

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Mediche Generali e dei Servizi

Ciclo XXIX

Settore Concorsuale di afferenza: 06G1

Settore Scientifico disciplinare: MED 38

TITOLO TESI

**Diabete monogenico nell'età pediatrica:
nuovo approccio clinico-molecolare per una diagnosi
accurata ed un appropriato trattamento**

Presentata da: **Dott. Giulio Maltoni**

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Luigi Bolondi

Prof.ssa Laura Mazzanti

Esame finale anno 2017

Abstract

Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) is a genetically and clinically heterogeneous disorder characterized by early onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus (DM) and autosomal dominant inheritance. MODY was initially thought to be a rare form of DM, but the wide range of DM aetiologies and clinical pictures contribute to underestimate the MODY prevalence. Despite the clinical benefits of a proper molecular diagnosis for tailored treatment, patients monitoring and relative management, the most of MODY patients remain undiagnosed, also because of timing and costs of current genetic test approaches, and of the undiscovered causing genes. 16 patients diagnosed for suspected type 1 diabetes or with a failed diagnosis of MODY (MODY X) underwent the Next Generation Sequencing (NGS) panel investigation (15 genes involved in monogenic diabetes). 7 mutations in rare genes of monogenic diabetes were found in 6 patients (2 novel mutations, 1 defined as likely pathogenic and 5 already known). The development of novel tests based on next generation sequencing can allow a molecular diagnosis at affordable costs and timing, performing the simultaneous analysis of all known MODY genes and novel genes.

INTRODUZIONE

1 DEFINIZIONE DI MODY

Il diabete MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) indica un insieme di disordini delle cellule beta secernenti insulina dovuta ad alterazioni di un gruppo eterogeneo di geni (1). Rappresenta la forma più comune di diabete monogenico ed è generalmente caratterizzato dalla presenza di iperglicemia in soggetti normopeso, comparsa in età inferiore ai 25 anni, in assenza di autoimmunità e con evidenza di trasmissione ereditaria autosomica dominante (1).

Sono noti almeno 13 geni coinvolti nella patogenesi delle diverse forme di MODY (2).

Le principali forme di MODY sono GCK-MODY, HNF1A-MODY e HNF4A-MODY e rappresentano insieme dal 80-90 % dei casi identificati tramite indagine genetica (3,4).

1.1 PRINCIPALI FORME DI MODY

1.1.1 GCK-MODY (MODY2)

Mutazioni in eterozigosi inattivanti il gene per l'enzima glucokinasi (GCK) causano il GCK-MODY, caratterizzato da una lieve iperglicemia a digiuno che generalmente non necessita di farmaci e non porta allo sviluppo di complicanze a lungo termine. E' la forma più comune di diabete monogenico in Italia (5)

L'enzima glucokinasi è coinvolto nel primo passaggio del metabolismo intracellulare del glucosio, determinandone la fosforilazione in posizione 6 e quindi la trasformazione in glucosio-6-fosfato. L'enzima GCK è definito "sensore del glucosio", in quanto regola il rilascio di insulina alla concentrazione ematica di glucosio.

Una mutazione in eterozigosi di questo enzima provoca un'alterazione di questo processo, facendo sì che il rilascio di insulina avvenga per un valore soglia leggermente più elevato di glicemia rispetto al soggetto sano.

Una mutazione in omozigosi invece, determina una completa perdita di funzione dell'enzima che esita in un franco diabete insulino-dipendente ad esordio, generalmente, neonatale.

Le seguenti caratteristiche sono suggestive di GCK-MODY (6):

- iperglicemia lieve persistente con glicata a livelli normali/lievemente aumentati
- incremento della glicemia durante un carico orale di glucosio tra 0 minuti a 120 minuti inferiore 55 mg/dl
- autoanticorpi marcatori di diabete tipo 1 negativi
- C-Peptide persistentemente dosabile
- un genitore con lieve iperglicemia persistente

1.1.2 HNF1A-MODY (MODY3)

Mutazioni in eterozigosi nel gene HNF1A (Fattore Nucleare Epatocitario 1 Alfa) causa una forma di diabete a trasmissione autosomica dominante. Le iperglicemie possono essere marcate ed elevati i valori di emoglobina glicata; di fatto, se non trattato in maniera corretta, può, a differenza della forma da mutazione della GCK, portare allo sviluppo delle complicanze micro e macrovascolari a lungo termine del diabete.

HNF1A, insieme con HNF4A (Fattore di trascrizione Nucleare Epatocitario 4 Alfa) e HNF1B (Fattore di trascrizione Nucleare Epatocitario 1 Beta) sono fattori di trascrizione espressi in diversi tessuti dell'organismo che interagiscono per programmare l'espressione genica durante lo sviluppo embrionale. I fattori di trascrizione nucleare epatici nelle beta cellule mature oltre a regolare l'espressione di insulina, influenzano anche lo sviluppo, la proliferazione e la morte della cellula; infatti la ridotta proliferazione cellulare e l'aumento dell'apoptosi sono state proposte per spiegare il progressivo deterioramento della funzione beta cellulare che è caratteristica in questi pazienti (7).

Il diabete HNF1A-MODY si manifesta tipicamente nell'adolescente o nel giovane adulto (prima dei 25 anni di età) con glicosuria. Questi pazienti sono nati con glicemia normale, tendono ad essere normopeso e hanno normale sensibilità all'insulina. La glicosuria è causata da una bassa soglia renale per il glucosio probabilmente dovuta alla ridotta espressione del co-trasportatore sodio-

glucosio 2 (SGLT-2) e quindi ad una ridotta capacità di riassorbimento del glucosio a livello del tubulo prossimale.

I pazienti con HNF1A-MODY mostrano una spiccata sensibilità all'ipoglicemizzante orale sulfanilurea. E' stato dimostrato che l'impiego di questo farmaco sia in grado di determinare il raggiungimento di un controllo glicemico migliore di quanto ottenuto con la terapia insulinica (8).

Le seguenti caratteristiche sono suggestive di HNF1A-MODY (6)

- incremento della glicemia durante un carico orale di glucosio tra 0 minuti a 120 minuti superiore a 90 mg/dl
- autoanticorpi marcatori di diabete tipo 1 negativi
- C-Peptide persistentemente dosabile
- Normale/aumentato colesterolo HDL (>1.3mmol/L)
- Presenza di glicosuria per glicemie <180 mg/dl

1.1.3 HNF4A-MODY(MODY1)

Il diabete HNF4A-MODY si presenta in modo simile a HNF1A-MODY, in quanto anche in questo caso i pazienti hanno una disfunzione beta cellulare progressiva, dovuta ad un'alterazione in un fattore di trascrizione epatocitario nucleare. La sensibilità alla sulfoniluree è anche caratteristica di mutazioni HNF4A e una terapia con basse dosi di sulfonilurea deve essere considerata come la prima linea di trattamento. A differenza HNF1A-MODY, i pazienti con mutazioni HNF4A hanno ridotto le concentrazioni di colesterolo HDL, apolipoproteina e trigliceridi e spesso hanno aumentati i livelli di colesterolo LDL.

