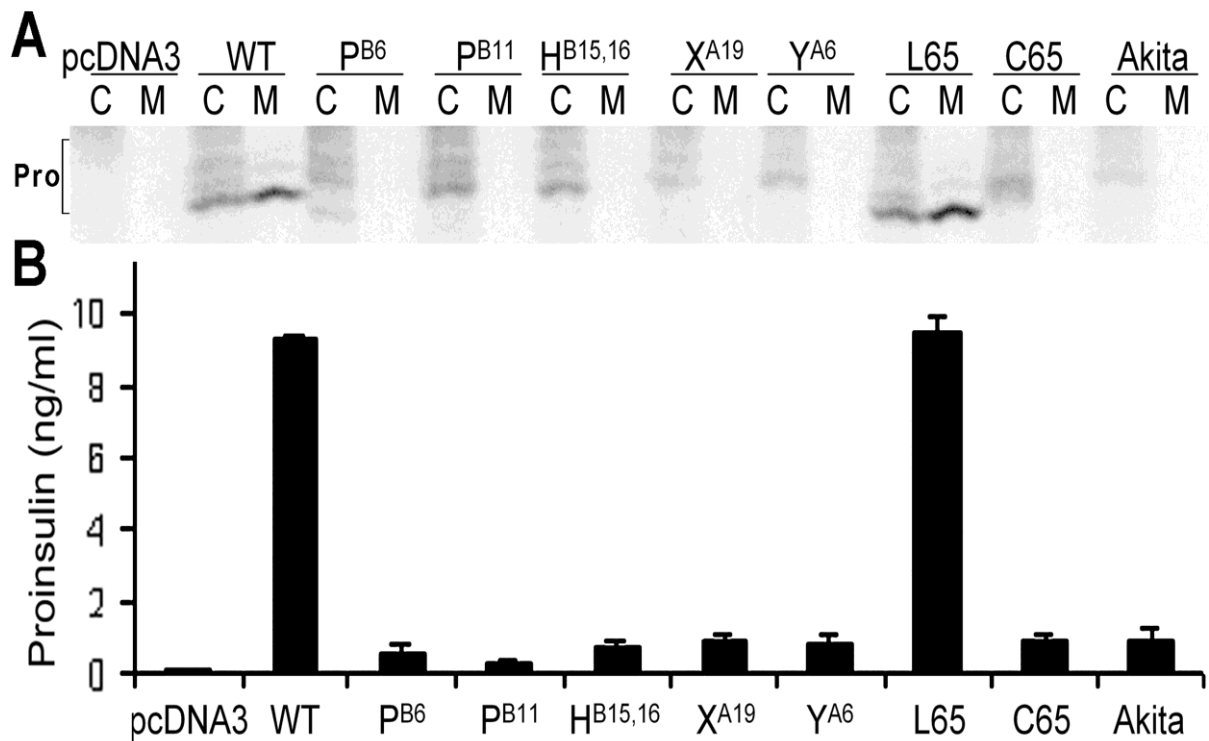


Figura 10: (A) Pulse-chase di cellule HEK293 trasfettate con i costrutti wild type e mutati dell'insulina. C = estratto cellulare M = mezzo di coltura. (B) Quantizzazione mediante radioimmunoassay dell'insulina secreta nel mezzo a 16h dopo la trasfezione.

### Misurazione dell'ER-stress

Per verificare se la mancata secrezione dei mutanti insulina fosse in grado di causare ER-stress sono stati scelti i due fattori XBP-1 e Grp78 come marcatori di stress.

XBP-1 è un gene il cui mRNA va incontro a un splicing alternativo rimuovendo un frammento di 26bp, in condizioni di ER-stress. Cellule HEK293 sono state trasfettate con tutti i costrutti a disposizione e si è andati a misurare la quantità di XBP-1 spliced dopo 48 ore. Come controllo positivo si è utilizzata la tunicamicina (5µg/ml per 4h), che è nota per essere un forte induttore di ER-stress in quanto inibisce l'enzima GlcNAc fosfotransferasi bloccando la sintesi delle glicoproteine. Come si può verificare nella figura 11A non ci sono differenze tra le cellule non trasfettate e le cellule esprimenti le forme secrete dell'insulina (wt e R65L) e il livello di XBP-1

spliced appare molto basso. Al contrario, tutte le altre versioni mutate dell'insulina causano un aumento della versione spliced di XBP-1 che è stata quantizzata per densitometria e riportata in figura 11B.

Questa è la prima indicazione che l'insulina recante mutazioni causative per il PNDM è in grado di indurre ER-stress. E' da notare infine come il trattamento con tunicamicina sia in grado di indurre in modo significativamente maggiore la conversione di XBP-1 nella sua forma spliced.

Il secondo marcatore utilizzato per misurare l'ER-stress è stato Grp78 (conosciuto anche come BiP). Tale fattore appartiene alla classe delle chaperonine ed è noto per intervenire in numerosi processi di folding. In questo caso non si è potuto procedere all'analisi di tutte le mutazioni disponibili per difficoltà tecniche. Pertanto si è scelto di trasfettare le cellule HEK293 con i soli costrutti WT, L<sup>B15</sup>Y<sup>B16</sup>delinsH, C<sup>A6</sup>Y, L<sup>B6</sup>P e L<sup>B11</sup>P. Come illustrato in figura 12 è stato quindi effettuato un esperimento di time-course estraendo le proteine a 9, 16 e 24 ore e misurando la quantità di Grp78 espressa mediante Western Blot e normalizzando per l'espressione di  $\beta$ -tubulina. Tale esperimento ha permesso di dimostrare come l'espressione di Grp78 (e quindi l'ER-stress indotto) sia maggiore a 9 e 16 ore per le mutazioni L<sup>B15</sup>Y<sup>B16</sup>delinsH e C<sup>A6</sup>Y rispetto al wt, mentre per le mutazioni L<sup>B6</sup>P e L<sup>B11</sup>P l'effetto, pur presente, sia minore e più spostato verso le 24 ore.

