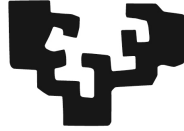


eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

Facultad de Ciencia y Tecnología

Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal

Tesis doctoral

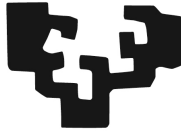
**BÚSQUEDA DE NUEVOS GENES ASOCIADOS A LA DIABETES
NEONATAL**

Teresa Velayos Gainza

Leioa, 2017

© 2017 Teresa Velayos Gainza

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Facultad de Ciencia y Tecnología

Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal

Tesis doctoral

**BÚSQUEDA DE NUEVOS GENES ASOCIADOS A LA DIABETES
NEONATAL**

Teresa Velayos Gainza

Leioa, 2017

© Teresa Velayos Gainza

*“Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la
ciencia, no podrá comprender su tiranía”
Frankenstein, de Mary Shelley*

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que este apartado sirviera para expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial al Dr. Luis Castaño y a la Dra. Izortze Santin, directores de esta investigación, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continua. Por supuesto, no puedo olvidarme de agradecer a todos los clínicos que colaboraron en este estudio aportando pacientes, ya que sin esta aportación no hubiera sido posible.

Quisiera hacer una mención especial a Izortze, sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años y la confianza en mí depositada. Agradezco verdaderamente tu dedicación, así como el tiempo y recursos que pusiste a mi alcance para que consiguiera llegar hasta aquí. Realmente valoro que te hayas mantenido a mi lado, que hayas sido paciente y es que tu has sido una de los pilares en los que me he podido apoyar, y gracias al cual he seguido con este proyecto a pesar de las dificultades.

También quiero verdaderamente agradecer a todos mis compañeros de laboratorio tanto de cruces como de la universidad.

Rosa, Inés, Gustavo, Sorkunde, Ana, Teba, Alex... gracias por estar ahí siempre para lo que necesitara, por enseñarme a relativizar las cosas, por hacerme sentir desde el primer día una más. Siempre sentí que podía contar con vosotros para cualquier cosa, muy importante para mi en estos 4 años.

Idoia y Toñi, muchísimas gracias por esos cafés que hacían el día día mas ameno y por todos los momentos divertidos que compartimos. Con vosotras, el trabajo era mucho más fácil.

Como no, gracias también a Ainara, Leticia, Nora, Koldo, Buli, Idoia y a Angela, por acogerme en la universidad. Por estar siempre dispuestos a ayudarme. Por todos esos cafés que recuerdo que siempre eran un no parar de reír.

Quisiera agradecer de manera especial a Amaia y a Irati, para mí más que unas compañeras de trabajo. Desde el primer día en que aterricé en la universidad me acogisteis como una más. Muchas gracias por seguir creyendo en mi en los momentos que yo no lo hacía. Gracias por tener siempre palabras de ánimo para mí, por acertar siempre en lo que necesitaba escuchar en los momentos malos. Por todos esos momentos de risas, de llanto, de enfado que compartimos. Por esos momentos de terapia tanto en el trabajo como fuera de él, esos poteos que terminaban siempre de la mejor manera... de verdad, muchísimas gracias por ser como sois.

Gracias a mi familia. Aita, Ama, German, gracias por darme la oportunidad de emprender el camino en la ciencia. Gracias por intentar siempre mantener mis ilusiones, por creer que vuestra hija y hermana es capaz de conseguir lo que se proponga. Por soportar mi mal carácter en los momentos malos, y en los no tan malos. Gracias por intentar entenderme en todo este complicado proceso, y apoyarme cualquiera que fuera la decisión que tomara. German, gracias no solo por tu apoyo moral, sino que también por tu ayuda con la estadística!! Gracias por animarme y sacarle siempre lo bueno a las cosas, tú, que de verdad sabes lo que es pasar por esto. En definitiva, gracias por ser el gran hermano que eres.

Gracias a mi cuadrilla por estar ahí siempre. En especial, Leire y Larraitz, habéis sido otro de mis pilares en el trayecto final de este proyecto. Gracias por escuchar siempre que lo necesitaba, por no tomaros a mal mis idas y venidas, mis “desapariciones”, por tolerar mi falta de consideración hacia vosotras, por permitirme ser egoísta en los momentos en los que mas lo necesitaba. Gracias por todas esas escapadas veraniegas en las que conseguíais que yo me desahogara y me olvidara de todo. En fin, gracias por estar dispuestas a lo que fuera por mi bienestar.

Por último, a ti, Iñaki. Hace ya casi 10 años que empezó nuestro camino conjunto en la vida y juntos comenzamos esta nueva etapa que ahora llega también a su fin. Has estado junto a mi desde el principio, aportándome siempre la dulzura y el optimismo que te caracterizan. De primera mano has conocido lo que es estar involucrado en este tipo de proyectos y a pesar de ello te has mantenido erguido aún cuando yo sentía no tener fuerzas para ello. Has sido y eres mi mayor apoyo en la vida, estuviste a mí lado incluso en los momentos o situaciones mas tormentosas, nunca te rendiste. No ha sido sencillo llegar hasta el final de este proyecto, pero en ningún momento dudaste de que lo pudiera conseguir. Gracias por anteponerme a todo, por saber ponerte en mi lugar y tolerar toda clase de estupideces. Por permanecer a mi lado siempre, por tolerar mis ausencias mentales, mis momentos mas bajos, por darme ese espacio cuando lo requería y por dejarlo todo y estar conmigo cuando lo necesitaba. Gracias por saber que era lo mejor para mí en cada momento. Gracias por demostrarme siempre tu cariño y amor incondicionales.

ABREVIATURAS

ABCC8	Gen <i>ATP-binding cassette transporter subfamily C member 8</i>	
AD	Autosómica dominante	
ADN	Ácido desoxirribonucleico	
ADNc	ADN complementario	
ADP	Adenosina difosfato	
AIRE	Gen <i>Autoimmune regulator</i>	
AMP	Adenosina monofosfato	
AMPc	AMP cíclico	
APPL1	Gen <i>Adaptor Protein Phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1</i>	
APS1	<i>Autoimmune Polyendocrinopathy Syndrome type 1</i>	Poliendocrinopatía autoinmune tipo 1
AR	Autosómica recesiva	
ARN	Ácido ribonucleico	
ARNm	ARN mensajero	
ATF4	Gen <i>Activating Transcription Factor 4</i>	
ATP	Adenosina trifosfato	
BCA	<i>Bicinchoninic acid Assay</i>	Ensayo de ácido bicinconínico
BLK	Gen <i>B Lymphoid Tyrosine Kinase</i>	
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>	Albúmina de suero bovino
Ca²⁺	Ion calcio	
CDK4	Gen <i>Cyclin Dependent Kinase 4</i>	
CEL	Gen <i>Carboxyl Ester Lipase</i>	

ChIP	<i>Chromatin Immunoprecipitation</i>	Inmunoprecipitación de cromatina
CIR	Crecimiento Intrauterino Restringido	
CREB	Gen <i>cAMP Response Element-Binding</i>	
Ct	Ciclo umbral	
ddATP	Dideoxiadenosina trifosfato	
ddCTP	Dideoxicitidina trifosfato	
ddGTP	Dideoxiguanina trifosfato	
ddNTP	Dideoxinucleótido trifosfato	
ddTTP	Dideoxitimina trifosfato	
DE	Desviación estándar	
DEND	<i>Developmental delay-epilepsy-neonatal diabetes syndrome</i>	Síndrome de retraso del crecimiento, epilepsia y diabetes neonatal
DIDMOAD	<i>Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, Optic Atrophy, and Deafness syndrome</i>	Síndrome de diabetes insípida, diabetes mellitus, atrofia óptica y sordera
DM	Diabetes mellitus	
DM1	Diabetes mellitus tipo 1	
DM2	Diabetes mellitus tipo 2	
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>	Medio basal Eagle modificado por Dulbecco
DMG	Diabetes mellitus gestacional	
DMR	<i>Differentially Methyated Region</i>	Región metilada específicamente
DN	Diabetes neonatal	
DNP	Diabetes neonatal permanente	
DNT	Diabetes neonatal transitoria	
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato	
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>	Ácido etileno diamino tetraacético
EEM	Error estándar de la media	