Le seguenti caratteristiche sono suggestive di HNF4A-MODY (6)

- incremento della glicemia durante un carico orale di glucosio tra 0 minuti a 120 minuti superiore a 90 mg/dl
- autoanticorpi marcatori di diabete tipo 1 negativi
- C-Peptide persistentemente dosabile
- Bassi livelli di HDL, trigliceridi, aumentati livelli di LDL
- macrosomia neonatale e/o ipoglicemia iperinsulinemica neonatale

1.2 FORME RARE DI MODY

1.2.1 IPF1-MODY (MODY4)

Il fattore promotore 1 dell'insulina è un fattore di trascrizione pancreatico e, come la famiglia HNF di fattori di trascrizione, regola lo sviluppo delle cellule beta e l'espressione del gene dell'insulina.

1.2.2 HNF1B-MODY (MODY5)

E' causato da mutazioni nel gene che codifica per il fattore di trascrizione HNF1B. Questo gene è espresso nel pancreas, reni, fegato, tratto genitale e nell'intestino e le mutazioni a suo carico sono una causa rara, ma fenotipicamente distinta, di MODY. La trascrizione è espressa nella prima fase dello sviluppo embrionale a livello di pancreas, rene, fegato e tratto genitale. I portatori della mutazione HNF1B possono presentare anomalie dello sviluppo in tutti questi organi (6)

1.2.3 NEUROD1-MODY (MODY6)

Mutazioni in eterozigosi del gene NEUROD1 (fattore di trascrizione elica-ansa-elica per la differenziazione neurogena 1) sono un'altra causa molto rara di MODY. Il gene NEUROD1 è coinvolta nella differenziazione neuronale, sviluppo di linee cellulari endocrino e regola la trascrizione di GLUT2, insulina e GCK (6)

1.2.4 KLF11 (MODY7)

amino acid changes in the human Kruppel-Like Factor (KLF) 11 protein is associated with the development of maturity onset diabetes of the young VII.

KLF11 in metabolic processes like insulin sensitivity, which regulation is critical in several forms of diabetes (9).

1.2.5 CEL-MODY (MODY8)

Il gene CEL codifica l'enzima lipasi estere-carbossilico (lipasi stimolata dai sali biliari) che viene prodotto dal pancreas e secreto nel tratto digestivo. Il suo ruolo fisiologico è nell'idrolisi del colesterolo e delle vitamine liposolubile e nel loro assorbimento da parte dell'intestino. La sua mutazione comporta lo sviluppo di un diabete monogenico associato ad alterazioni della funzionalità esocrina del pancreas (6).

1.2.6 PAX4-MODY (MODY9)

Le mutazioni nel gene Paired box 4 (PAX4) causano il MODY tipo 9 in seguito ad alterata regolazione delle cellule beta insulino-secernenti (10).

1.2.7 INS-MODY (MODY10)

Mutazioni dominanti nel gene INS sono la seconda causa più comune di diabete neonatale permanente (PNDM) con età variabile alla comparsa del diabete (6).

1.2.8 BLK-MODY (MODY11)

Mutazioni a carico del gene Kinasi dei linfociti B (BLK) possono provocare il MODY 11. Tale gene è un modulatore della sintesi e secrezione di insulina attivandone fattori di trascrizione chiave (11)

1.2.9 CANALI DEL POTASSIO (KATP) (MODY 12 e 13)

I geni ABCC8 e KCNJ11 codificano le subunità SUR1 e Kir6.2 del canale del potassio (KATP) in cellule beta pancreatiche che ha un ruolo diretto nella regolazione del rilascio dell'insulina. Rappresenta <1% dei casi di MODY.

Mutazioni attivanti nei geni coinvolti nel canale KATP causano diabete neonatale che si presenta nei primi sei mesi di vita e che può essere permanente (PNDM) o transitorio (TNDM). Entrambe le forme sono sensibili alle alte dosi di terapia con sulfonilurea.

Al contrario, mutazioni con perdita di funzione in ABCC8 e KCNJ11 sono la causa più comune di ipoglicemia iperinsulinemica congenita (CHI) (6).

1.2.10 APPL1-MODY (MODY 14)

il gene per la proteina adattatore, fosfotirosina Interaction, dominio PH, e cerniera di leucine contenente 1 (APPL1) che sono stati identificati mediante intero sequenziamento in due grandi famiglie con un'alta prevalenza di diabete non dovute a mutazioni in geni noti coinvolti nella Mody (MODY). APPL1 lega a AKT2, una molecola chiave nella via di segnalazione dell'insulina (12)

Recentemente sono stati riportati casi che presentavano caratteristiche fenotipiche confondenti, con sovrapposizione tra diverse forme di diabete monogenico ed autoimmune, mostrando in alcuni di questi anche la coesistenza di diverse forme di diabete (13).

1.3 EPIDEMIOLOGIA

Si ritiene che il MODY rappresenti circa il 1-4% di tutti i casi di diabete mellito (2,15).

Dati dello studio SEARCH (3) hanno riscontrato un'incidenza di 0.8% delle principali forme di MODY su una popolazione di 5963 bambini ed adolescenti con diabete in un ampio registro americano.

Lo studio SWEET (16) ha analizzato 27104 bambini ed adolescenti con diabete, riportando un'incidenza del 1.3% dei casi di diabete monogenico.

Una recente survey italiana su 3781 bambini consecutivamente afferiti a 15 centri di diabetologia pediatrica nel periodo compreso tra gennaio 2007 e dicembre 2012 ha riportato una prevalenza dei casi di MODY più elevata di quanto riportato finora, arrivando a 6.3% (3, 17).

I dati sulla prevalenza delle forme monogeniche di diabete risultano essere sottostimati; infatti, nonostante la maggior attenzione e conoscenza sull'argomento, diversi autori hanno dimostrato che una percentuale ancora predominante e variabile da 80 a 95% dei casi di MODY rimanga ancora misconosciuta (18), in quanto i quadri fenotipici, in grado di far nascere il sospetto negli operatori del settore, possono presentare diverse forme sfumate e sovrapponibili ad altre tipi di diabete (13, 19) o possono essere causati da geni ancora sconosciuti o che non vengono indagati routinariamente in quanto particolarmente rari e l'indagine genetica costosa.

1.4 DIAGNOSI

Perché è importante fare diagnosi?

Una diagnosi differenziale corretta tra diabete mellito tipo 1 (DMT1) e 2 (DMT2) e MODY è fondamentale, soprattutto per quei pazienti per cui la gestione medica può modificarsi in maniera significativa sulla base della comprensione del difetto molecolare sottostante la loro malattia con importanti ripercussioni sulla qualità di vita.

I principali vantaggi si trovano sia dal punto di vista clinico (per definire le modalità di follow-up, screening per le complicanze, counselling familiare) che terapeutico (scelta terapeutica tra un regime dietetico, ipoglicemizzanti orali, insulina) (20).

1.4.1 QUANDO PENSARCI?

I criteri clinici per formulare la diagnosi di diabete MODY sono i seguenti sebbene esistano poi situazioni particolari che possono sfuggire a questi criteri:

- età di insorgenza inferiore ai 25 anni;
- controllo metabolico senza necessità di insulina per oltre 2 anni dall'esordio;
- ereditarietà autosomica dominante (almeno 3 generazioni di soggetti affetti da diabete nell'albero genealogico familiare);-assenza di autoimmunità

I casi con fenotipo suggestivo per forme monogenica, ma senza mutazione individuata, vengono genericamente definiti MODY X.