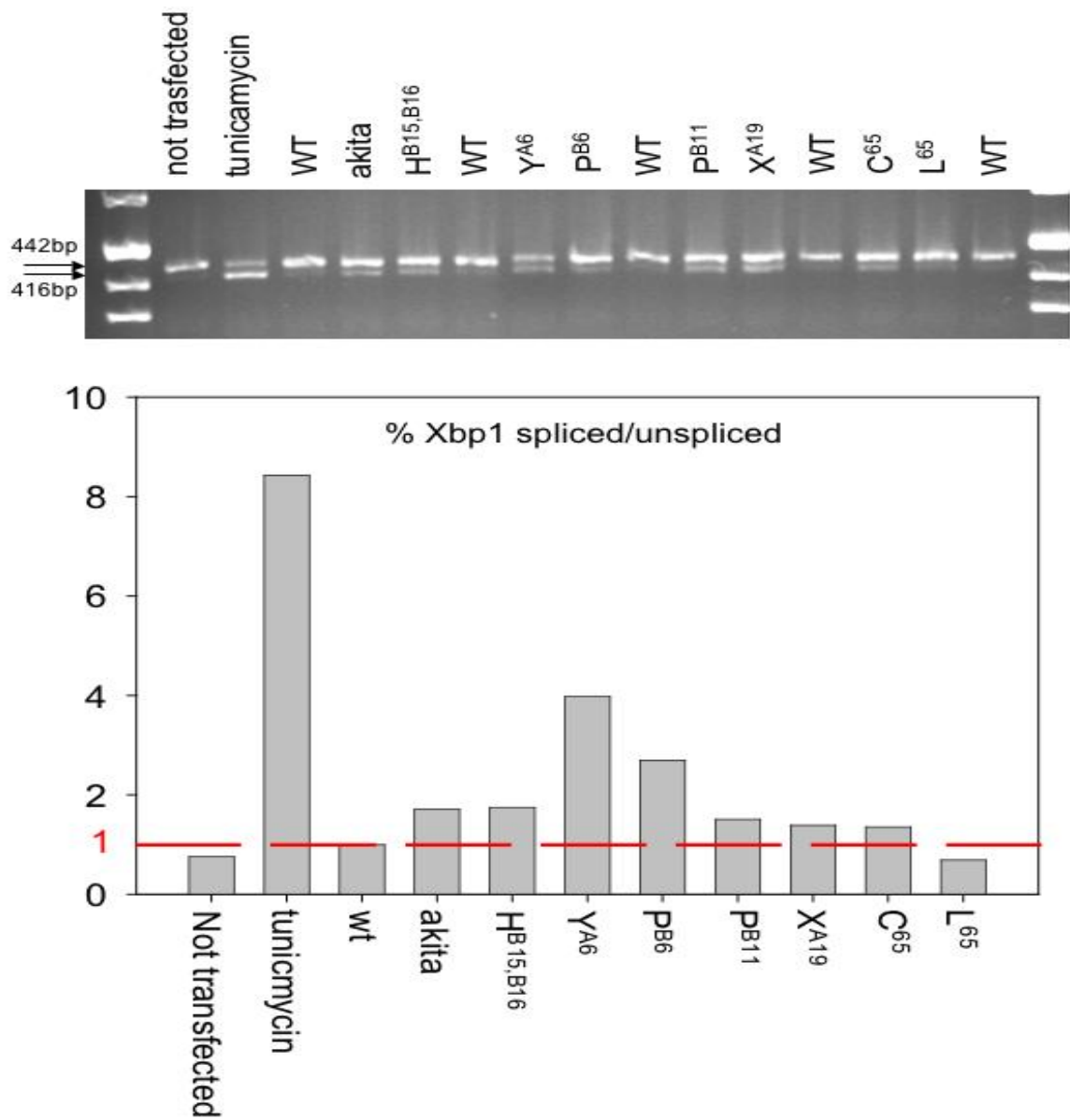


Figura 11: XBP-1 splicing in HEK293 trasfettate con i costrutti wild type e mutati dell'insulina. Gel d'agarosio (sopra) e quantizzazione mediante densitometria (sotto). Dopo aver calcolato il rapporto spliced/unspliced per ogni singolo costrutto, viene preso come valore = 1 (linea rossa) il valore ottenuto con l'insulina wild type e tutti gli altri sono normalizzati su questo.

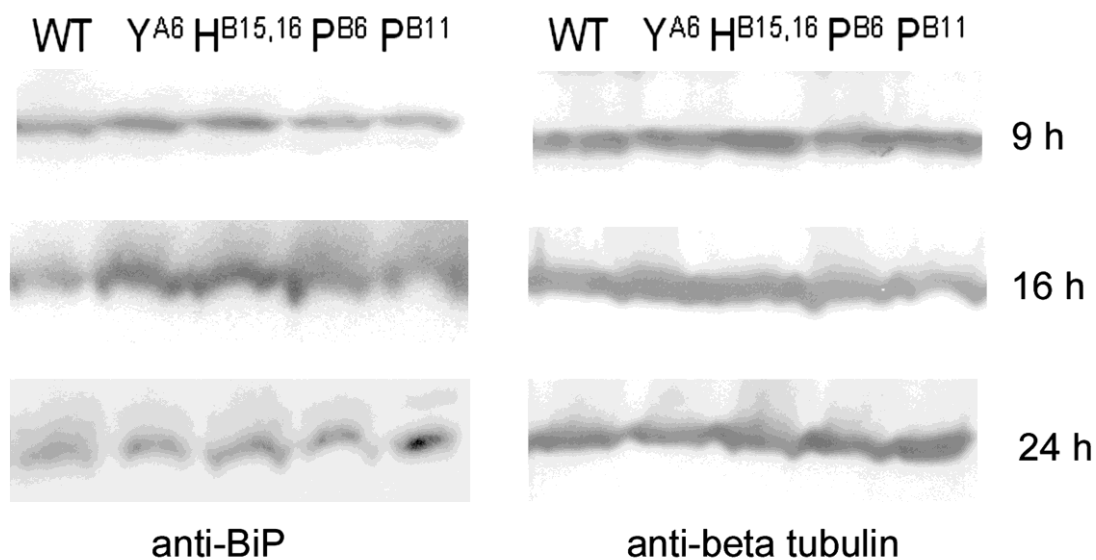


Fig. 12: Western-Blot con anticorpo primario anti-Grp78 (BiP) in estratto cellulare di HEK293 trasfettato con l'insulina wt e le mutazioni C<sup>A6</sup>Y, L<sup>B15</sup>Y<sup>B16</sup>delinsH, L<sup>B6</sup>P e L<sup>B11</sup>P. I tempi indicati sono relativi alle ore passate dalla trasfezione.

### Misurazione dell'apoptosi cellulare

Allo scopo di verificare se l'ER-stress indotto dalle mutazioni nel gene INS sia in grado di portare le  $\beta$ -cellule incontro ad apoptosi sono stati effettuati i seguenti esperimenti.

In un primo esperimento è stata utilizzata la linea di insulinoma di ratto INS-1E. Tale scelta è stata fatta in quanto tali cellule sono, tra tutte le linee attualmente disponibili e insieme a quelle della linea di insulinoma di topo MIN-6, tali per cui la loro fisiologia cellulare è la più vicina a quella  $\beta$ -cellulare umana. Infatti sono in grado di produrre e secernere insulina biologicamente attiva e di aumentarne la secrezione in risposta allo stimolo del glucosio.

In un primo esperimento le INS-1E sono state trasfettate con tutti i costrutti disponibili e l'espressione dell'insulina nelle sue varie forme è stata rilevata a 48 e 96 ore mediante immunofluorescenza utilizzando un anticorpo monoclonale antiproinsulina umana, per evitare un riconoscimento aspecifico dell'insulina di ratto prodotta spontaneamente dalla INS-1E stesse (vd figura 13).

A 96 ore dalla trasfezione l'immunofluorescenza era ancora riscontrabile nel  $61\% \pm$

2,8% (n=4 trasfezioni) delle cellule trasfettate con l'insulina wt e nel 56%  $\pm$  4,0% (n=3 trasfezioni) delle cellule trasfettate con l'insulina R65L. Al contrario, a 96 ore dalla trasfezione l'insulina R65C, L<sup>B15</sup>Y<sup>B16</sup>delinsH, C<sup>A6</sup>Y e Y<sup>A19</sup>X era scomparsa (n=3 per tutti i costrutti), comportamento indicativo di una ridotta vitalità cellulare. Una situazione intermedia è stata invece riscontrata per le mutazioni L<sup>B6</sup>P (36%  $\pm$  2,2%; n=2 trasfezioni) e L<sup>B11</sup>P (17,7%  $\pm$  4,8%; n=5 trasfezioni).