EIF2AK3	Gen <i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 3</i>	
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>	
FAM	Carboxifluoresceína	
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>	Suero fetal bovino
Foxa	Gen <i>Forkhead Box A</i>	
FOXP3	Gen <i>Forkhead Box P3</i>	
GADA	<i>Glutamic acid decarboxylase Antibodies</i>	Anticuerpos contra el ácido glutámico descarboxilasa
GAPDH	Gen <i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>	
GATA6	Gen <i>GATA Binding Protein 6</i>	
GCK	Gen <i>Glucokinase</i>	
GLIS3	Gen <i>GLIS Family Zinc Finger 3</i>	
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineethanesulfónico
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>	Antígeno leucocitario humano
HNF1A	Gen <i>Hepatocyte Nuclear Factor 1-Alpha</i>	
HNF1B	Gen <i>Hepatocyte Nuclear Factor 1-Beta</i>	
HNF4A	Gen <i>Hepatocyte Nuclear Factor 4-Alpha</i>	
HYMAI	Gen <i>Hydatidiform Mole Associated And Imprinted</i>	
IA2A	<i>Insulinoma Associated antigen 2 Antibodies</i>	Anticuerpos anti-tirosina fosfatasa
IAA	<i>Insulin Autoantibodies</i>	Anticuerpos anti-insulina
IBMX	<i>3-isobutyl-1-methylxanthine</i>	3-isobutil-1-metilxantina
iDEND	<i>intermediate DEND</i>	DEND intermedio
IER3IP1	Gen <i>Immediate Early Response 3 Interacting Protein 1</i>	

<i>IgE</i>	Inmunoglobulina E	
IL-6	Interleucina 6	
<i>INS</i>	Gen insulina (Humano)	
<i>INS-1</i>	Gen insulina (Rata)	
<i>INS-2</i>	Gen insulina (Rata)	
<i>INSR</i>	Gen <i>Insulin Receptor</i>	
IPEX	<i>Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome</i>	Síndrome de inmunodesregulación, poliendocrinopatía, enteropatía ligada a X
<i>Isl-1</i>	Gen <i>ISL LIM Homeobox 1</i>	
K⁺	Ion potasio	
K_{ATP}	Canal de potasio dependiente de ATP	
<i>KCNG2</i>	Gen <i>Potassium Voltage-Gated Channel Modifier Subfamily G Member 2</i>	
<i>KCNJ11</i>	Gen <i>Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 11</i>	
Kir6.2	Proteína <i>ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 11</i>	
<i>KLF11</i>	Gen <i>Kruppel Like Factor 11</i>	
KRB	<i>Krebs-Ringer Buffer</i>	
<i>LMX1A</i>	Gen <i>LIM Homeobox Transcription Factor 1 Alpha</i>	
MAF	<i>Minor Allele Frequency</i>	Frecuencia del alelo menos común
Maf	Gen <i>MAF BZIP Transcription Factor</i>	
miARN	micro ARN	
MIDD	<i>Maternally inherited diabetes and deafness syndrome</i>	Síndrome de diabetes y sordera de herencia materna
MODY	<i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i>	Diabetes del adulto de inicio en la juventud

MT-TE	Gen <i>Mitochondrially Encoded TRNA Glutamic Acid</i>	
MT-TK	Gen <i>Mitochondrially Encoded TRNA Lysine</i>	
MT-TL1	Gen <i>Mitochondrially Encoded TRNA Leucine 1 (UUA/G)</i>	
NeuroD1/BETA2	Gen <i>Neurogenic Differentiation Factor 1</i>	
NEUROG3	Gen <i>Neurogenin 3</i>	
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>	Secuenciación de nueva generación
NKX6.1	Gen <i>NK6 Homeobox 1</i>	
NOD	<i>Non Obese Diabetic mice</i>	Ratas diabéticas no obesas
PACAP1	Gen <i>Pituitary Adenylated Cyclase Activating Polypeptide 1</i>	Polipéptido activador de adenilato ciclasa
PAX4	Gen <i>Paired Box 4</i>	
PAX6	Gen <i>Paired Box 6</i>	
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	Reacción en cadena de la polimerasa
PDX1/IPF1	Gen <i>Pancreatic And Duodenal Homeobox 1</i>	
Pro	Prolina	
PTF1A	Gen <i>Pancreas Specific Transcription Factor, 1a</i>	
PTPRN2	Gen <i>Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type N2</i>	
QMPSF	<i>Quantitative Multiplex Polymerase chain reaction of Short Fluorescent fragments</i>	PCR múltiple cuantitativa de fragmentos fluorescentes cortos
RE	Reticulo endoplasmático	
RFX6	Gen <i>Regulatory Factor X6</i>	

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>	
RT-PCR	Real Time PCR (PCR a tiempo real)	PCR a tiempo real
SBS	Sequencing By Synthesis	Secuenciación por síntesis
Ser	Serina	
SLC19A2	<i>Gen Solute Carrier Family 19 Member 2</i>	
SLC2A2 (GLUT2)	<i>Gen Solute Carrier Family 2 Member 2</i>	
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>	Polimorfismo nucleótido único
STAT3	<i>Gen Signal Transducer And Activator Of Transcription 3</i>	
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>	Repetición corta en tándem
SUR1	<i>Proteína sulfonylurea receptor 1</i>	
TAE	<i>Tris base, acetic acid and EDTA</i>	Tampón Tris-acetato-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>	Solución salina tamponada con Tris
TBST	<i>Tris Buffered Saline with Tween 20</i>	TBS con tween 20
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbencidina	
TRB3	<i>Gen Pseudokinase Tribbles homolog 3</i>	
TRMA	<i>Thiamine responsive megaloblastic anemia</i>	Anemia megaloblástica responsiva a tiamina
URL	Unidades relativas de luciferasa	
UTR	<i>Untranslated region</i>	Región no traducida
VIC	<i>Fluoróforo</i>	
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana	
WEP	<i>Whole-Exome sequencing Pipeline web tool</i>	Herramienta web para el análisis de secuenciación de exoma completo
WES	<i>Whole Exome Sequencing</i>	Secuenciación de exoma completo
WFS1	<i>Gen Wolframin ER Transmembrane Glycoprotein</i>	
WT	<i>Wild Type</i>	

ZAC/PLAGL1 Gen *Zinc Activated ligand-gated ion Channel/Pleiomorphic Adenoma Gene-Like 1*

ZFP57 Gen *Zinc Finger Protein 57 Homolog*

ZnT8 Gen *Solute Carrier Family 30 (Zinc Transporter), Member 8*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	30
1. DIABETES MELLITUS: DEFINICIÓN	31
2. CLASIFICACIÓN DE LOS DIFERENTES TIPOS DE DIABETES	31
3. DIABETES MONOGENICA	34
3.1. Prevalencia y diagnóstico de la diabetes monogénica	35
4. CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES MONOGENICA	37
4.1. Diabetes MODY	37
4.2. Diabetes neonatal	41
4.2.1. Diabetes neonatal transitoria	44
4.2.1.1. <u>Mecanismos moleculares de la diabetes neonatal transitoria</u>	45
4.2.1.1.1. <i>Alteraciones en la región 6q24</i>	45
4.2.1.1.2. <i>Alteraciones en los canales K_{ATP}</i>	48
4.2.1.1.3. <i>Otras alteraciones</i>	49
4.2.2. Diabetes neonatal permanente	50
4.2.2.1. <u>Diabetes neonatal debida a alteraciones en los canales K_{ATP}</u>	50
4.2.2.1.1. <i>Mutaciones en el gen <i>KCNJ11</i></i>	54
4.2.2.1.2. <i>Mutaciones en el gen <i>ABCC8</i></i>	55
4.2.2.2. <u>Diabetes neonatal debido a mutaciones en el gen de la insulina</u>	56
4.2.2.3. <u>Diabetes neonatal debido a mutaciones en el gen de la glucoquinasa</u>	58
4.3. Diabetes sindrómica	59
4.3.1. Diabetes monogénica en un contexto autoinmune	59

4.3.2. Diabetes monogénica asociada a síndromes complejos	60
5. DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES NEONATAL	64
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	67
<hr/>	
ESTRATEGIA DEL ESTUDIO	71
<hr/>	
PACIENTES	75
<hr/>	
1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	76
1.1. Análisis de los genes asociados a la Diabetes monogénica	76
1.2. Búsqueda de nuevos genes	77
2. DESCRIPCIÓN DE LOS PACIENTES	78
2.1. Análisis de los genes asociados a la Diabetes monogénica	78
2.2. Búsqueda de nuevos genes	81
METODOLOGÍA	88
<hr/>	
1. ANÁLISIS DE LOS GENES ASOCIADOS A LA DIABETES MONOGÉNICA	89
1.1. Extracción de ADN	89
1.2. Amplificación de los genes mediante PCR	90
1.3. Secuenciación automática	91
1.4. Estudio de la región 6q24	92
1.4.1. <u>Análisis de microsatélites por PCR fluorescente para el estudio de isodisomía paterna de la región 6q24</u>	93
1.4.2. <u>PCR múltiple cuantitativa de fragmentos fluorescentes cortos para el estudio de duplicaciones en la región 6q24</u>	94