Oltre ai casi che presentano le caratteristiche tipiche delle forme di diabete monogenico precedentemente elencate, il sospetto diagnostico di una forma genetica va sempre posto nei casi di apparente diabete tipo 1 o 2 che non presentino le classiche caratteristiche (2):

Dalle Linee Guida della Società internazionale di Diabetologia pediatrica e dell'adolescenza 2014:

Quando sospettare che una diagnosi di diabete di tipo 1 non sia corretta?

1. Diabete con comparsa prima dei 6 mesi di età (il diabete tipo 1 è estremamente raro in questa fascia di età)
2. Importante storia familiare di diabete in uno dei genitori e di altri parenti di primo grado
3. Assenza di autoanticorpi marcatori per diabete tipo 1
4. Riserva funzionale della β -cellula conservata (fase di remissione parziale estesa 5 anni dopo la diagnosi).

Quando sospettare che una diagnosi di diabete di tipo 2 non sia corretta?

Nei giovani, il diabete di tipo 2 si presenta spesso intorno alla pubertà e la maggior parte sono obesi.

1. L'assenza di obesità grave.
2. La mancanza di acanthosis nigricans e/o di altri marcatori della sindrome metabolica.
3. Etnia con una bassa prevalenza di diabete di tipo 2, ad esempio, caucasico europeo
4. Forte storia familiare di diabete senza obesità

1.4.2 COME SI FA DIAGNOSI?

La diagnosi di diabete monogenico viene in posta tramite indagine di genetica molecolare. L'approccio diagnostico convenzionale prevede la selezione di pazienti secondo i già citati criteri classici per MODY e l'avvio dell'indagine genetica tramite sequenziamento, gene per gene, sulla base di fenotipo e delle più comuni mutazioni per orientare il sospetto clinico. La tecnologia recente del next generation sequencing (NGS) permette invece il simultaneo sequenziamento di un numero vasto di DNA templates in maniera più rapida ed economica.

1.4.3 SEQUENZIAMENTO SANGER

Il sequenziamento del DNA è una tecnica che permette di stabilire la sequenza esatta delle basi presenti in una molecola di DNA, utilizzando dei nucleosidi modificati artificialmente (21)

La reazione prevede l'impiego di un filamento di DNA che funge da stampo, un primer per l'innesco della reazione con l'estremità 3'OH libera, una DNA polimerasi, i desossiribonucleosidi trifosfati (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) normali substrati per la sintesi del DNA. A ciascuna provetta veniva poi aggiunto un dideozinucleotide trifosfato (ddNTPS) privo del gruppo ossidrilico all'estremità 3'(3'-OH). Questa modificazione impediva l'allungamento del filamento complementare in quanto veniva l'aggiunta di ulteriori nucleotidi al 3'-OH. Si ottenevano frammenti di DNA di varia lunghezza. I campioni marcati venivano poi sottoposti ad elettroforesi. Il metodo Sanger ha rappresentato per oltre 30 anni il "gold standard" del sequenziamento genomico.

1.4.4 NEXT GENERATION SEQUENCING

Sequenziamento di prossima generazione consente l'analisi simultanea di più geni a costi inferiori e può diventare un'alternativa fattibile per test genetici tradizionali in un prossimo futuro (2), in quanto è in grado di generare contemporaneamente ed in breve tempo milioni di sequenze geniche. Diverse piattaforme possono essere usate per questa tecnica. Tra le più usate vi è la piattaforma Ion Torrent. Ion Torrent si avvale di un meccanismo di sequenziamento basato su processi biochimici che avvengono normalmente nei sistemi biologici.

Infatti quando un nucleotide viene incorporato in un filamento di DNA da parte della polimerasi durante il processo di sintesi, viene normalmente rilasciato uno ione H^+ come sottoprodotto. L'incorporazione del nucleotide induce l'aumento di protoni causando un abbassamento del pH, che viene rilevato dai sensori presenti e ciò provoca una variazione di potenziale. Un pHmetro converte l'informazione chimica in digitale, che permetteranno di costruire un grafico, lo ionogramma. Un ciclo del processo dura pochi secondi poiché non richiede una rilevazione ottica, come accade invece negli altri sistemi di NGS.

L'approccio tipico prevede quattro fasi:

- 1) il DNA genomico a doppia elica è prima frammentato in milioni di piccoli segmenti (della lunghezza di circa 150 bp);
- 2) le estremità di questi frammenti sono "riparate" in modo da generare estremità piatte (blunt ends);
- 3) alle estremità 5' e 3' di ciascun frammento vengono aggiunti (ligati) adattatori;
- 4) i frammenti con coniugati gli adattatori sono amplificati simultaneamente per la generazione della "library finale"

L'attuale tecnologia consente di analizzare contemporaneamente e in una singola reazione più campioni, con una ottimizzazione dei costi e dei tempi di esecuzione, grazie all'approccio multiplex. A tal fine, a ciascun campione viene assegnato un barcode individuale, che permette la successiva e univoca identificazione del campione.



PARTE SPERIMENTALE

1 PROGETTO DELLA TESI

Le forme di diabete monogenico possono di frequente essere erroneamente diagnosticate come diabete di tipo 1 o di tipo 2 e, di conseguenza, i pazienti possono essere impropriamente trattati, ad es. con insulina quando si potrebbero invece impiegare più efficacemente ipoglicemizzanti orali come le sulfaniluree. Pertanto, porre una diagnosi corretta è fondamentale per un trattamento efficace, per un adeguato counselling genetico e, più importante ancora, per il condizionamento sulla qualità della vita dei pazienti. Inoltre, i tempi e costi del sequenziamento Sanger imponevano che il sospetto diagnostico venisse indirizzato principalmente sulle forme più comuni di diabete monogenico, lasciando purtroppo non diagnosticati molti casi fortemente suggestivi e, pertanto, indicati come MODY X.

Purtroppo infatti è noto che fino a 80 % dei casi di MODY rimangono non diagnosticati, o meglio, mal classificati come forme di diabete tipo 1 o 2 (4).

L'obiettivo di questo studio è quello di utilizzare la metodica di NGS per:

-individuare casi etichettati come diabete tipo 1 o 2 con caratteristiche atipiche (già presenti all'esordio o valutate nel tempo, basso fabbisogno, familiarità spiccata per diabete, ecc...) in un campione di pazienti seguiti dal centro di Diabetologia Pediatrica dell'Osp. S.Orsola-Malpighi di Bologna con recente diagnosi di diabete (gennaio 2014-dicembre 2016) e in quei pazienti già seguiti, ma con diagnosi dubbia.