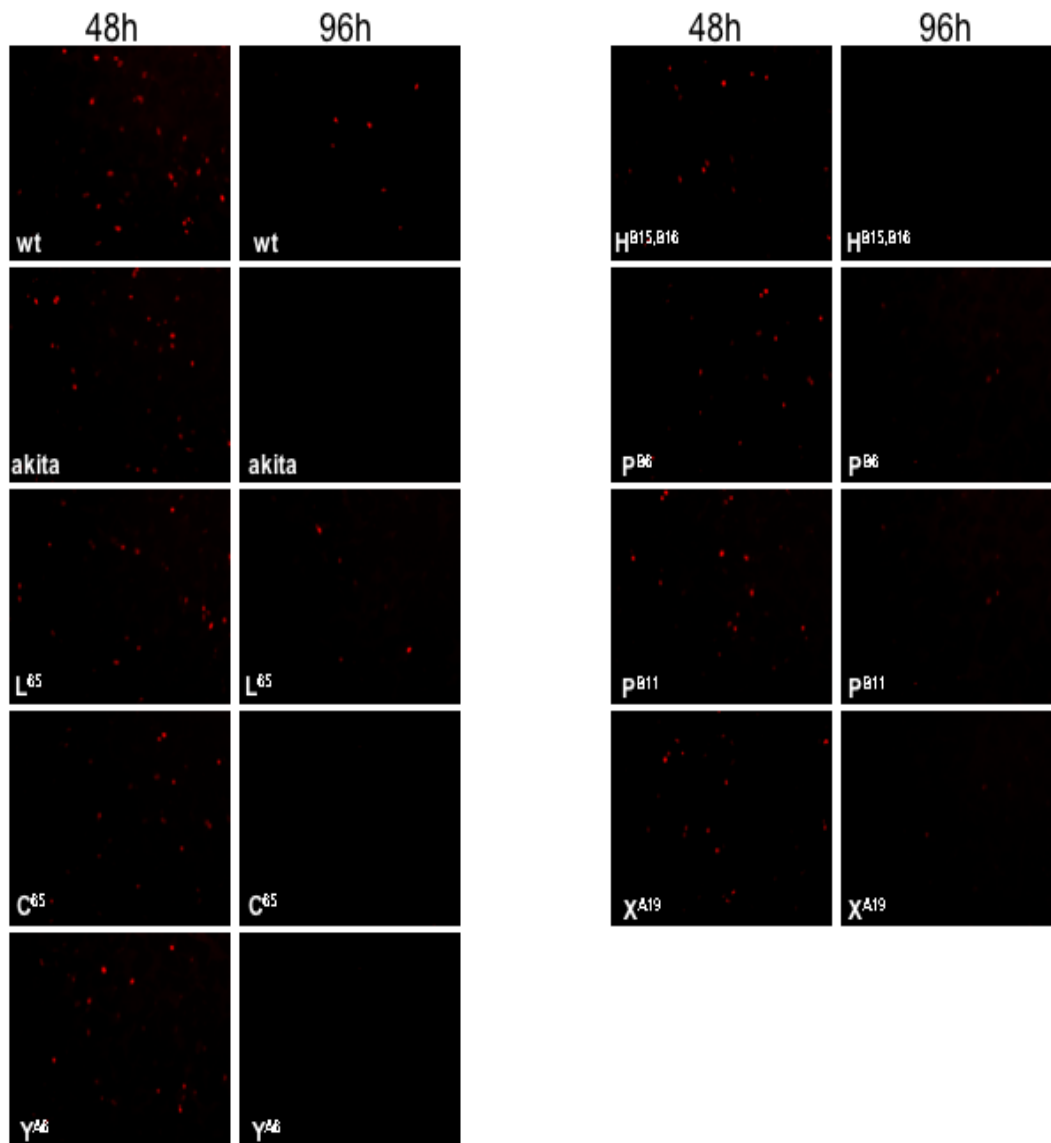


Fig. 13. Vitalità delle INS-1E a 48 e 96 dalla trasfezione con i costrutti di insulina wt e mutata. L'insulina è stata visualizzata mediante immunofluorescenza. A 96 ore si può notare della fluorescenza residua solo nelle cellule trasfettate coi costrutti wild type e R65L

Successivamente abbiamo voluto dimostrare l'apoptosi cellulare utilizzando i saggi dell'annexin V e del propidio ioduro.

In un primo momento è stata misurata la percentuale di apoptosi e di necrosi spontanee nella linea Min6 mediante il saggio dell'annexin V e le percentuali misurate (vd fig. 14) sono state così alte da indurci a non usare questa linea cellulare per gli esperimenti preventivati. Infatti le Min6 hanno la scomoda caratteristica di essere difficilmente trasfettabili con i comuni sistemi (Lipofectamina e Ca-fosfato), pertanto un livello di apoptosi spontanea troppo alta porterebbe a mascherare l'apoptosi indotta da espressione di insulina mutata. Analogamente, è stata testata per il saggio dell'annexin V anche la linea di insulina di topo INS1-E e anche in questo caso l'elevata mortalità endogena ha suggerito di non utilizzare questo linea (data not shown).

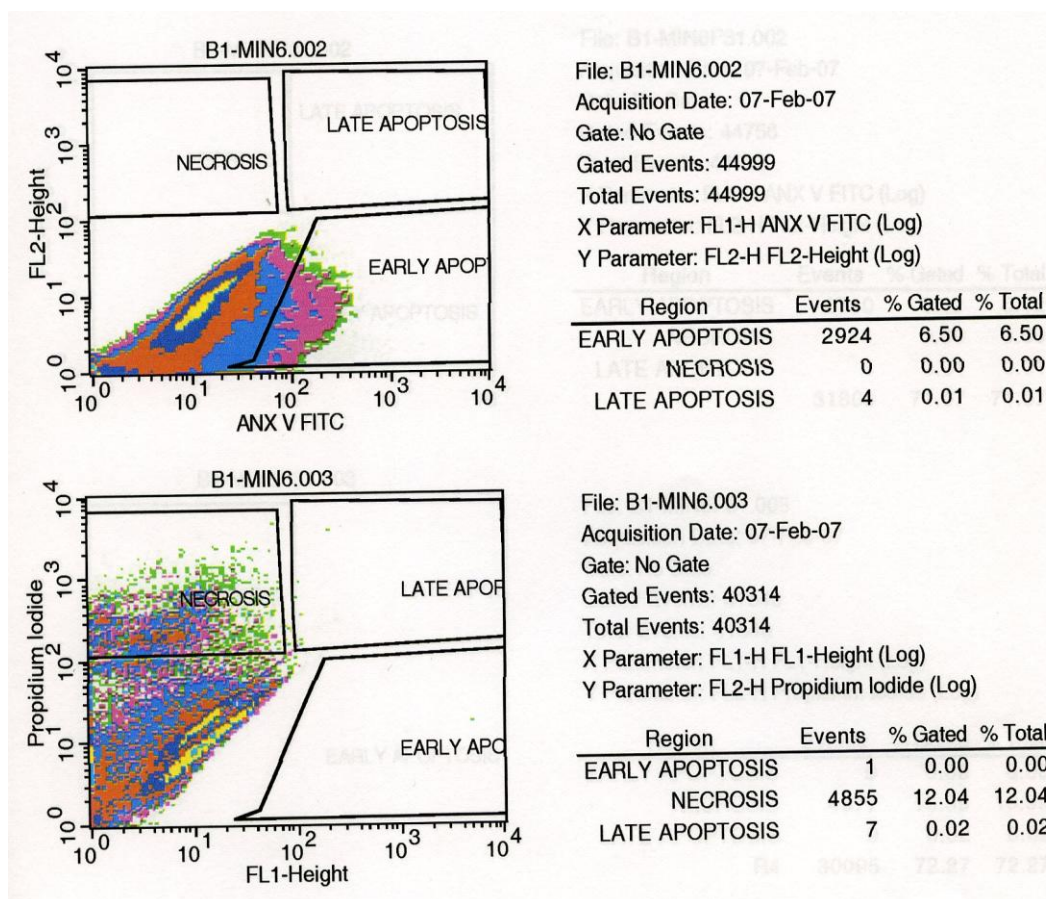


Fig.14: analisi al citofluorimetro di cellule apoptotiche (sopra) e necrotiche (sotto) in una linea Min6

Per questo motivo, gli esperimenti sono stati infine condotti sulla linea HEK293

precedentemente utilizzata per gli esperimenti di ER-stress.

In tre esperimenti indipendenti di citofluorimetria a flusso a 24 ore dalla trasfezione è stato misurato un aumento di 4 volte nel contenuto di Annexin V in cellule HEK293 trasfettate con insulina L<sup>B15</sup>Y<sup>B16</sup>delinsH (vd figura 15). A questo proposito va ricordato come la misurazione della sola Annexin V rifletta l'entità degli eventi precoci dell'apoptosi, mentre per avere una misura dell'apoptosi tardiva si devono prendere in considerazione gli eventi citofluorimetrici aventi positività sia per l'Annexina V che per il Propidio Ioduro. Il presente saggio è stato ripetuto con tutti i mutanti insulina a disposizione, modificando più volte il momento di raccolta delle cellule (24, 48, e 72 ore) ma non sono state trovate differenze significative tra le cellule trasfettate con l'insulina wt e quelle trasfettate con le insuline mutate, compresa quella recante la mutazione h-Akita.

Per la misurazione degli eventi tardivi dell'apoptosi cellulare, si è fatto ricorso al saggio del propidio ioduro. Con questo saggio abbiamo riscontrato un aumento significativo dell'apoptosi cellulare in HEK293 trasfettate con i costrutti L<sup>B15</sup>Y<sup>B16</sup>delinsH e C<sup>A6</sup>Y a 24 ore dalla trasfezione rispetto al controllo (vd figura 15). Anche in questo caso non è stata invece trovata nessuna differenza significativa tra l'apoptosi indotta dagli altri costrutti mutati e i controlli, nonostante il saggio sia stato ripetuto per diversi tempi di raccolta. Quest'assenza di induzione apoptotica per alcuni mutanti potrebbe essere imputabile a un limite tecnico dei saggi utilizzati che non sarebbero in grado di evidenziare un effetto apoptotico debole, causato da una minor "incisività" di alcune mutazioni rispetto alla L<sup>B15</sup>Y<sup>B16</sup>delinsH e alla C<sup>A6</sup>Y. Va sottolineato come questo dato sia in perfetto accordo con l'esordio molto precoce del diabete nel paziente con la mutazione L<sup>B15</sup>Y<sup>B16</sup>delinsH (Kindred D).