1.4.3. <u>Enzimas de restricción sensibles a la metilación</u>	95
<u>para el estudio de alteraciones de la metilación en el</u>	
<u>cromosoma 6 materno</u>	
1.5. Predicción <i>in silico</i> de las variantes detectadas	96
1.5.1. <u>Variantes missense</u>	96
1.5.2. <u>Variantes en regiones promotoras</u>	97
1.5.3. <u>Variantes en zonas de <i>splicing</i></u>	98
2. BÚSQUEDA DE NUEVOS GENES	100
2.1. Secuenciación del exoma completo (WES)	100
2.1.1. <u>Obtención de la librería: Preparación y captura del exoma</u>	102
2.1.2. <u>Inmovilización y amplificación de la librería</u>	105
2.1.3. <u>Secuenciación del exoma</u>	107
2.2. Análisis bioinformático de la secuenciación de exoma	107
completo y la identificación de nuevos genes candidato	
3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA VARIANTE	112
DETECTADA EN EL GEN <i>STAT3</i>	
3.1. Mutagénesis dirigida	112
3.2. Extracción de ADN plasmídico	113
3.3. Cultivo de líneas celulares	114
3.4. Transfección de plásmidos para la sobreexpresión génica	115
3.5. <i>Western-Blot</i>	116
3.6. Ensayo de luciferasa	117
3.7. Extracción de ARN y retrotranscripción	119
3.8. Análisis de expresión mediante ensayos Taqman	119
3.9. Análisis de la secreción de insulina	120
3.9.1. <u>Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)</u>	121

3.9.2. <u>Ensayo de BCA</u>	122
3.10. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	122
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	125
RESULTADOS	127
<hr/>	
1. ANÁLISIS DE LOS GENES ASOCIADOS A LA DIABETES NEONATAL	128
1.1. Análisis estructural de los genes clásicamente asociados a la diabetes neonatal	128
1.2. Correlación clínico-genética	131
2. BÚSQUEDA DE NUEVOS GENES	133
2.1. Análisis del exoma	133
3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN STAT3	137
3.1. La mutación identificada no afecta al estado de fosforilación de STAT3	139
3.2. La mutación identificada aumenta la actividad del factor de transcripción STAT3	141
3.3. La mutación activante en STAT3 provoca una disminución en la expresión del factor de transcripción Isl-1	143
3.4. La inhibición de Isl-1 provocada por el STAT3 mutado conduce a una disminución de la expresión de la insulina	145
3.5. La mutación activante identificada aumenta la capacidad de unión de STAT3 a la región promotora de Isl-1	148

3.6. La mutación en STAT3 provoca una disminución de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa	150
DISCUSIÓN	155
<hr/>	
1. ANÁLISIS DE LOS GENES CLÁSICAMENTE ASOCIADOS A LA DIABETES NEONATAL	156
1.1. Alteraciones en la región 6q24	158
1.2. Alteraciones en los canales de potasio	158
1.3. Alteraciones en el gen de la insulina	161
2. CORRELACIÓN CLÍNICO-GENÉTICA	163
3. ANÁLISIS DE EXOMA COMPLETO	165
4. BENEFICIOS DEL ANÁLISIS DE EXOMA COMPLETO EN EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE LA DIABETES NEONATAL	170
5. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN STAT3	172
CONCLUSIONES	177
<hr/>	
REFERENCIAS	180
<hr/>	
ANEXOS	206
<hr/>	

INTRODUCCIÓN

1. DIABETES MELLITUS: DEFINICIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un grupo heterogéneo de trastornos metabólicos de carácter crónico, cuya característica principal es la presencia de concentraciones elevadas de glucosa en sangre de manera persistente. Esta elevación se debe a defectos en la producción y/o acción de la insulina, o a una combinación de ambas ^{1,2}.

Son varios los procesos patológicos involucrados en el desarrollo de la diabetes, que van desde la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas (cuya consecuencia es una deficiencia de insulina) hasta anomalías que provocan una resistencia a la acción de la insulina en tejidos periféricos (músculo, etc.) ³.

2. CLASIFICACIÓN DE LOS DIFERENTES TIPOS DE DIABETES

Según la asociación Americana de Diabetes (*ADA, American Diabetes Association*), los diferentes tipos de diabetes pueden clasificarse en las siguientes categorías principales según el origen etiopatogénico que las caracteriza ⁴:

1. Diabetes mellitus tipo 1 (DM1). Diabetes debida a la destrucción de las células β pancreáticas, causada por mecanismos autoinmunes. La mayoría de las veces conduce a la absoluta deficiencia de insulina. Los pacientes con este tipo de diabetes presentan marcadores de autoinmunidad pancreática [anticuerpos anti-insulina (*IAA*), anti-descarboxilasa del ácido glutámico (*GADA*), anti-tirosinofosfatasa (*IA2A*) y/o anti-

transportador de zinc (*ZnT8*)]. Además, se asocia con ciertos haplotipos HLA siendo los haplotipos HLA*DR4-DQ8 y HLA*DR3-DQ2 los que mayor riesgo genético confieren ⁵.

2. Diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Diabetes debida a la pérdida progresiva de secreción de insulina por parte de las células β en un contexto de resistencia a la insulina. Inicialmente, no precisan tratamiento con insulina, pero a lo largo de la evolución de la enfermedad, si la deficiencia de insulina progresa, pueden necesitarla. En la mayoría de los casos se asocia además con obesidad.
3. Diabetes mellitus gestacional (DMG). Diabetes diagnosticada en el segundo o tercer trimestre del embarazo, y que no se conocía previa a la gestación.
4. Diabetes debidas a otras causas específicas:
 - a. Diabetes debidas a enfermedades exocrinas del páncreas (por ejemplo, la fibrosis quística)
 - b. Diabetes inducida por fármacos (por ejemplo, inducida por los glucocorticoides, o por el tratamiento contra el VIH).
 - c. Diabetes monogénica. Diabetes debida a defectos monogénicos que causan disfunción de la célula β pancreática.

La DM1 y la DM2 son enfermedades complejas, con herencia poligénica y en ellas además confluyen mecanismos ambientales que actualmente no están totalmente definidos ^{6,7}. Por otra parte, las denominadas diabetes monogénicas, son causadas por

mutaciones esporádicas o heredadas en genes que son cruciales para la función de las células β pancreáticas⁸.

Este proyecto se ha centrado en el estudio de la diabetes neonatal, un tipo de diabetes que se clasifica dentro de la categoría de diabetes monogénicas.

3. DIABETES MONOGÉNICA

La diabetes monogénica incluye un conjunto heterogéneo de diabetes causadas por mutaciones en un único gen ⁹. Puede ser familiar o esporádica, y en caso de ser familiar, la herencia puede ser dominante, recesiva o ligada al cromosoma X ¹⁰.

En los últimos años, se han identificado más de 30 genes asociados a diabetes monogénicas ¹¹, y además, un número importante de genes han sido asociados a síndromes que incluyen diabetes dentro de su cuadro clínico.

Los mecanismos moleculares que subyacen a la patogénesis de esta dolencia pueden afectar a diversos procesos importantes para la función basal de la célula β pancreática. Por ejemplo, un incorrecto desarrollo de la célula β , alteraciones en la expresión de genes implicados en la síntesis de insulina (por ejemplo, alteraciones en factores de transcripción que regulan la expresión de la insulina o alteraciones en el propio gen de la insulina), alteraciones en la secreción de la insulina (por ejemplo, mutaciones en los genes que codifican los canales de potasio), el fallo en la detección de los niveles de glucosa o el aumento del estrés del retículo endoplasmático (RE) que causa la destrucción de la célula β pancreática ¹²⁻¹⁴.

Desde el punto de vista clínico, la diabetes monogénica puede definirse en función de la edad de diagnóstico. Cuando se detecta en el momento del nacimiento o en los primeros meses de vida se habla de diabetes neonatal (DN). Sin embargo, cuando se

diagnostica más tarde, a menudo a partir de la segunda década de vida, se denomina diabetes tipo MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*).

La diabetes monogénica también se puede clasificar en función del defecto molecular que la provoca (gen de la insulina, genes que codifican los canales de potasio, factores de transcripción, etc.). Dependiendo de la alteración molecular, las características clínicas y las consecuencias terapéuticas pueden ser diferentes. Hoy en día se está sustituyendo el nombre de diabetes MODY o diabetes neonatal por la denominación más amplia y sencilla de diabetes monogénica, dado que se ha descrito que una misma mutación puede provocar diabetes en diferentes etapas de la vida ¹⁵.

3.1. Prevalencia y diagnóstico de la diabetes monogénica

Las formas monogénicas de diabetes a menudo no se detectan como tal ¹⁶ y son diagnosticadas erróneamente como DM1 o DM2 ¹⁷⁻¹⁹, por lo que se cree que la prevalencia está infraestimada, y se estima que alrededor del 5% de las diabetes pueden ser diabetes monogénicas.

El diagnóstico genético de la diabetes monogénica es crucial para determinar el tratamiento más adecuado y dar consejo genético a las personas que son portadores de las mutaciones. Permite, además, realizar predicciones sobre el curso de la diabetes y las complicaciones que puedan surgir a largo plazo ²⁰.