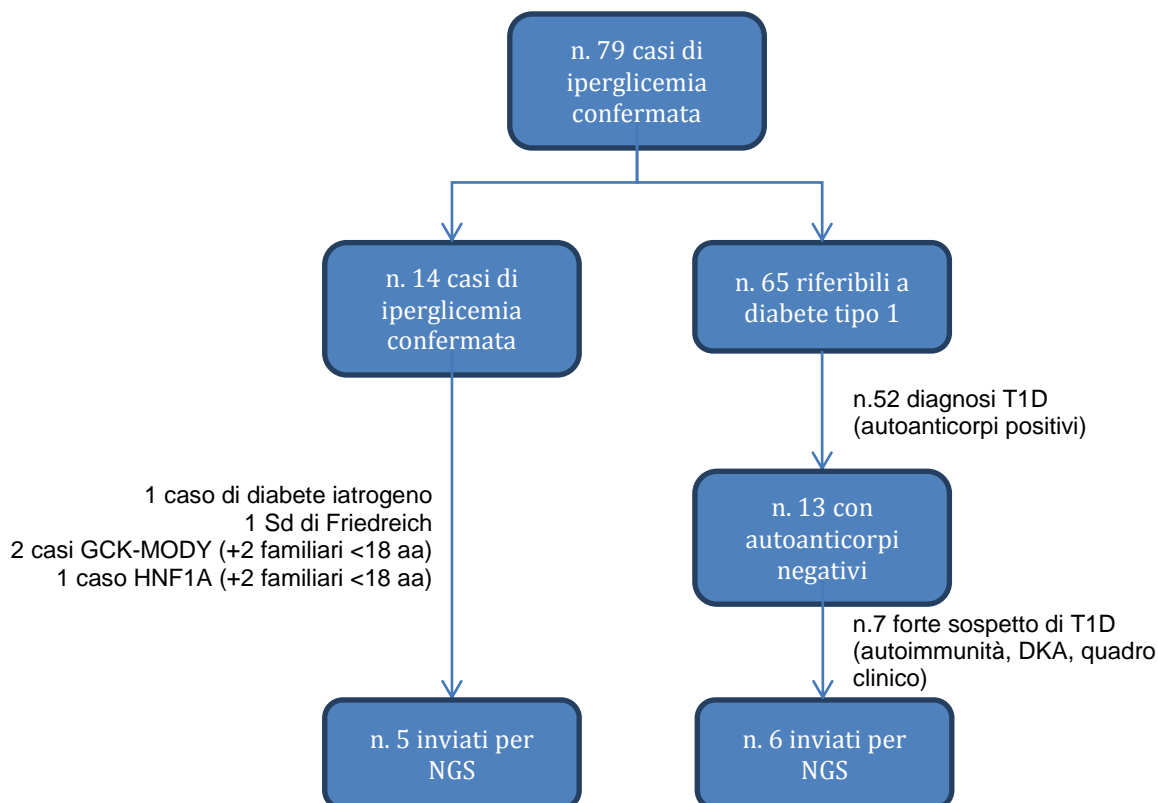
- ottimizzare l'iter diagnostico dei casi con forte sospetto di diabete monogenico, in cui non era stata rilevata alcuna mutazione in precedenza (pazienti già precedentemente indagati ed etichettati come MODY X).

2 PAZIENTI

Nel corso del triennio gennaio 2014 – dicembre 2016 sono stati accolti presso il Centro di Diabetologia Pediatrica dell'Osp. S.Orsola-Malpighi di Bologna 79 casi di iperglicemia marcata e/o persistente, che hanno richiesto accertamenti ulteriori e sono stati definiti come casi di diabete secondo le Linee Guida internazionali (2). Tra questi, 65 (82.2%) riferibili a diabete tipo 1, 13 casi dei quali con autoanticorpi negativi (20%). Tra questi solo 6 casi sono stati proposti per l'indagine NGS in quanto i restanti presentavano altra patologia autoimmune (celiachia o tiroidite), che rendevano molto probabile l'eziologia autoimmune anche dell'iperglicemia rilevata, un fabbisogno insulinico compatibile con forma di DMT1 o avevano presentato un esordio in condizioni di chetoacidosi (assente nelle forme monogeniche).

Gli altri 14 casi esaminati erano rappresentati da:

1 caso di diabete iatrogeno (post intervento di pancreasectomia), 1 caso di diabete in sindrome di Friedreich, 2 casi di GCK-MODY e 1 caso di HNF1A-MODY (che hanno consentito la diagnosi anche in altri 4 familiari minorenni che presentavano iperglicemie) che non sono stati sottoposti all'indagine NGS in quanto con fenotipo già fortemente suggestivo; i rimanenti 5 casi sono stati proposti per l'indagine NGS.



I 280 casi di diabete già seguiti dal nostro Centro sono stati rivisti alla ricerca di forme atipiche (assenza di autoimmunità o presenza a basso titolo, basso fabbisogno insulinico dopo lungo periodo dall'esordio, familiarità per patologia diabetica suggestiva per trasmissione autosomica dominante) e sono stati identificati altri 5 casi sospetti.

In totale 16 casi con iperglicemia confermata sono stati analizzati mediante metodica NGS.

3 MATERIALI E METODI

E' stato preparato un pannello con 15 geni notoriamente associati alle forme genetiche di diabete per il test di NGS.

3.1 SELEZIONE DEI PAZIENTI

Sono stati selezionati 20 campioni da sottoporre ad NGS, di cui 4 campioni di controllo con una mutazione nota (precedentemente identificata mediante sequenziamento Sanger) e 16 casi a mutazione ignota.

3.2 ESTRAZIONE E NORMALIZZAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

Il DNA genomico è stato estratto a partire da 400 μ l di sangue periferico in EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) utilizzando l'estrattore automatico Maxwell[®] 16 Instrument (Promega, Madison, WI, USA) e il relativo kit Maxwell[®] 16 DNA Purification kit (Promega, Madison, WI, USA). Lo strumento, che utilizza un sistema di biglie immunomagnetiche (MagneSil[®] Paramagnetic Particles) per la cattura del DNA, ha consentito di estrarre in contemporanea il DNA genomico di 16 campioni in circa 30 minuti evitando *cross*-contaminazioni. Il kit di purificazione utilizzato conteneva le cartucce monouso, suddivise in vari scomparti contenenti all'interno i reagenti necessari, i pistoncini (o *plungers*) monouso e le cuvette per il recupero del DNA. Il sangue è stato caricato, seguendo lo specifico protocollo, nella prima sezione della cartuccia (quella più lontana dall'operatore), mentre nella sezione più vicina all'operatore, ovvero l'ultima, è stato posizionato il pistoncino. La cartuccia è stata poi inserita sull'apposito *rack* dello strumento insieme a delle cuvette contenenti 300 μ l di acqua Milli-Q[®] (deionizzata e sterilizzata) in cui è stato eluito il DNA. Prima di iniziare la seduta, la macchina è stata programmata secondo la seguente modalità: SEV → TOTAL BLOOD → DNA.

I campioni estratti sono stati quantificati mediante lo spettrofotometro "Nanodrop 3.0.0" (Celbio S.P.A. Milano, Italia) (Fig. 18). Tale strumento, utilizzando 2 μ l di DNA, permette di determinare la concentrazione (lettura a 260 nm) e verificare la purezza (lettura a 280 nm) del DNA. Dopo aver

misurato la concentrazione del DNA, ciascun campione è stato normalizzato alla concentrazione di 30 ng/μl.

3.3 COSTRUZIONE DELLE LIBRERIE

La costruzione delle librerie è stata effettuata utilizzando il protocollo standard proposto per il sequenziamento *target*-specifico.