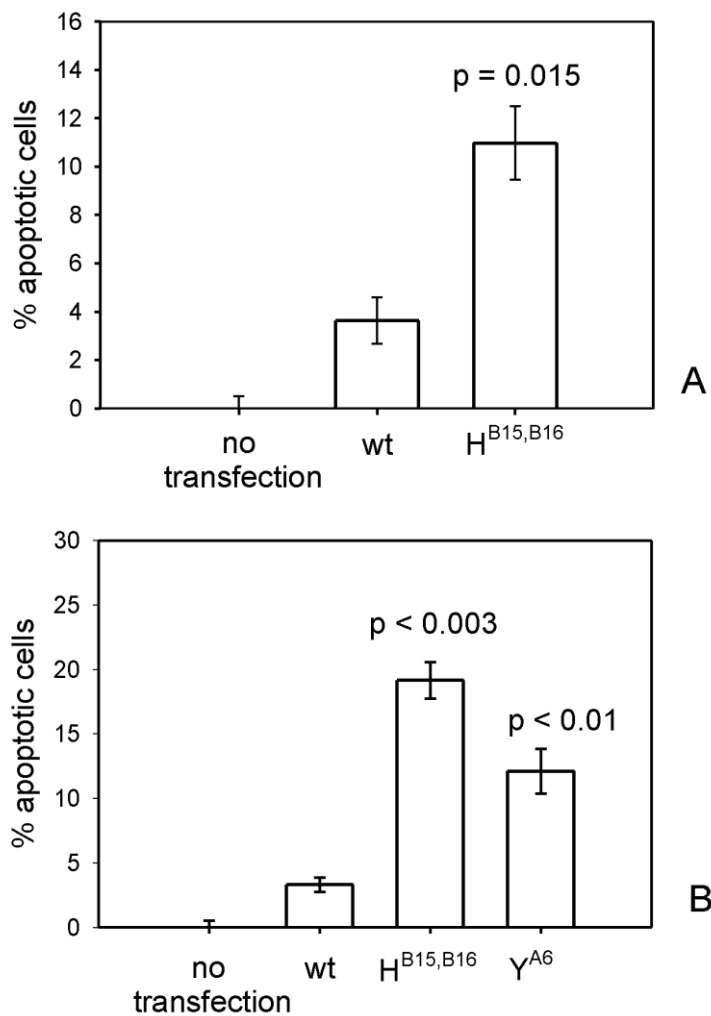


Fig. 15 Saggi dell'Annexin V e del Propidio Ioduro. Percentuale di cellule apoptotiche in HEK293 trasfettate con i costrutti di insulina wt e mutata calcolate mediante citofluorimetria tramite il saggio dell'Annexin V (A) e il saggio del Propidio Ioduro (B)

Presi tutti insieme, questi dati suggeriscono che almeno alcuni mutanti, oltre a essere difettivi nella produzione e secrezione di insulina, sono in grado di compromettere la vitalità  $\beta$ -cellulare mediante un meccanismo di proteotossicit .

### **Parte 3: screening per mutazioni in tipe 1 like pazienti diabetici**

La scoperta che mutazioni nel gene INS possono portare a forme di diabete monogenico, unitamente al fatto che in questi casi l'esordio può avvenire ben oltre il limite dei 6 mesi entro il quale il diabete non può essere imputabile a una reazione autoimmune, ci ha portato a riconsiderare i numerosi casi di diabete di tipo 1 diagnosticati su base clinica ma negativi per autoanticorpi.

Grazie a una collaborazione con il dott. Bonfanti dell'Ospedale S.Raffaele di Milano sono state riviste le cartelle cliniche di 326 pazienti con diabete ad esordio entro il 18° anno di età. Di questi, 24 sono risultati negativi ai 4 autoanticorpi comunemente usati (ICA, GADA, IA-2A, IAA). 4 di questi sono stati esclusi in quanto presentavano diabete di tipo 2 nell'adolescenza. Dei rimanenti 20 sono stati presi in considerazione solo quelli che presentavano il diabete come unica caratteristica clinica e sono stati analizzati per la presenza di un quinto autoanticorpo recentemente indentificato (ZnT8A) (57). Questa procedura di selezione è riassunta in tabella 2.

Il DNA dei 7 pazienti selezionati in questo modo è stato sottoposto a sequenziamento nucleotidico del gene INS. Interessantemente, due di questi sette pazienti hanno evidenziato le mutazioni eterozigoti mostrate in figura 16 che portano ai cambi aminoacidici G<sup>B8</sup>S e A23S (localizzata sul signal peptide). Ambedue le mutazioni sono *de novo* e non sono state riscontrate in un pool di ~ 200 individui normoglicemici.

#### **Caratteristiche cliniche**

Il paziente con la mutazione G<sup>B8</sup>S è nato alla 39° settimana di gestazione con un peso alla nascita di 2770g. Al momento dell'esordio del diabete aveva 2 anni e 10 mesi, era magro (BMI=16) e mostrava ancora un livello misurabile di C-peptide (0,49ng/ml) che è rimasto tale, anche se più basso, due anni dopo la diagnosi (0,34ng/ml). Al momento ha 6 anni e viene trattato con insulina 0,7 U/Kg/d con HbA1C di 8,7%.

Il paziente con la mutazione A23S (peso alla nascita = 3,350g) ha mostrato i primi sintomi tipici del diabete (poliuria, polidipsia) all'età di 6 anni e 8 mesi e un HbA1C =

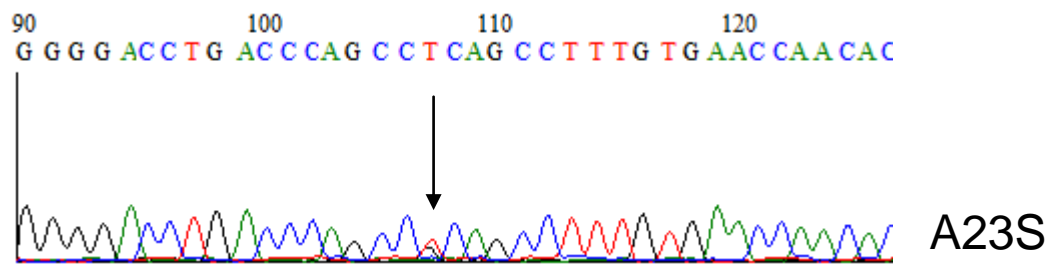
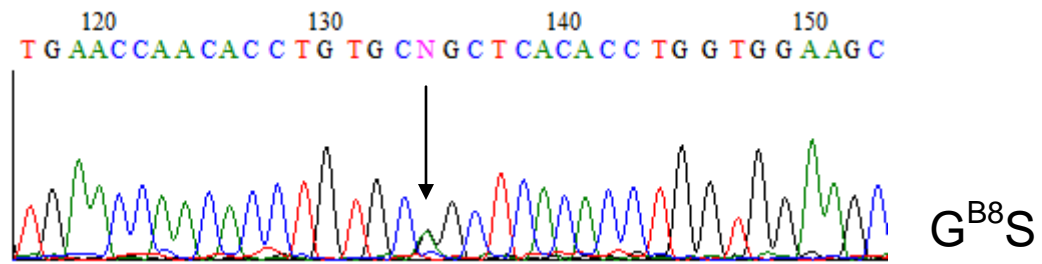
11%. Il trattamento insulinico è stato continuo per i primi 6 mesi. Per i successivi due anni è stato invece più volte interrotto e ripreso, in quanto il paziente presentava un comportamento analogo alla cosiddetta "luna di miele" tipica dei pazienti diabetici di tipo 1 (45). Il C-peptide misurato 11 e 24 mesi dopo l'esordio dell'iperglicemia è stato rispettivamente di 1,32 e 0,7 ng/ml. Attualmente il paziente ha 10 anni e viene trattato con insulina alla dose di 0,17 U/Kg/d con un HbA1C di 6,4%.