El ejemplo más claro de ello es la forma más común de la diabetes neonatal permanente (DNP), causada por mutaciones activantes en los canales de potasio

sensibles al ATP (K_{ATP}) (mutaciones en los genes *ABCC8* y *KCNJ11*)²¹⁻²³. Y es que la mayoría de los pacientes portadores de estas alteraciones pueden ser tratados exitosamente con sulfonilureas en lugar de las múltiples inyecciones diarias de insulina. Esta transición del tratamiento resulta en un mejor control glucémico y una notable mejora de la calidad de vida del paciente, lo que refuerza la importancia del diagnóstico genético^{22,24-28}.

Otros ejemplos que muestran la importancia del diagnóstico son las formas de MODY asociadas a alteraciones en los genes *HNF1A* y *HNF1B*, que a menudo son tratadas con éxito a base de dosis bajas de sulfonilureas^{29,30}, o el subtipo MODY asociado a mutaciones en heterocigosis en el gen de la Glucoquinasa (*GCK*), que provocan una leve hiperglucemia que rara vez necesita tratamiento farmacológico adicional a parte de un control de la dieta^{31,32}.

En alrededor de un 20% de los pacientes con criterios clínicos de diabetes monogénica no se identifica el defecto molecular responsable de la enfermedad^{33,34}. Aunque la secuenciación por Sanger sigue siendo la técnica más empleada para la identificación de alteraciones genéticas asociadas a esta patología, el desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación (*NGS*, *Next Generation Sequencing*) ha mejorado significativamente el diagnóstico genético y la identificación de nuevos genes involucrados en el desarrollo de la enfermedad³⁵⁻³⁷.

4. CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES MONOGENICA

Como ya se ha mencionado previamente, desde el punto de vista clínico, la diabetes monogénica puede clasificarse en función de la edad de diagnóstico, diferenciándola en diabetes neonatal o diabetes MODY. Sin embargo, dado que mutaciones en varios genes pueden provocar las características clínicas de las dos enfermedades, es más adecuado usar el término diabetes monogénica.

Basándonos en la clasificación más utilizada, los principales tipos de diabetes monogénica son: diabetes del adulto de inicio en la juventud o MODY, diabetes neonatal transitoria (DNT) o permanente (DNP) y diabetes asociada a síndromes.

4.1. Diabetes MODY

La diabetes monogénica de comienzo en la adolescencia o en la edad adulta se denomina diabetes tipo MODY. Engloba un grupo heterogéneo de diabetes no insulino-dependientes caracterizadas por una herencia autosómica dominante no autoinmune ³⁸.

Actualmente, se conocen catorce genes asociados a esta patología, pero la mayoría de las formas son causadas por mutaciones en seis de estos genes: *hepatocyte nuclear factor-4-alpha (HNF4A)*, *glucokinase (GCK)*, *hepatocyte nuclear factor-1-alpha (HNF1A)*, *páncreas/duodenum homeobox protein-1 (PDX-1)*, *hepatocyte nuclear factor-1-β (HNF1B)*, y *BETA2/Neurod1* ^{15,39,40}. La clasificación de los diferentes subtipos de MODY y las características clínicas de los mismos se resumen en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Clasificación de los diferentes subtipos de diabetes tipo MODY. Adaptada de Siddiqui

K. *et al* (2015) ⁴⁰.

NOMBRE	GEN	CROMOSOMA	OMIM	FRECUENCIA	REFERENCIA
MODY1	<i>HNF4A</i>	20q13.12	125850	Rara	Bell et al. (1991)
MODY2	<i>GCK</i>	7p13	125851	8-81%	Gidh-Jain et al. (1993)
MODY3	<i>HNF1A</i>	12q24.31	600496	21-73%	Yamagata et al. (1996)
MODY4	<i>IPF-1 (PDX-1)</i>	13q12.2	606392	Rara	Stoffers et al. (1997)
MODY5	<i>HNF1B</i>	17q12	137920	Frecuente	Horikawa et al. (1997)
MODY6	<i>Neuro-D1/BETA-2</i>	2q31.3	606394	Rara	Malecki et al. (1999)
MODY7	<i>KLF11</i>	2p25	610508	Rara	Neve et al. (2005)
MODY8	<i>CEL</i>	9q34.3	609812	Rara	Raeder et al. (2006)
MODY9	<i>PAX4</i>	7q32.1	612225	Muy rara	Plengvidhya et al. (2007)
MODY10	<i>INS</i>	11p15.5	613370	Muy rara	Edghill et al. (2008)
MODY11	<i>BLK</i>	8p23.1	613375	Muy rara	Borowiec et al. (2009)
MODY12	<i>ABCC8</i>	11p15.1		Muy rara	Ovsyannikova AK et al (2016)
MODY13	<i>KCNJ11</i>	11p15.1	616329	Muy rara	Bonfond et al. (2012)
MODY14	<i>APPL1</i>	3p14.3	616511	Muy rara	Prudente et al. (2015)

Tabla 2. Características clínicas de los principales subtipos de MODY. Tg: triglicéridos, SU: sulfonilureas, AGA: alteración de la glucemia en ayunas.

Adaptada del Tratado de diabetes mellitus.

	MODY1	MODY2	MODY3	MODY4	MODY5	MODY6
GEN	<i>HNF4A</i>	<i>GCK</i>	<i>HNF1A</i>	<i>IPF-1 (PDX-1)</i>	<i>HNF1B</i>	<i>Neuro-D1/BETA-2</i>
EDAD DE DIAGNÓSTICO	Adolescente/ adulto joven	Recien nacido	Adolescente/ adulto joven	Adulto joven	Adolescente/ adulto joven	Adulto joven
PENETRANCIA	>80%	DN:45% AGA: 95%	>90%	>80%	>80%	>70%
AFECTACIÓN	Páncreas/higado	Páncreas/higado	Páncreas/ riñón/otros	Páncreas/otros	Páncreas/higado/ riñón/genitales	Páncreas/otros
FENOTIPO	↓ Tg/ ↓ apo A II/ ↓ apo C III/ V Lpa	Bajo peso al nacer	↓ umbral renal glucosa/ ↑ sensibilidad a SU	Agenesia pancreática en homocigosis	Anomalías renales/ insuficiencia renal/ atrofia pancreática/ anomalías genitales	Desconocido
GRAVEDAD DE LA HIPERGLUCEMIA	Progresiva	Estable	Progresiva	Pocos datos	Progresiva	Progresiva
COMPLICACIONES MICROVASCULARES	Frecuentes	Raras	Frecuentes	Pocos datos	Frecuentes	Pocos datos
TRATAMIENTO	Dieta/ dosis bajas SU/ insulina	Ninguno excepto insulina en el embarazo	Dieta/ dosis bajas SU/ insulina	Insulina/ antidiabeticos orales	Metformina/ insulina	Insulina

Como norma general, la sintomatología se manifiesta despacio y en ausencia de obesidad o cetoacidosis en la mayoría de los casos. El tratamiento al inicio no suele requerir de insulina, aunque varía dependiendo de la mutación detectada en cada paciente ⁴¹.

La aparición de este tipo de diabetes puede darse tanto a edades tempranas, como durante la infancia, adolescencia o en la edad adulta, aunque normalmente suele manifestarse antes de los 25 años. Cabe destacar que en el caso de la diabetes MODY2, (asociada a mutaciones en heterocigosis en el gen *GCK*), la hiperglucemia leve está presente ya al nacimiento, aunque pueda diagnosticarse más tarde.

Debido a este amplio rango de aparición de la enfermedad, se desconoce la prevalencia exacta de la diabetes MODY. Además, existe un gran número de pacientes que padecen diabetes MODY diagnosticados erróneamente como DM1 o DM2. A pesar del dato, se cree que puede llegar a ser la causa de 2-5% de los casos de diabetes ^{42,43}.

4.2. Diabetes neonatal

La diabetes mellitus neonatal es un trastorno metabólico poco frecuente, con una incidencia menor de 1:100.000 recién nacidos. Se caracteriza por la aparición de hiperglucemia en los primeros seis meses de vida combinada con bajos niveles de insulina debido a alteraciones en la función de la célula β pancreática ⁴⁴.

Por razones clínicas, se reconocen dos grupos principales, la forma transitoria y la permanente, que difieren en la duración de la dependencia a la insulina. La DNT es un trastorno de la producción de insulina que se resuelve postnatalmente, aunque la mayoría de las veces reaparece, a menudo en la adolescencia. Representa entre el 50% y el 60% de los casos de diabetes neonatal ⁴⁵. En la DNP, el trastorno en la producción de insulina dura toda la vida y precisa tratamiento de por vida.

Aunque la mayoría de los casos de diabetes neonatal son aislados, muchos de los genes asociados a este tipo de diabetes provocan un cuadro sindrómico con múltiples alteraciones entre las que se encuentra la diabetes ⁴⁶.

Las formas más comunes de diabetes neonatal son las causadas por mutaciones en los genes *KCNJ11*, *ABCC8* e *INS* y alteraciones en la región 6q24 ⁴⁷, aunque se han identificado alrededor de 20 genes asociados a la patología (Tabla 3).