3.4 ASSAY DESIGN

Il disegno dei *primers* per lo *screening* mutazionale dei geni GCK, HNF1A, HNF4A, HNF1B, PDX1, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1 e WFS1 è stato effettuato mediante l'utilizzo di Ion AmpliSeq™ Designer (<https://ampliseq.com/browse.action>), un *tool* disponibile *online*, creato dalla Life Technologies, Carlsbad, CA, USA, per gli utenti della piattaforma Ion Torrent PGM. Al *software* è stato sottoposto un *target* di 35,89 kb, corrispondente alle regioni codificanti dei 15 geni, le regioni 5'UTR e 3'UTR, e 25 bp nelle regioni introniche fiancheggianti. Il programma ha consentito di disegnare 117 coppie di *primers* per amplificare altrettanti ampliconi parzialmente sovrapposti, corrispondenti a 60,32 kb di *panel size*, ottenendo una copertura del 94,6% del *target*. La peculiare sequenza di alcuni geni non ha consentito di disegnare *primers* adeguati, e sono quindi rimaste scoperte le seguenti regioni: 104bp nel gene APPL1 (5'UTR e esone 1), 299bp nel gene GCK (esone 5 e 3'UTR), 187bp in KLF11 (5'UTR e ultimo esone), 656bp in CEL, 14bp in BLK, 91bp in ABCC((esone 1 e esone 34), 30bp in HNF1A (esone 9 e 3'UTR), 622bp in PDX1 (esone 1 e 3'UTR), 121bp in KCNJ11, 156bp in WFS1 (esone 8). Le coppie di *primers*, divise in due *pool*, sono state utilizzate per amplificare le regioni *target* mediante due diverse reazioni di *multiplex PCR*.

3.5 ANALISI DELLE SEQUENZE NGS

Tutte le mutazioni *frameshift*, nonsense e quelle nei siti di *splicing* canonico sono state considerate sicuramente patogeniche. Per tutte le varianti missenso è stata verificata la presenza in HGMD (*Human Gene Mutation Database* www.hgmd.cf.ac.uk) e LOVD3.0 (<http://www.lovd.nl/3.0/home>) due database che raccolgono le mutazioni patogeniche e le classificano in base ai dati di letteratura riportati fino ad ora attribuendone il grado di patogenicità. Inoltre per valutare la frequenza di queste nella popolazione generale, è stato consultato il database ExAC (<http://exac.broadinstitute.org>) che riporta dati di MAF (*Minor frequency allele*= frequenza dell'allele minore) calcolati su una popolazione di 60,706 casi non imparentati. Infine tutte le varianti missenso sono state sottoposte ai *tools* bioinformatici di predizione di patogenicità di seguito riportati:

- PolyPhen 2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)
- Sift Sequence (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_seq_submit2.html)

3.6 VALIDAZIONE DELLE VARIANTI

Tutte le varianti identificate con il metodo NGS, ritenute patogeniche, sono state validate mediante il sequenziamento Sanger, utilizzando *primers* appositamente disegnati per l'amplificazione e il sequenziamento delle regioni *target*. La medesima tecnica è stata impiegata per eseguire gli studi familiari andando a sequenziare specificatamente, nei familiari dei probandi, le mutazioni trovate in NGS in questi ultimi

4 RISULTATI

I 4 casi con diagnosi già nota sono stati tutti correttamente identificati dalla metodica, validando il nostro pannello. La target base coverage 20x è stata di 98.4.

6 pazienti dei 16 (37.5 %) inviati all'indagine NGS hanno mostrato una mutazione di natura patogena in uno dei geni del nostro pannello:

- A) 1 caso di mutazione in eterozigosi 124C>T nell'esone 2 del gene WFS1 che codifica per il gene della Wolframina, determinando un codone di stop (mutazione non descritta in precedenza)
- B) 1 caso di eterozigosi per la mutazione di splicing 187+2T>C nel gene dell'insulina (mutazione non descritta in precedenza)
- C) 1 caso di mutazione missenso 685G>A nel gene KCNJ11 già identificata e nota come patogena
- D) 1 caso di mutazione missenso 187G>A sul gene BLK, di probabile natura patogena.
- E) 1 caso di eterozigosi composta per la mutazione missenso 659C>T del gene KLF11 (nota come patogena), e missenso 1463T>C nel gene CEL (nota come patogena)
- F) 1 caso di mutazione missenso 146C>T nel gene GCK, nota come patogena.

5 dei 6 soggetti non aveva presentato una positività per gli anticorpi marcatori di diabete autoimmune, il caso D (BLK-MODY) aveva presentato autoanticorpi anti GAD e antiinsulina positivi, ma a basso titolo. Il caso E è affetto da altra patologia autoimmune, la malattia celiaca.

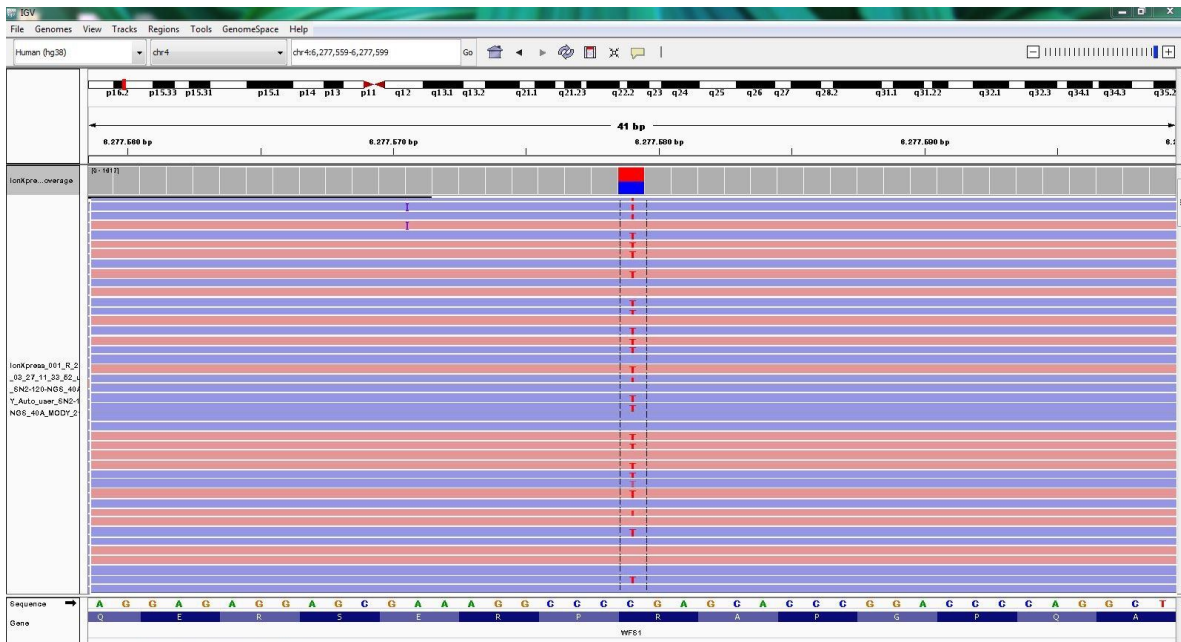
Inoltre:

1 caso di eterozigosi composta 808C>A nel gene KCNJ11 e 590C>A nel gene NEUROD1, entrambe definite dal software di probabile significato benigno.