Clinical diagnosis (total cases 2003-2006: 326)	Type 1 diabetes	Type 2 diabetes	HNF1 beta (MODY 5)	Wolfram syndrome	Post CMV infection	Other	Monogenic diabetes in isolation
Number of patients	308	4	2	3	1	1	7
T1D autoantibodies (ICA, GADA, IA-2A, IAA, ZnT8*)	At least 1	None	None	None	None	None	None
BMI	Not considered	>90 centile	Normal, low	Normal, low	Normal, low	Normal, low	Normal, low
C-peptide (ng/ml)	low-undetectable	>1.5§	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	Low, normal or high
Age range at diagnosis of diabetes	1-18y	12-15y	12-14y	10-14y	13y	14y	2y, 7m-15y, 4m
Features other than diabetes	none	Hypertension, dislipidemia	Renal disease. Pancreas hypoplasia at ultrasound or NMR. Abnormal liver enzymes.	Optic atrophy/ diabetes insipidus/ deafness.	Documented perinatal CMV infection, growth retardation, deafness.	Dismorphia	none

Tabella 2: criteri clinici usati per la classificazione dei nuovi casi di diabete con esordio durante l'infanzia/adolescenza

Note \* quattro pazienti sono negativi per ICA, GADA, IA-2A e IAA ma positivi per ZnT8A. § Almeno 2 misurazioni a distanza di 6 mesi. NMR = risonanza magnetica nucleare. CMV = citomegalovirus

Fig. 16: Nuove mutazioni nel gene INS.



## DISCUSSIONE:

Un livello insolitamente alto di proinsulina circolante è stato più volte misurato in soggetti con elevati livelli plasmatici di insulina immunoreattiva ma normalmente insulino-sensibili (32, 33, 36) . Tali pazienti con iperproinsulinemia familiare sono solitamente diagnosticati in età adulta quando mostrano un diabete modesto, con una diminuita tolleranza al glucosio e rari episodi di ipoglicemia.

Mutazioni nel gene codificante per l'insulina umana sono state identificate per la prima volta nel 1979 e riguardavano un caso di iperinsulinemia familiare (31) con sviluppo di diabete di tipo 2 in età adulta. Successivamente a questo, sono stati individuati casi analoghi che hanno portato alla scoperta di un totale di 7 mutazioni, l'ultima delle quali nel 1997. In tutti questi casi di iperinsulinemia e iperproinsulinemia familiare i difetti genetici introdotti dalla mutazione comportano alterazioni nel legame dell'insulina col suo recettore ( $F^{B25}L$ ,  $F^{B24}S$  e  $V^{A3}L$ ) (31, 32, 33) oppure il mancato distacco del C-peptide dalla catena  $\alpha$  ( $R65L$ ,  $R65H$  e  $R65P$ ). Un caso a parte è invece costituito dalla mutazione  $H^{B10}D$  (34) in cui il paziente ha evidenziato un esordio del diabete decisamente più precoce rispetto agli altri casi (12 anni) e per il quale è stata formulata l'ipotesi di un difetto nell'impacchettamento dell'insulina nei granuli. In ognuno di questi casi è stato comunque rilevata la presenza in circolo dell'insulina mutata.

Sulla base di questi dati (e sull'ovvia importanza rivestita dall'insulina nel metabolismo del glucosio) si sono succeduti nel corso degli anni diversi screening per mutazioni nel gene dell'insulina su numerose e ben documentate casistiche di pazienti affetti da diabete di tipo 2 (38, 39) che però non hanno portato all'identificazione di alcuna associazione tra il gene INS e il T2D.

Nella prima parte del nostro studio abbiamo portato alla luce per la prima volta nuove mutazioni nel gene dell'insulina responsabili, a differenza di quelle già presenti in letteratura, del diabete neonatale permanente. E' interessante notare come alcune delle mutazioni da noi identificate introducano una disparità nel numero delle cisteine dell'insulina ( $Y^{A19}X$ ,  $R65C$ ,  $C^{A6}Y$ ), mentre le altre siano causa probabile di distorsione della struttura secondaria dell'insulina, vista la natura degli aminoacidi coinvolti

(L<sup>B15</sup>Y<sup>B16</sup>delinsH, L<sup>B6</sup>P, L<sup>B6</sup>V e L<sup>B11</sup>P). In ogni caso, abbiamo fornito prove sperimentali che l'insulina così mutata si accumula nel reticolo endoplasmatico esercitando un effetto proteotossico nelle  $\beta$ -cellule pancreatiche, dando così spiegazione del meccanismo di malattia. Tutto ciò ci ha permesso di accostare questa forma di diabete ad altre patologie, come l'Alzheimer o il Parkinson, causate da ER-stress. Inoltre, sulla base dell'età di esordio del diabete in alcuni casi da noi analizzati, suggeriamo che venga rivista la definizione di PNDM in una più generale definizione di *monogenic diabetes of infancy* (MDI). I risultati ottenuti sono stati meritevoli di pubblicazione sul *Journal of Clinical Investigation* (58).

Partendo da un casistica iniziale di 37 casi di PNDM, selezionati per l'assenza di autoanticorpi specifici per il diabete di tipo 1, abbiamo prima attribuito 19 casi (51,3%) a mutazioni nel gene KCNJ11 (già identificato come responsabile di PNDM) e successivamente 9 casi (24,3%) a mutazioni nel gene INS, facendo quindi di questo il secondo gene causativo per PNDM in termini di frequenza di casi. Questo ha permesso in primo luogo di valutare le differenze cliniche dei mutanti INS rispetto ai mutanti KCNJ11 che, riassunte brevemente, sono:

#### Mutanti KCNJ11:

- 1) basso peso alla nascita
- 2) esordio sempre entro i primi 6 mesi di vita
- 3) ritardo nello sviluppo motorio e/o intellettuale nel ~50% dei casi
- 4) possibilità di sostituzione del trattamento insulinico con un trattamento con antiproliferanti orali (sulfaniluree)

#### Mutanti INS:

- 1) peso alla nascita normale
- 2) esordio dal primo mese al settimo anno di età almeno
- 3) non associato ad altre patologie
- 4) svezzamento da insulina non possibile allo stato attuale delle conoscenze

E' importante inoltre notare come mutanti insulina si possano trovare "nascosti" tra pazienti classificati come T1D su base clinica ma risultati negativi agli autoanticorpi. Nel nostro caso 2 pazienti su 7 sono risultati in realtà essere mutanti INS. Anche in questo caso i risultati raggiunti sono stati meritevoli di pubblicazione su *Diabetes Care* (59).

Questa scoperta può avere importanti ripercussioni sulla correttezza e completezza della diagnosi, soprattutto in ambito di counseling genetico (un affetto PNDM ha infatti il 50% di possibilità di generare un figlio a sua volta affetto). A differenza però dei mutanti in KCNJ11, per i mutanti in INS non sono al momento disponibili ricadute terapeutiche immediate e l'iniezione di insulina rimane l'unico trattamento possibile. Bisogna però ricordare che i soggetti PNDM sono i migliori candidati per il trapianto di isole pancreatiche in quanto non presentano gli autoanticorpi tipici del T1D. Non si può inoltre escludere che in futuro venga messa a punto una terapia genica, sufficientemente sicura ed efficace, volta a silenziare l'allele INS mutato prima che sopraggiunga l'apoptosi  $\beta$ -cellulare.

Va infine aggiunto che al momento non sono note differenze nello sviluppo di complicanze a lungo termine tra i mutanti INS e i T1D ma non è escluso che se ne possano presentare. Seguire il quadro clinico dei soggetti PNDM permetterà di rispondere a questa domanda.