Tabla 3. Genes asociados a diabetes neonatal y las características clínicas asociadas.. DNT: diabetes neonatal transitoria. DNP: diabetes neonatal permanente. AR: autosómica recesiva. AD: autosómica dominante. N: Normal. *Adaptada de Polak M. et al (2007) ⁴⁷.*

GEN	TIPO DE DIABETES	HERENCIA	EDAD DE INICIO	PANCREAS/ FUNCION EXOCRINA	OTRAS CARACTERISTICAS
ZAC/PLAGL1 HYMAY (6q24)	DNT	Según alteración	primeros días de vida	N/N	CIR, macroglosia
ZFP57	DNT	AR	Similar a 6q24	N/N	CIR, macroglosia, retraso del desarrollo, defectos en la visión, epilepsia
PDX1	DNP	AR	primeros días de vida	Ausencia/Reducción	agenesia pancreática/hipoplasia
PTF1A	DNP	AR	primeros días de vida	Ausencia/Ausencia	hipoplasia cerebelosa/disfunción neurológica
HNF1B	DNP/DNT (RCAD; MODY5)	AD	15–17 días	Hipopláxico/reducido	atrofia pancreática, quistes renales
GLIS3	DNP	AR	primeros días de vida	Pequeño, N o quístico/ N o reducido	hipotiroidismo, glaucoma, alteraciones renales, dismorfia facial
KCNJ11	DNP DNT (rara vez)	AD	<6 meses; rara vez mas tarde	N/N	DEND
ABCC8	DNP DNT (rara vez)	AD	<6 meses; rara vez mas tarde	N/N	
INS	DNP DNT (rara vez)	AD (raramente AR)	<6 meses; a veces mas tarde	N/N	Rara vez CIR
GCK	DNP; MODY2	AR (PNDM) AD (MODY2)	PNDM: días; MODY2: presente al nacimiento (se detecta mas tarde)	N/N	
SLC19A2	DNP	AR	2– 13 meses	N/N	Síndrome de Rogers
SLC2A2	DNP	AR	primeros días de vida	N/N	Síndrome Fanconi-Bickel (FBS)

Tabla 3. Continuación.

GEN	TIPO DE DIABETES	HERENCIA	EDAD DE INICIO	PANCREAS/ FUNCION EXOCRINA	OTRAS CARACTERISTICAS
<i>FOXP3</i>	DNP	Ligado al X	Días–3.5 meses	N/N	Síndrome IPEX
<i>STAT3</i>	DNP	AD	Días		hipotiroidismo autoinmune, diarrea crónica
<i>EIF2AK3</i>	DNP	AR	2-28 semanas; 1 caso a los 30 meses	hipoplasia/ reducido	Síndrome Wolcott-Rallison (WRS)
<i>NEUROD1</i>	DNP	AR	meses	N/N	hipoplasia cerebelosa
<i>NEUROG3</i>	DNP	AR	primeros días de vida	Pequeño/N	diarrea congénita severa, ausencia de células enteroendocrinas
<i>RFX6</i>	DNP	AR	primeros días de vida	Pequeño/N	atresia intestinal, hipoplasia de vesícula biliar
<i>IER3IP1</i>	DNP	AR	al nacimiento-2 meses	N/N	microcefalia, encefalopatía epiléptica infantil
<i>PAX6</i>	DNP	AR	primeros días de vida	N/no descrito	microcefalia severa, defectos oculares
<i>WFS1</i>	DNP	AR	Media 6 años (3 semanas–14 años)	N/N	Síndrome de Wolfram (DIDMOAD)
<i>INSR</i>	DNP	AR	al nacimiento		Síndrome de Rabson-Mendelhall Leprechaunismo

4.2.1. Diabetes neonatal transitoria

La diabetes neonatal transitoria se caracteriza a menudo por un severo retraso del crecimiento intrauterino (CIR, Crecimiento Intrauterino Restringido) y el diagnóstico de la diabetes en los primeros días de vida. Estos casos de diabetes remiten de manera espontánea en unas 12 semanas, aunque al menos el 50% de los casos reaparece más tarde (a menudo en la adolescencia) ⁴⁸. El CIR está directamente relacionado con el papel crucial que juega la insulina en el crecimiento fetal, especialmente durante el último trimestre del embarazo.

En la mayoría de los casos las formas de diabetes transitorias se atribuyen a la sobreexpresión de los genes localizados en la región 6q24, que están sometidos al fenómeno del *imprinting* ⁴⁹. Se cree que la forma transitoria de la enfermedad se debe a defectos permanentes en genes que tienen una expresión variable durante el crecimiento y el desarrollo tanto de las células β pancreáticas como de otros tejidos. Un factor importante en el inicio de la recidiva de la diabetes es probablemente la pubertad, que se asocia con una resistencia significativa a la insulina ^{46,50}.

Generalmente la DNT es esporádica, pero la transmisión paterna se ha documentado en alrededor de un tercio de los pacientes descritos ^{51,52}. El tratamiento para estos pacientes suele ser insulina, aunque existen sugerencias sobre los beneficios de las sulfonilureas en este tipo de pacientes ⁵³.

4.2.1.1. Mecanismos moleculares de la diabetes neonatal transitoria

La mayoría de los casos de DNT se deben a anomalías en la región 6q24, mientras que alrededor de un 10% de los casos se atribuyen a mutaciones activantes en heterocigosis en los genes *KCNJ11* y *ABCC8* y otros genes ^{54,55}.

4.2.1.1.1. *Alteraciones en la región 6q24*

Un total del 70% de las DNT son causadas por defectos que causan la sobreexpresión paterna de genes imprintados localizados en la región 6q24 ⁵⁶. En individuos sanos, en esta región del cromosoma 6 el alelo procedente de la madre está sometido a *imprinting* genómico, es decir, no se expresa o no está activado, por lo que un individuo sin alteraciones solo expresará el alelo procedente del cromosoma paterno (tan sólo una copia es activa). Por el contrario, los pacientes con DNT presentan doble carga genética de los genes codificados en 6q24 ⁵⁷.

Esta doble carga genética puede deberse a tres defectos moleculares ^{49,56,58}:

1. *Duplicación en el cromosoma de origen paterno*. De nuevo existe una doble carga genética activa. Este defecto se presenta en el 45% de los pacientes (Figura 1).

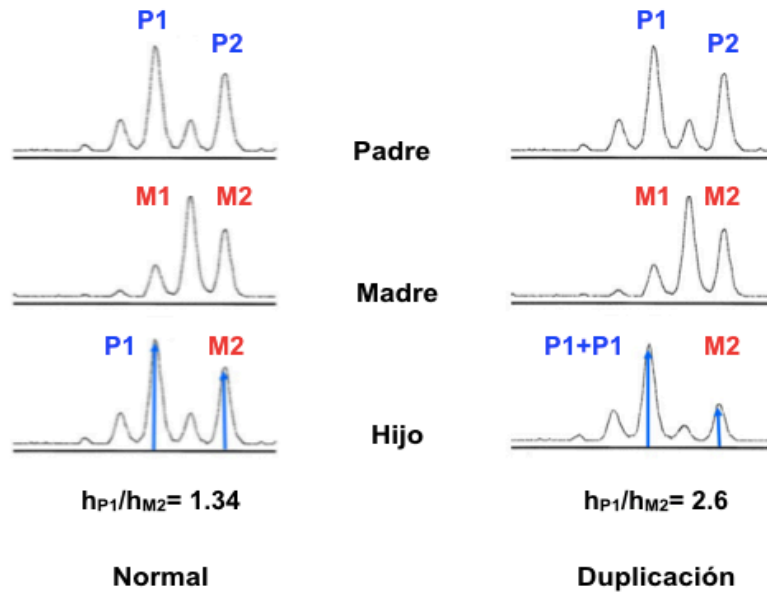


Figura 1. QMPSF para la detección de una duplicación del cromosoma y/o región paterno. P1 y P2: picos correspondientes a microsatélites heredados por vía paterna. M1 y M2: picos correspondientes a microsatélites heredados por vía materna. h_{P1} : altura del pico P1. h_{M1} : altura del pico M2. El ratio de la altura de los picos ronda el valor 1 en individuos normales, mientras que se dobla en individuos que portan una duplicación. Adaptada de Polak M. *et al* (2007) ⁴⁶.

2. *Isodisomía paterna.* En este caso el paciente hereda las dos copias del cromosoma 6 (al menos de la región 6q24) de su padre y ninguno de la madre. Por lo tanto, en estos individuos, ambos cromosomas estarán activos, es decir, presentarán una expresión duplicada de los genes que se encuentran en esta zona. Esta alteración se ha identificado en el 35% de los casos (Figura 2).
3. *Pérdida del imprinting en el alelo materno.* Se trata de alteraciones en la metilación de la región diferencialmente metilada (*DMR, Differentially Methylated Region*) en el cromosoma de origen materno que provocan que se expresen tanto los genes procedentes del padre como los procedentes de la madre (la ausencia de *imprinting* implica la expresión o activación del *locus*).