2 casi di mutazione missenso di probabile natura benigna nel gene CEL (1510G>C) e APPL1 (1002C>G).

Caso A:

Comparsa di iperglicemia lieve in adolescenza in piccolo prematuro (EG 33 settimane, PN 2800 g) operato per DIV a 5 mesi. Forte familiarità per diabete in linea materna (madre e nonna). Le precedenti indagini per MODY 1, 2 e 3 hanno dato esito negativo. Il NGS ha invece evidenziato la presenza di una mutazione determinante un codone di stop (mai descritta in precedenza) nel gene per la Wolframina, già nota per essere associata alla sindrome di Wolfram.

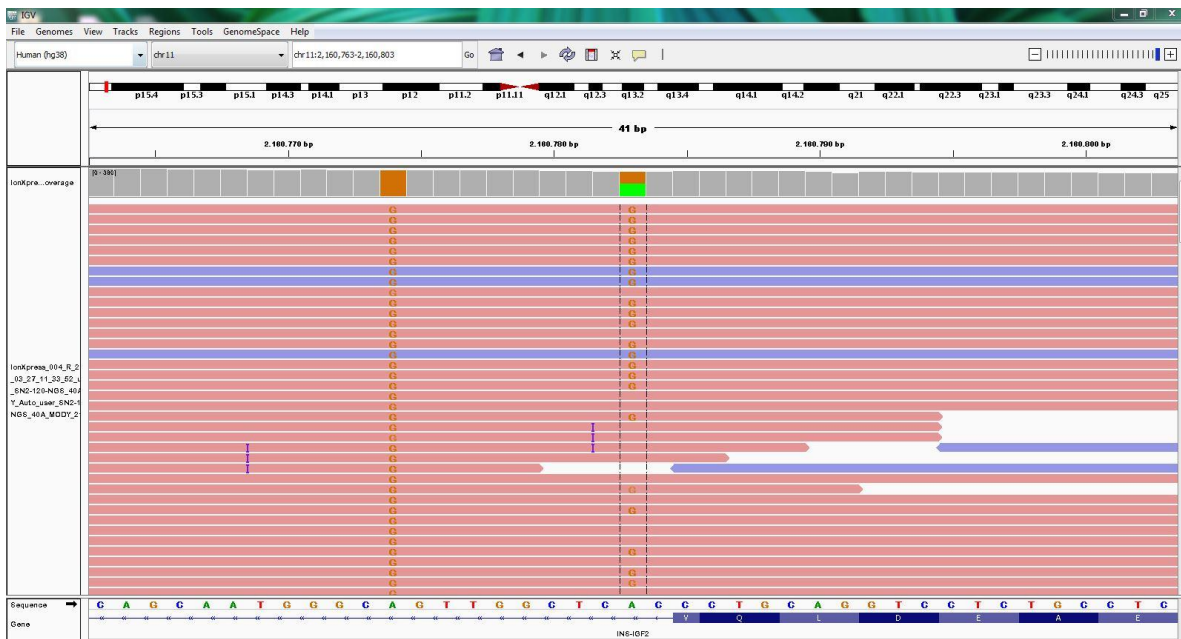


La figura riporta le *reads* ottenute mediante sequenziamento NGS del gene WFS1, indicando le *reads forward* in rosso e *quelle reverse* in blu, mediante il software IGV (Integrative Genomic Viewer). Sono evidenti le varianti nucleotidiche rispetto alla sequenza genica di riferimento (indicata in basso) e lo stato di eterozigosi delle stesse (rettangoli rosso e blu).

Caso B (MODY 10)

Ragazzo di 15 anni che giunge alla nostra osservazione per sospetto diabete mellito tipo 1 con glicemia 436 mg/dl, poliuria e polidipsia, calo ponderale ed emoglobina glicata 9.1% (76 mmol/mol). Il ragazzo è il più piccolo di 6 fratelli (2M e 4 F), il fratello maggiore è in terapia insulinica dall'età dei 17 anni, una sorella dall'età di 18 anni, e le altre 3 sorelle hanno presentato un diabete gestazionale e ora sono in terapia con ipoglicemizzanti orali. La madre è affetta da diabete diagnosticato come tipo 2. La spiccata familiarità ci aveva indotto a proporre il ragazzo per l'indagine genetica nel sospetto di una forma monogenica di diabete (Sequenziamento Sanger per MODY 1, 2 e 3, aveva dato esito negativo, trovando solo una mutazione di dubbio significato nel promotore del gene della GCK, tra l'altro non presente in tutti i fratelli). La metodica NGS ha

permesso di analizzare geni più rari, consentendo di trovare una mutazione di splicing, non descritta in precedenza. In corso le analisi sui familiari affetti.



La figura riporta le *reads* ottenute mediante sequenziamento NGS del gene INS-IGF2, indicando le *reads forward* in rosso e *quelle reverse* in blu, mediante il software IGV (Integrative Genomic Viewer). Sono evidenti le varianti nucleotidiche rispetto alla sequenza genica di riferimento (indicata in basso) e lo stato di eterozigosi delle stesse (rettangoli arancione e verde).

Caso C (MODY 13):

Esordio di diabete (glicemia 400 mg/dl) in ragazzo adolescente, normopeso e sclerosi multipla. Autoanticorpi marcatori di diabete negativi. Il padre, anch'egli normopeso, diabetico dall'età di 16 anni, in terapia con ipoglicemizzanti orali fino all'età di 62 anni, poi intrapresa terapia insulinica. Le indagini per le più comuni forme di diabete monogenico (GCK, HNF1A e HNF4A-MODY) sono risultate negative. Il ragazzo si presenta in buone condizioni con un ottimo controllo metabolico (HbA1c sempre <7%, 53 mmol/mol).

Sottoposto al NGS, riscontro di mutazione nel gene KCNJ11 (già descritta e nota come patogenica).

Caso D (MODY 11):

Ragazza di 13 anni giunge alla nostra osservazione per riscontro di glicemia di 250 mg/dl in corso di esami eseguiti di routine per controllo terapia antiepilettica. Non era presente chetoacidosi diabetica all'esordio, HbA1c 7.7 % (61 mmol/mol), presenza di autoanticorpi anti GAD positivi (a basso titolo) e anti insulina positivi. E' stata intrapresa terapia insulinica sottocute. Nel corso del follow up (circa 24 mesi) il quadro clinico si è mantenuto stabile, con basso fabbisogno insulinico (<0.5u/kg/die), insolito considerando l'età adolescenziale della ragazza. E' stato pertanto eseguito NGS che ha rilevato la presenza di una mutazione di natura probabilmente patogenica del gene BLK.

Caso E (MODY 7 e MODY 8):

Piccolo seguito per celiachia con riscontro di glicosuria e glicata lievemente aumentata (HbA1c 6.2 % 44 mmol/mol). Gli autoanticorpi marcatori di diabete sono risultati negativi. No familiarità. Per il persistere del quadro clinico è stato sottoposto all'indagine molecolare tramite NGS con riscontro di una doppia mutazione missenso (entrambe già note e descritte come patogeniche) sul gene CEL e sul gene KLF11. Al momento nessuna terapia è stata prescritta.