Mentre il nostro lavoro era in fase di pubblicazione, altri gruppi di ricerca hanno indipendentemente identificato mutazioni nel gene INS in pazienti affetti da PNDM arrivando alle nostre stesse conclusioni (nonostante non abbiano prodotto alcun dato funzionale) (60-63). Alcune mutazioni riportate sono identiche alle nostre mentre altre sono state descritte per la prima volta. Nella tabella sottostante vengono ricapitolate tutte le mutazioni finora trovate nel gene INS, comprese quelle non causative per il PNDM.

cDNA location	Protein location	Phenotype	Nucleotide & sistematic name	Mutated insulin nomenclature		
				Original	Standard	HGVS
Exon 2	Signal peptide	Mody	c.16C>T	R6C	R6C	p.Arg6Cys
Exon 2	Signal peptide	PNDM/MDI	c.67G>T	A23S	A23S	p.Ala23Ser
Exon 2	Signal peptide	PNDM/MDI	c.71 C>A	A24D	A24D	p.Ala24Asp
Exon 2	β-chain	PNDM/MDI	c.85C>G	H <sup>B5</sup> D	H29D	p.Hys29Asp
Exon 2	β-chain	PNDM/MDI	c.89T>C	L <sup>B6</sup> P	L30P	p.Leu30Pro
Exon 2	β-chain	PNDM/MDI	c.88C>G	L <sup>B6</sup> V	L30V	p.Leu30Val
Exon 2	β-chain	PNDM/MDI	c.94G>A	G <sup>B8</sup> S	G32S	p.Gly32Ser
Exon 2	β-chain	PNDM/MDI	c.94G>C	G <sup>B8</sup> R	G32R	p.Gly32Arg
Exon 2	β-chain	hyperproinsulinemia	c.100C>G	H <sup>B10</sup> D (Providence)	H34D	p.Hys34Asp
Exon 2	β-chain	PNDM/MDI	c.104T>C	L <sup>B11</sup> P	L35P	p.Leu35Pro
Exon 2	β-chain	PNDM/MDI	c.[114T>A; 116_118delTCT]	L <sup>B15</sup> Y <sup>B16</sup> delinsH	L39Y40delinsH	p.Lys15_Tyr16delinsHis
Exon 2	β-chain	PNDM/MDI	c.127 T>G	C <sup>B19</sup> G	C43G	p.Cys43Gly
Exon 2	β-chain	PNDM/MDI	c.137 G>A	R <sup>B22</sup> Q	R46Q	p.Arg46Gln
Exon 2	β-chain	PNDM/MDI	c.140 G>T	G <sup>B23</sup> V	G47V	p.Gly47Val
Exon 2	β-chain	Diabetes/ hyperinsulinemia	c.143T>C	F <sup>B24</sup> S (Los Angeles)	F48S	p.Phe48Ser
Exon 2	β-chain	PNDM/MDI	c.143T>G	F <sup>B24</sup> C	F48C	p.Phe48Cys
Exon 2	β-chain	Diabetes/ hyperinsulinemia	c.147C>G	F <sup>B25</sup> L (Chicago)	F49L	p.Phe49Leu
Exon 2	RR junction	PNDM/MDI	c.163 C>T	R31C	R55C	p.Arg55Cys
Exon 3	C-peptide	Mody or rare nonfunctional variant	c.202C>A	L44M	L68M	p.Leu68Met
Exon 3	C-peptide	PNDM/MDI	c.250G>A	G60R	G84R	p.Gly84Arg
Exon 3	KR junction	PNDM/MDI	c.265C>T	R65C	R89C	p.Arg89Cys
Exon 3	KR junction	Hyperproinsulinemia	c.266G>A	R65H (proinsulin Tokyo)	R89H	p.Arg89Hys
Exon 3	KR junction	Hyperproinsulinemia	c.266G>T	R65L (proinsulin Kyoto)	R89L	p.Arg89Leu



Exon 3	KR junction	Hyperproinsulinemia	c.266G>C	R65P	R89P	p.Arg89Pro
Exon 3	$\alpha$ -chain	PNDM/MDI	c.268 G>T	G <sup>A1</sup> C	G90C	p.Gly90Cys
Exon 3	$\alpha$ -chain	Hyperinsulinemia	c.274G>T	V <sup>A3</sup> L	V92L	p.Val92Leu
Exon 3	$\alpha$ -chain	PNDM/MDI	c.284 G>A	C <sup>A6</sup> Y	C95Y	p.Cys95Tyr
Exon 3	$\alpha$ -chain	PNDM/MDI	c.287 G>A	C <sup>A7</sup> Y	C96Y	p.Cys96Tyr
Exon 3	$\alpha$ -chain	PNDM/MDI	c.287 G>C	C <sup>A7</sup> S	C96S	p.Cys96Ser
Exon 3	$\alpha$ -chain	PNDM/MDI	c.302 C>G	S <sup>A12</sup> C	S101C	p.Ser101Cys
Exon 3	$\alpha$ -chain	PNDM/MDI	c.308A>G	Y <sup>A14</sup> C	Y103C	p.Tyr103Cys
Exon 3	$\alpha$ -chain	PNDM/MDI	c.323 A>G	Y <sup>A19</sup> C	Y108C	p.Tyr108Cys
Exon 3	$\alpha$ -chain	PNDM/MDI	c.324C>G	Y <sup>A19</sup> X	Y108X	p.Tyr108X

Come già sottolineato, i nostri esperimenti hanno chiarito che l'insulina mutata è in grado di causare ER-stress e apoptosi  $\beta$ -cellulare. Nonostante questo, molteplici interrogativi rimangono aperti se si vanno ad indagare i meccanismi intimi di questo processo. Innanzitutto non è chiaro se le mutazioni comportino uno stress di tipo ossidativo, con alterazione dello stato red/ox nell'ER data la presenza di gruppi tiolici liberi in alcune mutazioni, oppure se lo stress sia indotto semplicemente dall'ingombro sterico (overloading) delle proteine misfoldate. Esperimenti preliminari di Western Blot paiono invece escludere la possibilità che si formino doppietti di insulina legati dalle cisteine disaccoppiate (data not shown). E' possibile che mutazioni differenti causino ER-stress tramite meccanismi molecolari differenti e che abbiano una grossa responsabilità nel determinare la maggiore o minore gravità del fenotipo diabetico. Questa affermazione appare abbastanza evidente se si considera in particolare la mutazione A23S. Tale mutazione cade nel signal peptide dell'insulina e dovrebbe pertanto essere rimossa al momento della traduzione del messaggero dando origine a una insulina perfettamente normale. Simulazioni al computer tendono inoltre ad escludere un ruolo importante della A23 nel taglio proteolitico successivo all'import nel reticolo (vd fig. 17). Invece anche questa mutazione causa l'insorgere del fenotipo diabetico, sebbene l'esordio sia quello più tardivo da noi riscontrato (~7 anni). Pertanto il meccanismo di malattia in questo caso rimane tutt'ora oggetto di discussione.