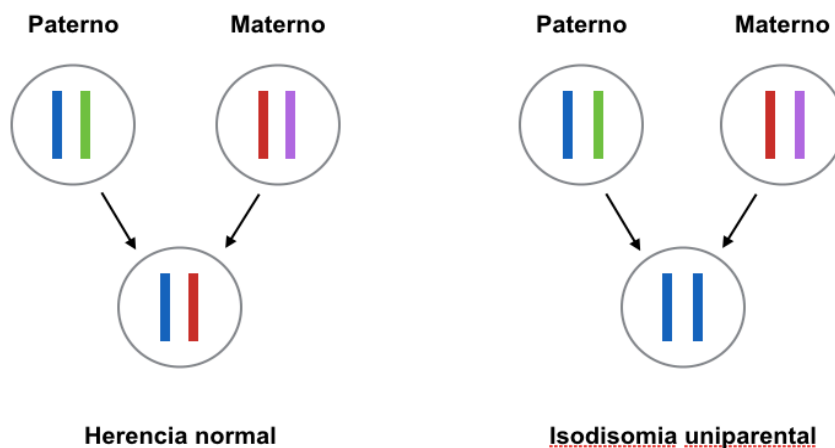


Figura 2. Isodisomía del cromosoma paterno. De forma general, un individuo recibe un cromosoma de cada progenitor. En este caso, hereda ambas copias por vía paterna. Adaptada de Polak M. *et al* (2007) ⁴⁶.

Se desconoce el mecanismo exacto por el cual las alteraciones en la región 6q24 causan DNT, aunque existen dos genes candidato que han sido propuestos como responsables etiológicos de la enfermedad: *ZAC* (*Z finger protein*) también conocido como *PLAG1* (*pleomorphic adenoma gene-like 1*) ^{59,60} e *HYMAI* (*Hydatiform mole-associated and imprinted transcript*) que codifica para un transcripto que no se traduce a proteína ^{60,61}.

Estudios recientes señalan al gen *ZAC* como el posible responsable de la DNT asociada a los defectos en la región 6q24 ⁶². Este gen codifica un factor de transcripción que interviene en la regulación del ciclo celular y la apoptosis, así como en la expresión del *PACAP1* (*Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polipeptide*), secretagogo de la insulina y estimulador de la proliferación de las células β ^{63,64}. La sobreexpresión de *ZAC* podría alterar la función pancreática, bien alterando la proliferación o la muerte programada de las células β pancreáticas o bien alterando la

regulación transcripcional del páncreas endocrino. También podría afectar a la expresión génica en las células β maduras, con la consiguiente alteración de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa u a otros estímulos ⁶⁵. El resultado sería una reducción de la masa de células β fetal y por tanto, un retraso del crecimiento intrauterino debido a la reducción de la insulina. Esto se traduciría a su vez en la aparición de diabetes neonatal en los primeros días de vida. En fases más tardías, parece que un número limitado de islotes es suficiente para la producción de insulina necesaria para mantener la normoglucemia, por tanto la diabetes remite. Algunos autores sugieren que cuando existe una resistencia fisiológica a la insulina, como por ejemplo la pubertad o el embarazo, o incluso un estrés metabólico (una enfermedad), se requieren altos niveles de insulina, y al no poder producirlos, se da una recidiva de la diabetes neonatal ⁶⁶.

4.2.1.1.2. Alteraciones en los canales K_{ATP}

Las mutaciones en los genes que codifican los canales de potasio sensibles al ATP (*KCNJ11*, *Potassium Voltage-Gated Channel subfamily J member 11* y *ABCC8*, *ATP Binding Cassette Subfamily C member 8*) suponen el 25% de los casos de DNT, aunque las alteraciones en dichos genes son más comunes en casos con DNP.

La DNT causada tanto por alteraciones en *KCNJ11* como en *ABCC8* es clínicamente difícil de diferenciar de la causada por alteraciones en la región 6q24, si bien en este último caso el peso al nacimiento suele ser menor y la diabetes suele aparecer antes ⁵⁴. El curso de la clínica es menos predecible y se caracteriza por una diabetes que remite y recidiva y que puede requerir tratamiento de manera intermitente durante toda la infancia ⁶⁷⁻⁶⁹. Parece que las formas transitorias debidas a alteraciones en la región 6q24 son las que mayor período de remisión tienen.

En algunos casos, hay familias en las que los padres u otros parientes manifiestan diabetes de inicio en el adulto asociadas a la misma mutación que el afecto con diabetes neonatal. Por ello, estudios recientes sugieren que analizar el gen *ABCC8* en pacientes con diabetes de inicio en el adulto o con ausencia de autoanticuerpos^{70,71} podría ayudar en el diagnóstico genético de este tipo de diabetes.

4.2.1.1.3. Otras alteraciones

Aunque de manera mucho menos frecuente, la DNT puede deberse a defectos moleculares en otros genes involucrados en el funcionamiento de la célula β pancreática.

Se han descrito casos de DNT asociados a mutaciones raras en el gen *HNF1B*⁷²⁻⁷⁴. En la mayoría de estos casos, los pacientes presentaban otras alteraciones además de la diabetes, como por ejemplo quistes renales, o disfunción exocrina del páncreas.

Mutaciones recesivas en la región promotora del gen de la insulina también se han determinado como la causa de la DNT o la DNP⁷⁵. Estos pacientes presentan una deficiencia de insulina menos severa. Clínicamente, se asemejan a los pacientes con DNT asociada a defectos en *KCNJ11*.

4.2.2. Diabetes neonatal permanente

La diabetes neonatal suele resultar permanente aproximadamente en un 50% de los afectados. Por definición, la diabetes se desarrolla en el período neonatal y no entra en remisión. No hay rasgos clínicos que puedan predecir si un recién nacido con diabetes, pero no otras características dismórficas, tendrá una enfermedad permanente o transitoria, aunque los casos con la forma permanente no siempre tienen crecimiento intrauterino restringido, como se ha visto en el algunos casos de 6q24 transitorio^{55,56}.

La causa más común de la diabetes neonatal permanente son las mutaciones activantes heterocigotas en los genes que codifican para los canales de potasio sensibles al ATP (K_{ATP}) de la célula β pancreática: *KCNJ11* y *ABCC8*⁷⁶. El 50% de los casos son debidos a alteraciones en dichos genes. Le siguen las alteraciones en el gen de la insulina (*INS*), siendo la causa de alrededor del 20% de las PNDM.

4.2.2.1 Diabetes neonatal debida a mutaciones activantes en los canales K_{ATP}

Las mutaciones activantes en los genes *KCNJ11* y *ABCC8* causan diabetes debido a que reducen la sensibilidad del canal al ATP^{21,23}.

El canal K_{ATP} es una estructura heterooctamérica compuesta por cuatro subunidades SUR1 (codificado por el gen *ABCC8*) que rodean cuatro subunidades Kir6.2 (codificado por el gen *KCNJ11*) que forman un poro central⁷⁷⁻⁷⁹. Las subunidades SUR1 que rodean el poro actúan como regulador de este.

Los canales K_{ATP} están presentes en diferentes tipos celulares, siendo un enlace directo entre el metabolismo y la actividad eléctrica celular. Participan en numerosos procesos fisiológicos tales como la secreción de insulina, la contracción muscular, la respuesta al estrés o la protección frente a la hipoxia o las convulsiones⁸⁰. En las células β pancreáticas, juegan un papel central en la secreción de insulina estimulada por glucosa⁸¹⁻⁸⁴.

Desde un punto de vista fisiológico, cuando las células β pancreáticas se encuentran en estado de reposo (los niveles plasmáticos de glucosa son bajos), los canales K_{ATP} permanecen abiertos debido al ratio bajo ATP/ADP (Figura 3). Esto permite el flujo de los iones de potasio (K^+) hacia el exterior. Este flujo mantiene la membrana hiperpolarizada, impidiendo la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje, previniendo así la entrada de los iones de calcio (Ca^{2+}) a la célula y por tanto la secreción de insulina. Cuando los niveles de glucosa en plasma aumentan, ésta se introduce en las células β a través del transportador GLUT2. La captación de glucosa en la célula β da como resultado la glucólisis, que conduce a la generación de ATP, y por tanto al aumento del ratio ATP/ADP. El ATP se une a la subunidad Kir6.2 del canal de potasio, provocando un cambio conformacional que a su vez provoca el cierre del canal. La detención del flujo de los iones de K^+ conlleva a la despolarización de la membrana, que a su vez provoca la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje. El flujo de Ca^{2+} al interior de la célula inducirá entonces la exocitosis de los gránulos de insulina con el objetivo de reducir los niveles de glucosa en sangre⁸⁵.