Caso F (MODY 2):

Piccola di 14 mesi che giunge alla nostra osservazione per riscontro di iperglicemie persistenti, rilevate in seguito a episodio convulsivo febbrile. Genitori non presentano iperglicemie. Considerando la giovanissima età della paziente, il sospetto diagnostico si focalizza sul riscontro occasionale di una fase iniziale di diabete tipo 1. La negatività degli autoanticorpi marcatori di diabete, ci ha indotto a sottoporre il caso al NGS con riscontro di una mutazione nel gene della GCK.

5 DISCUSSIONE

Il nostro progetto di ricerca ha previsto l'impiego della nuova metodica del NGS per ottimizzare la diagnosi molecolare in forme di diabete monogenico. Sono stati sottoposti all'indagine coloro che, con fenotipo suggestivo di diabete monogenico, non avevano ricevuto una diagnosi genetica all'analisi dei principali geni responsabili di MODY (MODY X) e coloro che, alla revisione della casistica del Centro, presentavano caratteristiche atipiche e sovrapponibili a diverse forme di diabete (autoimmune e non).

Tra i 16 casi candidati, abbiamo trovato 7 mutazioni in 6 pazienti sottoposti all'indagine, di cui 2 mutazioni sicuramente causative in quanto una di splicing e una determinante un codone di stop, 4 mutazioni missenso già descritte in letteratura come patogeniche e 1 missenso che il software descrive come probabile patogenica. 3 campioni erano già stati sottoposti ad indagine con metodica Sanger per le 3 principali forme di MODY (GCK, HNF1A e HNF4A-MODY) risultate negative. Un recente studio ha selezionato 54 soggetti con caratteristiche suggestive per diabete monogenico, ma risultati negativi all'indagine genetica con metodica Sanger per GCK e HNF1A, da sottoporre ad un nuovo pannello di 28 geni responsabili di forme di diabete monogenico mediante NGS. In 18 individui (33%) è stata riscontrata una mutazione (11 in GCK, 1 in HNF1A, 6 in geni non precedentemente studiati). Gli autori concludono che NGS migliora il rilevamento di differenze in sequenze nucleotidiche legate al diabete. Lo screening con NGS dovrebbe includere anche i pazienti

diabetici per lo screening di particolari sottotipi di MODY risultati negativi con metodica Sanger (22). Nella nostra casistica il sistema NGS, pur analizzando sequenze geniche non previste dal sequenziamento tradizionale, non ha riscontrato mutazioni in geni precedentemente studiati.

Uno studio simile condotto in Inghilterra ha effettuato uno screening genetico NGS a base di un pannello di 29 geni implicati nel diabete monogenico: gli autori hanno mostrato un aumento del 17% nella rilevazione delle mutazioni. Nello stesso studio, 6 di 14 mutazioni identificate erano in geni rari che non erano stati indagati o sospettati in precedenza a causa dell'assenza di elementi caratteristici (23). Johansson et al (24) hanno condotto il primo studio su uno screening per 13 geni responsabili di MODY in più di 500 pazienti con diabete ed autoanticorpi negativi, senza altri criteri d'inclusione per lo studio. Gli autori hanno riscontrato che le forme monogeniche di diabete possono coprire il 6.5% dei casi di diabete autoanticorpo-negativo. Da notare come in un terzo di questi casi, la natura monogenica del diabete non fosse stata neanche sospettata.

La percentuale non elevata di mutazioni trovate nello studio di Johansson (24) non sembra giustificare l'impiego di uno screening diretto per tutte le forme di diabete senza autoimmunità. Il nostro studio si discosta dai precedenti elencati proprio in quanto se da un lato ha l'obiettivo di trovare mutazioni in soggetti con forte suggestione di diabete monogenico in cui la metodica tradizionale ha fallito (cercando quindi mutazioni in regioni non studiate dal sequenziamento tradizionale o in geni rari), dall'altro vuole porre attenzione anche alle forme etichettate come diabete tipo 1 che presentino caratteristiche atipiche o confondenti con sovrapposizione di segni per varie forme di diabete. Già in precedenza il nostro gruppo ha pubblicato casi clinici in cui era stata dimostrata la coesistenza di forme diverse di diabete (autoimmune e monogenico) (13, 25).

Infatti, ad esempio, nel caso con mutazione del gene *BLK*, la ragazza presentava, seppur a basso titolo, la positività per due autoanticorpi marcatori di diabete tipo 1. Nel caso invece del bambino con la doppia mutazione in eterozigosi era già affetto da patologia autoimmune e questo avrebbe potuto far propendere anche per una forma di diabete su base autoimmune. E' stata sorprendente la scoperta della mutazione nel gene *WFS1* del caso A: infatti le mutazioni ereditate con carattere autosomico recessivo in questo gene sono già state descritte ed associate alla nota sindrome di Wolfram, caratterizzata da diabete insulino-dipendente, atrofia ottica e altri segni clinici come sordità neurosensoriale, anomalie del tratto urogenitale, ipoventilazione centrale e disturbi di ordine psichiatrico. Il quadro clinico della sindrome può essere molto variegato, con la possibile presenza di solo alcuni dei disordini sopracitati e con un rischio elevato di decesso legato alle complicanze renali e all'ipoventilazione centrale (il 65% dei pazienti procede verso l'exitus entro la terza decade di vita) (26). Mutazioni ereditate con carattere autosomico dominante, possono presentare un fenotipo clinico più sfumato e meno grave di quanto riportato per la sindrome di Wolfram,

caratterizzato da iperglicemie più modeste e non necessariamente necessitanti della terapia insulinica.

La mutazione del gene dell'insulina per il paziente del caso B ha comportato una comparsa clinica di malattia piuttosto tardiva rispetto a quanto solitamente avviene nei casi in cui sia coinvolto tale gene, quando generalmente l'esordio della malattia avviene in età neonatale (27). Una pubblicazione recente (28) ha però di fatto affermato che KCNJ11 vada considerato come un gene MODY (MODY13) e non solo legato al diabete mellito neonatale NDM, confermando l'ampio spettro di fenotipi associate al diabete da mutazioni in geni NDM (cioè KCNJ11, ABCC8 e INS). Concludono gli autori che la diagnosi molecolare di MODY dovrebbe comprendere KCNJ11 in quanto i portatori affetti possono essere idealmente trattati con sulfaniluree orali. Nel nostro caso, il paziente è attualmente in trattamento con farmaco combinato con metformina e sulfanilurea.

6 CONCLUSIONI

Il metodo NGS si è dimostrato efficace ed utile nel riuscire a diagnosticare in maniera rapida quelle forme rare di diabete giovanile monogeniche, non precedentemente identificate con il sequenziamento classico che tendeva a focalizzarsi, per via dei costi e dei tempi d'esecuzione, sulle forme principali e più diffuse. Molti casi definiti inizialmente come MODY X o classificati come diabete tipo 1 potrebbero trovare una diagnosi grazie alla possibilità di sequenziare rapidamente molti geni in contemporanea.