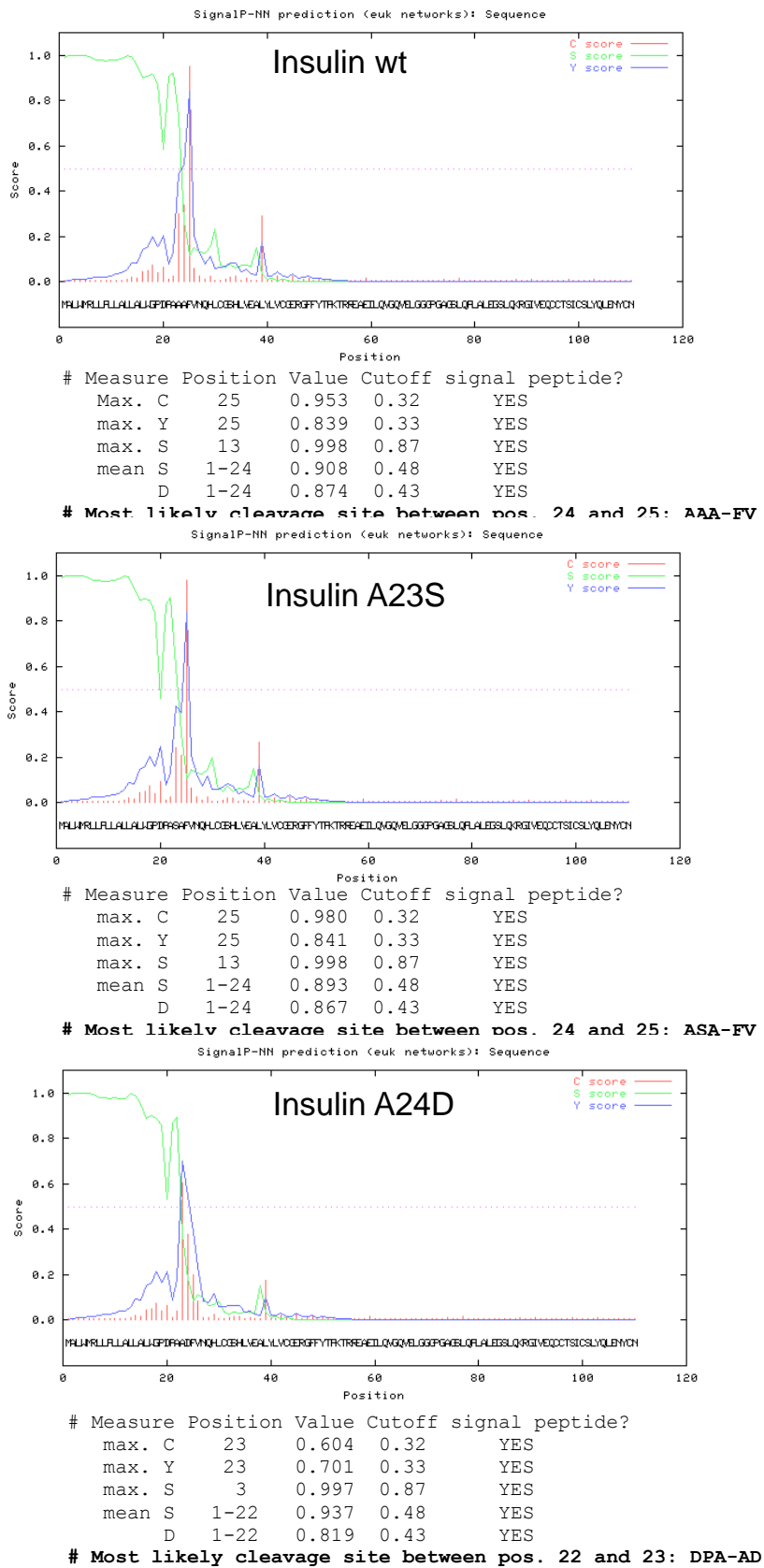


Fig.17: predizione di taglio proteolitico per i mutanti A23S e A24D

Tutto ciò potrebbe avere ripercussioni su eventuali terapie future. Sono infatti allo studio in diversi laboratori di ricerca le potenzialità delle cosiddette "chemical chaperones" (64, 65), molecole in grado di incrementare i processi di folding proteico. Tali molecole potrebbero rivelarsi pertanto utili nel caso di stress da overloading proteico, mentre sarebbero presumibilmente inutili per uno stress di tipo ossidativo. Non va ovviamente dimenticato che anche il corredo genetico di ogni singolo individuo riveste un'importanza cruciale nel definire la gravità del fenotipo clinico. Questo appare tanto più evidente se si vanno guardare i due casi familiari di mutazione insulina da noi scoperti, in cui la differenza nell'età di esordio del diabete tra genitori e figli è nell'ordine degli anni.

Per concludere, i risultati illustrati in questo lavoro di dottorato aprono interessanti prospettive da svilupparsi in futuri progetti di ricerca.

Innanzitutto la disponibilità di un sistema murino con mutazione spontanea nel gene dell'insulina (topo Akita), permetterà di investigare su quali fattori si attivino *in vivo* in condizioni di ER-stress, in che modo questo avvenga e come da questa condizione si passi all'apoptosi  $\beta$ -cellulare. Inoltre, il topo Akita potrà costituire un ottimo modello per testare nuove terapie volte a rigenerare le  $\beta$ -cellule perdute e/o a rallentarne la scomparsa, siano esse di tipo farmacologico (ad es. trattamento con exendin-4) o genetico (silenzamento tramite terapia genica dell'allele mutato).

In secondo luogo, lo studio mirato sui singoli mutanti insulina potrà rivelare quali risposte siano indotte nella cellula da ogni mutante. Particolarmente meritevole di studio potrebbe essere, data la mancanza di riferimenti bibliografici a riguardo e la presenza di residui tiolici liberi nei mutanti, il ruolo svolto dalle molteplici "disulfide isomerase" nel folding dell'insulina in condizioni di ER-stress.

Per concludere, il nostro lavoro ha infine permesso di ridurre significativamente la percentuale di PNDM non diagnosticati a circa il 20% del totale avvicinandoci sempre più all'ideale traguardo del 100% di diagnosi molecolare per il diabete neonatale. Continuare ad identificare i geni responsabili anche di questa quota è pertanto un passo imprescindibile per il prossimo futuro e potrebbe avere ripercussioni importanti anche

per quanto riguarda la nostra conoscenza del diabete di tipo 2.

## RIASSUNTO

Il Diabete Neonatale Permanente (PNDM) è una rara patologia che vede l'insorgere di un fenotipo diabetico entro in primi 6 mesi di vita. Al momento di iniziare questo Dottorato di Ricerca sono noti solo alcuni geni responsabili del PNDM. Da un punto di vista di frequenza di casi attribuibili, i più rilevanti sono KCNJ11 e SUR1 entrambi codificanti per una porzione del canale del K<sup>+</sup> della  $\beta$ -cellule pancreatiche. Pazienti recanti mutazioni in questi geni possono essere svezzati dalla classica terapia insulinica e iniziare una terapia a base di sulfaniluree.

Nel nostro laboratorio abbiamo selezionato una casistica di pazienti PNDM e ne abbiamo sequenziato il gene dell'insulina per verificare se recasse mutazioni. In questo modo abbiamo identificato 7 mutazioni eterozigoti diverse nel gene dell'insulina in 9 pazienti (con l'aggiunta di due casi familiari), per una frequenza pari a ~25% dei casi di PNDM.

Mediante studi funzionali *in vitro* abbiamo successivamente dimostrato che tali mutazioni sono in grado di indurre stress da reticolo endoplasmatico che causa a sua volta apoptosi  $\beta$ -cellulare. In questo modo siamo stati i primi a provare che le mutazioni nel gene dell'insulina sono direttamente responsabili del PNDM.

In un secondo tempo abbiamo ricercato le medesime mutazioni in una casistica di pazienti diagnosticati clinicamente come diabetici di tipo 1 ma per i quali non è mai stata trovata positività per nessun autoanticorpo. Anche in questo caso abbiamo trovato 2 mutanti insulina su 7 pazienti selezionati, contribuendo quindi in modo determinante ad una corretta diagnosi.

Contrariamente a quanto accade nel caso dei mutanti in KCNJ11 e SUR1, i mutanti nel gene dell'insulina non possono essere curati con antidiabetici orali e la ricaduta principale e più immediata della nostra scoperta coinvolge il campo del counseling genetico, anche se non è da escludere il futuro impiego di terapie che sono solo sperimentali al momento (trapianto di isole, terapia genica, rigenerazione cellulare).

Infine i nostri risultati confermano una volta di più quanto sia stretta la relazione tra lo stress da reticolo endoplasmatico nelle  $\beta$ -cellule pancreatiche e il diabete, relazione

che è apparsa sempre più evidente negli ultimi anni specialmente per quanto riguarda il diabete di tipo 2. Studiare una condizione estrema ma rara come il PNDM può quindi fornire importanti informazioni anche riguardo una patologia numericamente più rilevante come il diabete di tipo 2.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Polak, M., and Shield, J.: Neonatal and very-early onset diabetes mellitus. *Semin. Neonatol.* 9:59–65, 2004.
- 2) Polak M, Cavé H. Neonatal diabetes mellitus: a disease linked to multiple mechanisms. *Orphanet J Rare Dis.* 9;2-12, 2007
- 3) Shimomura K.: The K(ATP) channel and neonatal diabetes. *Endocr J.* 56:165-75, 2009
- 4) Proks P, *et al.*: Molecular basis of Kir6.2 mutations associated with neonatal diabetes or neonatal diabetes plus neurological features. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 17539 –17544, 2004
- 5) Masia R, *et al.*: An ATP-binding mutation (G334D) in KCNJ11 is associated with a sulfonylurea-insensitive form of developmental delay, epilepsy, and neonatal diabetes. *Diabetes.* 56:328-36, 2007
- 6) Cavé H, *et al.* Refinement of the 6q chromosomal region implicated in transient neonatal diabetes.. *Diabetes.* 49:108-13, 2000
- 7) Flanagan SE, *et al.* Mutations in ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel genes cause transient neonatal diabetes and permanent diabetes in childhood or adulthood. *Diabetes* 56:1930-7, 2007
- 8) Gloyn AL, *et al.*: Relapsing diabetes can result from moderately activating mutations in KCNJ11. *Hum Mol Genet* 14:925–934, 2007
- 9) Colombo, C., *et al.*: Transient neonatal diabetes mellitus is associated with a

recurrent (R201H) KCNJ11 (KIR6.2) mutation. *Diabetologia*. 48:2439–2441, 2005

10) Gloyn, A.L., *et al.* Activating mutations in the ATP-sensitive potassium channel subunit Kir6.2 gene are associated with permanent neonatal diabetes. *N. Engl. J. Med.* 350:1838–1849, 2004