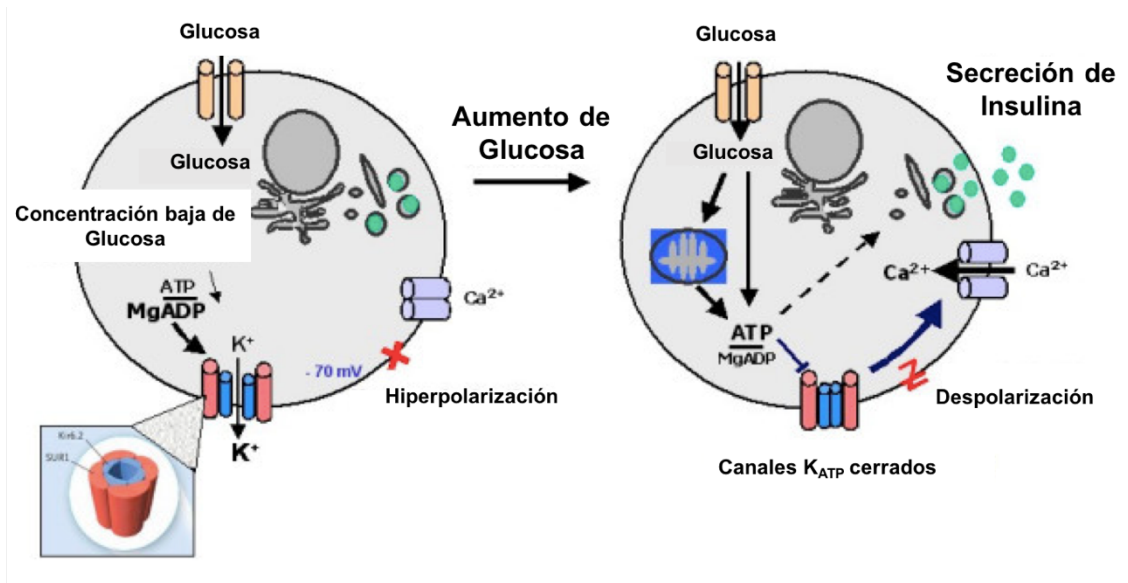


Figura 3. Representación gráfica del funcionamiento de los canales K_{ATP} en el proceso de secreción de insulina. Adaptada de Polak M. *et al* (2007)⁴⁶.

Debido a esta estrecha relación entre el funcionamiento de estos canales y la secreción de la insulina, cualquier alteración en dichos canales perturba la secreción de la misma. Así, las mutaciones de pérdida de función reducen la actividad del canal, manteniéndolo cerrado y produciendo una despolarización persistente de la membrana plasmática que conlleva la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje. El continuo flujo de Ca^{2+} al interior de la célula provoca la secreción continua de insulina, independientemente de los niveles de glucosa en sangre, causando hiperinsulinismo (Figura 4). Por el contrario, las mutaciones activantes o con ganancia de función, impiden el cierre del canal K_{ATP} . Por tanto, la célula β permanece hiperpolarizada incluso cuando los niveles de glucosa aumentan, de modo que los canales de calcio se mantienen cerrados. Al no existir aumento intracelular de Ca^{2+} , no se estimula la secreción de insulina, causando así la diabetes neonatal (Figura 5)

80,86,87

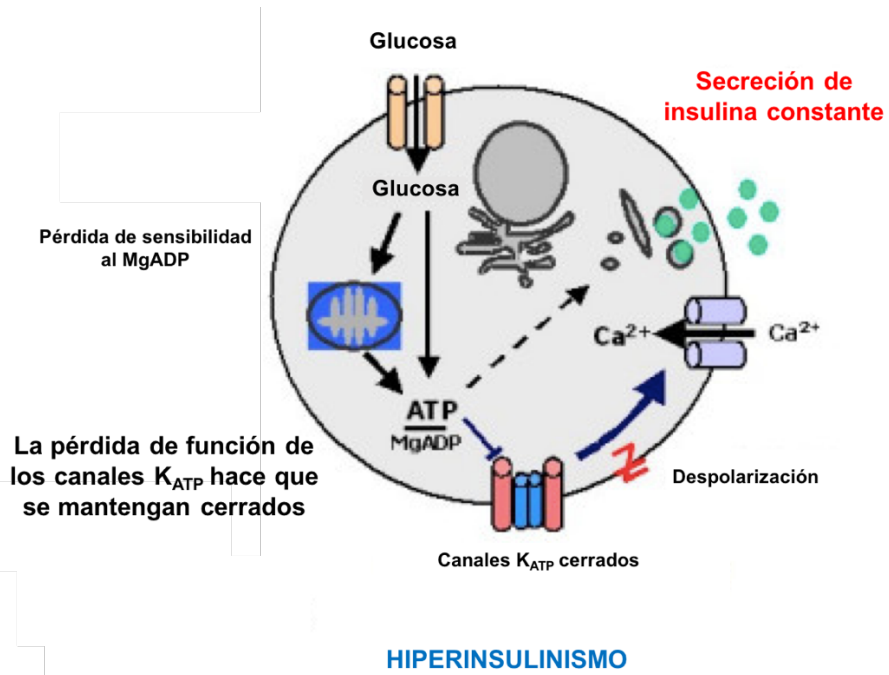


Figura 4. Representación gráfica del proceso de secreción de insulina cuando existen alteraciones en los canales K_{ATP} , provocando hiperinsulinismo. Adaptada de Polak M. *et al* (2007) ⁴⁶.

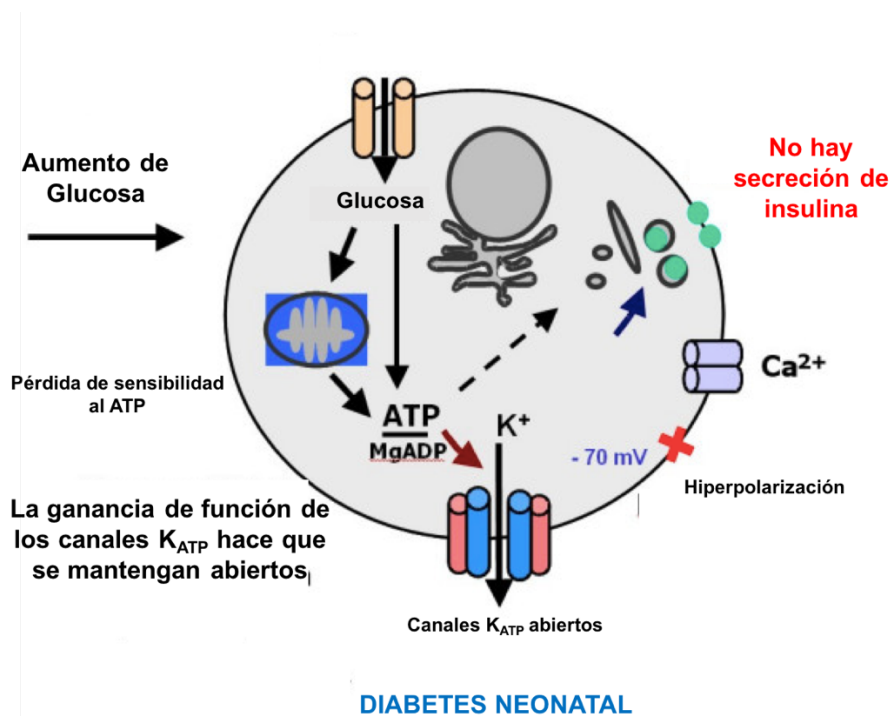


Figura 5. Representación gráfica del proceso de secreción de insulina cuando existen alteraciones en los canales K_{ATP} , provocando diabetes neonatal. Adaptada de Polak M. *et al* (2007) ⁴⁶.

En la mayoría de los casos, las mutaciones activantes en *KCNJ11* o *ABCC8* hacen que el canal K_{ATP} sea relativamente menos sensible al ATP, dejando los canales abiertos aun habiendo aumentado la concentración de glucosa. El resultado neto es el fracaso de la respuesta de la insulina a la hiperglucemia, que conduce a la diabetes neonatal ⁸.

4.2.2.1.1. Mutaciones en el gen *KCNJ11*

Las mutaciones en *KCNJ11* son *de novo* en el 80% de los casos y heredadas en un patrón autosómico dominante en los casos restantes. La diabetes se presenta desde el nacimiento hasta los 6 meses de edad con una edad promedio de inicio de 5 semanas.

Como ya hemos mencionado, las mutaciones en el gen *KCNJ11* dan como resultado una disminución de la sensibilidad de las subunidades de Kir6.2 al ATP, con fallo del cierre del canal y consecuentemente, una liberación insuficiente o una ausencia de liberación de insulina por parte de la célula β ²¹.