Bibliografia

1. Shields BM, Hicks S, Shepherd MH, Colclough K, Hattersley AT, Ellard S. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing? *Diabetologia* 2010 Dec;53(12):2504-8. doi: 10.1007/s00125-010-1799-4.
2. Rubio-Cabezas O, Hattersley AT, Njølstad PR, et al. International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2014 Sep;15 Suppl 20:47-64. doi: 10.1111/pedi.12192
3. Pihoker C, Gilliam LK, Ellard S, Dabelea D, SEARCH for Diabetes in Youth Study Group. Prevalence, characteristics and clinical diagnosis of maturity onset diabetes of the young due to mutations in HNF1A, HNF4A, and glucokinase: results from the SEARCH for Diabetes in Youth. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Oct;98(10):4055-62. doi: 10.1210/jc.2013-1279

4. Amed S, Oram R Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY): Making the Right Diagnosis to Optimize Treatment. *Can J Diabetes*. 2016 Oct;40(5):449-454. doi: 10.1016/j.jcjd.2016.03.002.
5. Lorini R, Klersy C, d'Annunzio G et al. Maturity-Onset Diabetes of the Young in Children With Incidental Hyperglycemia: A multicenter Italian study of 172 families. *Diabetes Care*. 2009 Oct;32(10):1864-6. doi: 10.2337/dc08-2018
6. McDonald TJ, Ellard S. Maturity onset diabetes of the young: identification and diagnosis. *Ann Clin Biochem*. 2013 Sep;50(Pt 5):403-15. doi: 10.1177/0004563213483458. Epub 2013 Jul 22.
7. Hagenfeldt-Johansson KA, Herrera PL, Wang H, et al. Beta-cell-targeted expression of a dominant-negative hepatocyte nuclear factor-1 alpha induces a maturity-onset diabetes of the young (MODY) 3-like phenotype in transgenic mice. *Endocrinology* 2001; 142: 5311–5320
8. Shepherd M and Hattersley AT. 'I don't feel like a diabetic any more': the impact of stopping insulin in patient with maturity onset diabetes of the young following genetic testing *Clin Med* 2004; 4: 144–147
9. Mathison A, Escande C, Calvo E. Phenotypic Characterization of Mice Carrying Homozygous Deletion of KLF11, a Gene in Which Mutations Cause Human Neonatal and MODY VII Diabetes. *Endocrinology*. 2015 Oct;156(10):3581-95. doi: 10.1210/en.2015-1145.
10. Sujjitjoo J, Kooptiwut S, Chongjaroen N. Aberrant mRNA splicing of paired box 4 (PAX4) IVS7-1G>A mutation causing maturity-onset diabetes of the young, type 9. *Acta Diabetol*. 2016 Apr;53(2):205-16. doi: 10.1007/s00592-015-0760-x
11. Borowiec M, Liew CW, Thompson R. Mutations at the BLK locus linked to maturity onset diabetes of the young and beta-cell dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 25;106(34):14460-5. doi: 10.1073/pnas.0906474106
12. Prudente S, Jungtrakoon P, Marucci A. Loss-of-Function Mutations in APPL1 in Familial Diabetes Mellitus. *Am J Hum Genet*. 2015 Jul 2;97(1):177-85. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.05.011.
13. Maltoni G, Zucchini S, Scipione M, Mantovani V, Salardi S, Cicognani A. Onset of type 1 diabetes mellitus (T1DM) in two patients with maturity Onset Diabetes of the Young (MODY). *Pediatr Diabetes*. 2012 Mar;13(2):208-12. doi: 10.1111/j.1399-5448.2011.00788.x
14. Bowden SA, Hoffman RP . Triple diabetes: coexistence of type 1 diabetes mellitus and a novel mutation in the gene responsible for MODY3 in an overweight adolescent. *Pediatr Diabetes*. 2008 Apr;9(2):162-4. doi: 10.1111/j.1399-5448.2007.00335.x.

15. S. Ellard & C. Bellanné-Chantelot & A. T. Hattersley & 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) 51:546–553 DOI 10.1007/s00125-008-0942-y.
16. Pacaud D, Schwandt A, de Beaufort C et al. A description of clinician reported diagnosis of type 2 diabetes and other non-type 1 diabetes included in a large international multicentered pediatric diabetes registry (SWEET). *Pediatr Diabetes*. 2016 Oct;17 Suppl 23:24-31. doi: 10.1111/pedi.12426.
17. Delvecchio M, Mozzillo E, Salzano et al. Monogenic Diabetes accounts for 6.3% of cases referred to 15 Italian pediatric diabetes Centers during 2007-2012. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017 Feb 16. doi: 10.1210/jc.2016-2490
18. Kleinberger JW, Pollin T. Undiagnosed MODY: Time for Action. *Curr Diab rep* Dec;15(12):110. doi: 10.1007/s11892-015-0681-7.
19. Giulio Maltoni, Stefano Zucchini, Anna Lisa Martini, Elena Marasco, Vilma Mantovani, Andrea Pession. Clinical heterogeneity in the same generation of siblings with GCK/MODY 2. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014 Nov 13. pii: S0168-8227(14)00499-9. doi: 10.1016/j.diabres.2014.11.002
20. Alkorta-Aranburu G, Carmody D, Cheng YW. Phenotypic heterogeneity in monogenic diabetes: the clinical and diagnostic utility of a gene panel-based next-generation sequencing approach. *Mol Genet Metab*. 2014 Dec;113(4):315-20. doi: 10.1016/j.ymgme.2014.09.007.
21. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7
22. Szopa M, Ludwig-Gałęzowska A, Radkowski P, Genetic testing for monogenic diabetes using targeted next-generation sequencing in patients with maturity-onset diabetes of the young. *Pol Arch Med Wewn*. 2015;125(11):845-51.
23. Ellard S, Lango Allen H, De Franco E, et al. Improved genetic testing for monogenic diabetes using targeted next-generation sequencing. *Diabetologia*. 2013; 56: 1958-1963
24. Johansson B, Irgens H, Molnes J, et al. Targeted next-generation sequencing reveals MODY in up to 6.5% of antibody-negative diabetes cases listed in the Norwegian Childhood Diabetes Registry. *Diabetologia* (2017) 60:625–635 DOI 10.1007/s00125-016-4167-1
25. Maltoni G, Zucchini S, Martini AL, Marasco E, Mantovani V, Pession A. Clinical heterogeneity in the same generation of siblings with GCK/MODY 2. *Diabetes Res Clin Pract*. 2015 Jan;107(1):e1-3. doi: 10.1016/j.diabres.2014.11.002
26. Maltoni G, Minardi R, Cristalli CP, Nardi L, D'Alberon F, Mantovani V, Zucchini S A novel compound heterozygous mutation in an adolescent with insulin-dependent diabetes:

The challenge of characterizing Wolfram syndrome.. *Diabetes Res Clin Pract.* 2016 Nov;121:59-61. doi: 10.1016/j.diabres.2016.08.020

27. Iafusco D, Salardi S, Chiari G. No sign of proliferative retinopathy in 15 patients with permanent neonatal diabetes with a median diabetes duration of 24 years. *Diabetes Care.* 2014 Aug;37(8):e181-2. doi: 10.2337/dc14-0471
28. Bonnefond A1, Philippe J, Durand E. Whole-exome sequencing and high throughput genotyping identified KCNJ11 as the thirteenth MODY gene. *PLoS One.* 2012;7(6):e37423. doi: 10.1371/journal.pone.0037423.