11) Massa, O., *et al.* KCNJ11 activating mutations in Italian patients with permanent neonatal diabetes. *Hum. Mutat.* 25:22–27, 2005

12) Babenko, A.P., *et al.* Activating mutations in the ABCC8 gene in neonatal diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 355:456–466, 2006

13) Pearson, E.R., *et al.* Switching from insulin to oral sulfonylureas in patients with diabetes due to Kir6.2 mutations. *N. Engl. J. Med.* 355:467–477, 2006

14) Tonini, G., *et al.* Sulphonylurea treatment outweighs insulin therapy in short-term metabolic control of patients with permanent neonatal diabetes mellitus due to activating mutations of the KCNJ11 (Kir6.2) gene. *Diabetologia*. 49:2210–2213, 2006

15) Hattersley, A.T., and Ashcroft, F.M. Activating mutations in Kir6.2 and neonatal diabetes. New clinical syndromes, new scientific insights, and new therapy. *Diabetes*. 54:2503–2513, 2005

16) Masia, R., *et al.* An ATP-binding mutation (G334D) in KCNJ11 is associated with a sulfonylurea-insensitive form of developmental delay, epilepsy, and neonatal diabetes. *Diabetes*. 56:328–336, 2007

17) Fournet JC, Junien C. The genetics of neonatal hyperinsulinism. *Horm Res.* 2003;59 Suppl 1:30-4.

18) Bitner-Glindzicz M, *et al.* A recessive contiguous gene deletion causing infantile



hyperinsulinism, enteropathy and deafness identifies the Usher type 1C gene. *Nat Genet.* 26:56-60, 2000

19) Njølstad PR, *et al.* Neonatal diabetes mellitus due to complete glucokinase deficiency. *N Engl J Med.* 344:1588-92, 2001

20) Stoffers, D.A., *et al.* Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat. Genet.* 15:106–110, 1997

21) Delepine, M., *et al.* EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2- $\alpha$  kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat. Genet.* 25:406–409, 2000

22) Seneé, V., *et al.* Wolcott-Rallison syndrome. Clinical, genetic and functional study of EIF2AK3 mutations and suggestion of genetic heterogeneity. *Diabetes.* 53:1876–1883, 2004

23) Bennet, C.L., *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* 27:20–21, 2001

24) Sellick, G.S., *et al.* Mutations in PTF1A cause pancreatic and cerebellar agenesis. *Nat. Genet.* 36:1301–1305, 2004.

25) Seneé, V., *et al.* Mutations in GLIS3 are responsible for a rare syndrome with neonatal diabetes mellitus and congenital hypothyroidism. *Nat. Genet.* 38:682–687, 2006

26) Boam DS, Clark AR, Docherty K. Positive and negative regulation of the human insulin gene by multiple trans-acting factors. *J Biol Chem.* 265:8285-96, 1990

27) Vafiadis P, *et al.* Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR

alleles at the IDDM2 locus. *Nat Genet.* 15:289-92, 1997

28) Kennedy GC, German MS, Rutter WJ. The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription. *Nat Genet.* 9:293-8, 1995

29) Královicová J, *et al.* Variants in the human insulin gene that affect pre-mRNA splicing: is -23HphI a functional single nucleotide polymorphism at IDDM2? *Diabetes.* 55:260-4, 2006

30) Marchand L, Polychronakos C. Evaluation of polymorphic splicing in the mechanism of the association of the insulin gene with diabetes. *Diabetes.* 56:709-13, 2007

31) Tager H, *et al.* A structurally abnormal insulin causing human diabetes. *Nature* 281:122-5, 1979

32) Nanjo K, *et al.* Diabetes due to secretion of a structurally abnormal insulin (insulin Wakayama) *J Clin Invest* 77:514-9, 1986

33) Haneda M, *et al.* Studies on mutant human insulin genes: Identification and sequence analysis of a gene encoding (SerB24)insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:6366-70, 1983

34) Gruppuso PA, *et al.* Familial hyperproinsulinemia due to a proposed defect in conversion of proinsulin to insulin. *New Engl J Med* 311:629-34, 1984

35) Robbins DC, *et al.* A human proinsulin variant an arginine 65. *Nature* 291:679-81, 1981

36) Yano H, *et al.* A novel point mutation in the human insulin gene giving rise to hyperproinsulinemia (proinsulin Kyoto) *J Clin Invest* 89:1902-1907, 1992

- 37) Warren-Perry MG, *et al.* A novel point mutation in the human insulin gene giving rise to hyperproinsulinemia (proinsulin Kyoto) J Clin Endocrinol Metab 89:1902-7, 1992
- 38) Raben, N., *et al.* Normal coding sequence of insulin gene in Pima Indians and Nauruans, two groups with highest prevalence of type II diabetes. Diabetes. 40:118–122, 1991
- 39) Olansky, L., *et al.* Variability of the insulin gene in American blacks with NIDDM. Analysis by singlestrand conformational polymorphisms. Diabetes 41:742–749, 1992
- 40) Wang, J., *et al.* A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction in the Mody mouse. J. Clin. Invest.103:27–37, 1999
- 41) Herbach N, *et al.* Dominant-negative effects of a novel mutated Ins2 allele causes early-onset diabetes and severe beta-cell loss in Munich Ins2C95S mutant mice. Diabetes. 56:1268-76, 2007
- 42) Zuber, C., *et al.* Misfolded proinsulin accumulates in expanded pre-Golgi intermediates and endoplasmic reticulum subdomains in pancreatic beta cell of Akita mice. FASEB J. 18:917–919, 2004
- 43) Oyadomari, S., *et al.* Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stressmediated diabetes. J. Clin. Invest. 109:525–532, 2002
- 44) Ron, D. Proteotoxicity in the endoplasmic reticulum: lessons from the Akita diabetic mouse. J. Clin. Invest. 109:443–445, 2002.
- 45) Rhodes, C.J. Processing of the insulin molecule. In Diabetes Mellitus. A fundamental and clinical text. 3rd edition. D. LeRoith, S.I. Taylor, and J.M. Olefsky, editors. Lippincott, Williams & Wilkins. Philadelphia, Pennsylvania, USA. 27–50,

2004.

46) Liu, M., *et al.* Proinsulin disulfide maturation and misfolding in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 280:13209–13212, 2005

47) Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS J.* 274:630-58, 2007

48) Ni M, Lee AS. ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett.* 581:3641-51, 2007

49) Faitova J, *et al.* Endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Cell Mol Biol Lett.* 11:488-505, 2006

50) Szegezdi E, *et al.* Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 7:880-5, 2006

51) Ozcan U, *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* 306:457-61, 2004

52) Araki E, *et al.* Endoplasmic reticulum stress and diabetes mellitus. *Intern Med.* 42:7-14, 2003

53) Marzban L, *et al.* Processing of pro-islet amyloid polypeptide in the constitutive and regulated secretory pathways of beta cells. *Mol Endocrinol.* 19:2154-63, 2005

54) Gradwohl G, *et al.* Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:1607-11, 2000

55) Wang, J., *et al.* Mutant neurogenin-3 in congenital malabsorptive diarrhea. *New Eng. J. Med.* 355: 270-280, 2006.

- 56) Shao-Nian Yang and Per-Olof Berggren. Cell CaV channel regulation in physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:16-28, 2005.
- 57) Wenzlau JM, *et al.* The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17040-17045, 2007
- 58) Colombo C, *et al.* Seven mutations in the human insulin gene linked to permanent neonatal/infancy-onset diabetes mellitus. *J Clin Invest* 118:2148-56, 2008
- 59) Bonfanti R, *et al.* Insulin gene mutations as cause of diabetes in children negative for five type 1 diabetes autoantibodies *Diabetes Care*. 32:123-5, 2009
- 60) Støy, J., *et al.* Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:15040–15044, 2007
- 61) Edghill, E.L., *et al.* 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*. 57:1034–1042, 2008
- 62) Polak, M., *et al.* 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*. 57:1115–1119, 2008
- 63) Molven, A., *et al.* Mutations in the insulin gene can cause MODY and autoantibody-negative type 1 diabetes. *Diabetes*. 57:1131–1135, 2008
- 64) Bernier V, *et al.* Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases. *Trends Endocrinol Metab*. 15:222-8, 2004
- 65) Hansen PA, Waheed A, Corbett JA. Chemically chaperoning the actions of insulin.