Además de en el páncreas, la proteína Kir6.2 también se expresa en otros tejidos, incluyendo tejido neuronal y muscular. Como consecuencia, aunque la mayoría de los pacientes con mutaciones en el gen *KCNJ11* presentan una diabetes aislada, aproximadamente un 20% tienen diversos grados de disfunción y deterioro neurológico. Las alteraciones neurológicas en su forma más grave comprenden un síndrome conocido como DEND (*Developmental delay-epilepsy-neonatal diabetes*). Como su propio nombre indica, este síndrome incluye alteraciones como el retraso del desarrollo, epilepsia y diabetes neonatal ⁸⁸. Cuando se producen perturbaciones neurodegenerativas más leves sin trastorno convulsivo, se denomina síndrome de

DEND intermedio (*iDEND*, *intermediate DEND*). Los pacientes pueden presentar además hipotonía, debilidad muscular y problemas de equilibrio⁸⁹. Se ha comprobado que el tratamiento con sulfonilureas en pacientes con el síndrome de DEND no solo mejora el control metabólico sino que alivia también las alteraciones neurológicas^{28,90}.

Existe una correlación genotipo-fenotipo en cuanto a la severidad de las mutaciones en *KCNJ11* y la clínica que muestran los pacientes⁹¹. Por ejemplo, casi todos los pacientes que tienen defectos en este gen padecen la forma permanente de diabetes neonatal. También se ha determinado una relación entre la mutación V59M en el gen *KCNJ11* y la aparición del síndrome de DEND⁹².

4.2.2.1.2. Mutaciones en el gen *ABCC8*

La DNP relacionada con *ABCC8* puede ser causada por mutaciones activadoras dominantes, así como mutaciones activantes recesivas o heterocigotas compuestas⁷⁶. La mayoría de las mutaciones en este gen son *de novo*, aunque también existen casos con herencia dominante o recesiva.

Las mutaciones en el gen *ABCC8* provocan que los canales permanezcan abiertos y que por tanto, la secreción de insulina dependiente de la glucosa no ocurra^{23,76}. Las alteraciones en este gen pueden provocar a DNT o DNP.

En contraste con el DNP relacionado con *KCNJ11*, el síndrome DEND/*iDEND* ocurre más raramente con las mutaciones en *ABCC8*. Esto podría reflejar diferencias en la expresión de SUR1 vs SUR2 en el cerebro, pero la región precisa involucrada es desconocida²³.

La detección de las mutaciones en los genes *KCNJ11* y *ABCC8* tiene importantes implicaciones terapéuticas ya que los pacientes portadores de estos defectos pueden reemplazar las inyecciones de insulina por un tratamiento oral con sulfonilureas, que resulta en un mejor control glucemia^{22,26,27,93}.

4.2.2.2. Diabetes neonatal debido a mutaciones en el gen de la insulina (*INS*)

Alrededor del 20% de los pacientes con una diabetes neonatal aislada presentan mutaciones en heterocigosis en el gen de la insulina (*INS*), aunque estas mutaciones han sido también asociadas a casos de MODY y de diabetes tipo 1 sin autoanticuerpos⁹⁴⁻⁹⁸.

La insulina es una hormona pancreática que se produce como preproinsulina, que se procesa a proinsulina y posteriormente, una vez se separa del péptido C, madura a insulina. Ésta se almacena en gránulos secretorios en las células β pancreáticas, pero se secreta rápidamente en respuesta a un aumento de los niveles de glucosa en sangre⁹⁹.

Las mutaciones en heterocigosis en el gen *INS* provocan la síntesis de una proinsulina estructuralmente anormal. Estudios realizados en modelos *in vitro* de célula β pancreática y en modelos animales sugieren que esta proinsulina anormal no se pliega adecuadamente y que en consecuencia se produce estrés del retículo endoplasmático^{98,100-104}. Una proinsulina plegada de manera anormal puede desencadenar una respuesta celular que facilita la degradación de dichas proteínas en el RE. La acumulación de proteínas mal plegadas genera estrés del RE, que provoca a su vez la apoptosis de las células β ^{94,98,100-102,105}. Estas mutaciones estarían

localizadas en regiones cruciales de la molécula de proinsulina, impidiendo el correcto pliegue de la proteína.

La mayoría de las mutaciones en este gen (80%) surgen *de novo*. Los portadores de mutaciones heterocigotas en el gen *INS* son usualmente diagnosticados en una edad más avanzada, al contrario que los portadores de mutaciones en los genes *KCNJ11* y *ABCC8*, que suelen ser diagnosticados no mucho más tarde de los primeros seis meses de vida ⁹⁴. El peso al nacer se reduce, como resultado de la disminución de la secreción intrauterina de insulina.

A diferencia de los portadores de mutaciones en *KCNJ11* y *ABCC8*, los pacientes con mutaciones en el gen *INS* únicamente pueden ser tratados con insulina ¹⁰⁶.

Por otro lado, también se han descrito mutaciones recesivas en el gen *INS* que causan DNP como resultado de la disminución en la biosíntesis de la insulina ⁷⁵. En este caso, el fenotipo es más severo, debutan antes y tienen menor peso al nacer ⁷⁵. Por último, también se han descrito deleciones grandes en el gen de la insulina como causa de la DN caracterizada por la completa deficiencia de insulina ¹⁰⁷.

Otra observación interesante es que los niños que heredan las mutaciones en el gen *INS* por vía paterna parecen manifestar la diabetes antes que los que la heredan por vía materna, lo que sugiere que en el *locus INS-IGF2* podrían estar involucrados mecanismos de *imprinting* ¹⁰⁸.

4.2.2.3. Diabetes neonatal debido a mutaciones en el gen GCK

La glucoquinasa es un enzima citoplasmática que cataliza la fosforilación en el carbono número 6 de la glucosa. Es un enzima clave en la regulación de la homeostasis de la glucosa en el organismo. En la célula β pancreática, este enzima actúa como sensor de glucosa integrando los niveles de glucemia con la secreción de insulina ¹⁰⁹.

Las mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas en el gen *GCK* causan una deficiencia total de la actividad de esta enzima y conducen a un cuadro de DNP con hiperglucemia severa ^{110,111}, mientras que las mutaciones en un único alelo (en heterocigosis) conducen a una hiperglucemia leve, no progresiva, que rara vez requiere tratamiento farmacológico (MODY2) ^{110,112}.

Se han descrito muy pocos pacientes con esta forma de diabetes neonatal, pero prácticamente en todos ellos la hiperglucemia se detecta desde el primer día de vida y se acompaña de un grave retraso del crecimiento intrauterino ^{110,111,113}.

Esta etiología molecular de la DN es más habitual en casos de consanguinidad o en familias con antecedentes de intolerancia a la glucosa o diabetes leve. Los pacientes con DNP asociada a mutaciones en *GCK* son tratados con insulina, pero la combinación de sulfonilureas con la terapia de insulina, resulta en un aumento de la secreción basal y estimulada de insulina ¹¹⁴. Además, en estos casos, el uso de fármacos activadores de la glucoquinasa podría ser un tratamiento más específico, lo que sería otro ejemplo de la farmacogenética aplicada en el tratamiento de esta patología ¹¹⁵⁻¹¹⁷.

4.3. Diabetes sindrónica

Existe una población pediátrica afectada por desórdenes genéticos raros que cursan con desarrollo de diabetes. Suelen ser síndromes multisistémicos de herencia autosómica recesiva, que requieren cuidados multidisciplinarios. Debido a la rareza y la complejidad de estos síndromes, muchas veces permanecen infradiagnosticados o se diagnostican demasiado tarde ¹¹⁸.

Se debería sospechar de diabetes sindrónica en casos en los que se han excluido las canalopatías o las mutaciones en los genes asociados más frecuentemente a la diabetes neonatal.

4.3.1. Diabetes monogénica en un contexto autoinmune

Aunque generalmente en la diabetes monogénica no hay respuesta autoinmune, algunas alteraciones monogénicas raras producen diabetes en un contexto de alteraciones autoinmunes con presencia de autoanticuerpos anti-isletos pancreáticos (por ejemplo, anti-GAD). Por ejemplo, la diabetes asociada a la poliendocrinopatía autoinmune tipo 1 (*APS1, Autoimmune polyendocrinopathy syndrome 1*), que está asociada a mutaciones en el gen *AIRE* (importante en la regulación de la autoinmunidad) ¹¹⁹, o las mutaciones en el gen *FOXP3*, que se asocian al síndrome IPEX (*Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked*). Las mutaciones en el gen *FOXP3* son la causa de la diabetes autoinmune monogénica neonatal ligada al cromosoma X, que aparece junto con otras características incluyendo la enteropatía que causa diarrea severa y desnutrición, eczema severo y enfermedad autoinmune tiroidea ¹²⁰.

Recientemente se han descrito mutaciones activantes en el gen *STAT3* (*Signal Transducer Activator of Transcription 3*), que asocian la diabetes de comienzo precoz a otros trastornos autoinmunes generalizados como la diarrea crónica o el hipotiroidismo autoinmune neonatal ¹²¹. Los pacientes descritos hasta la fecha, presentan variabilidad genética, con alteraciones autoinmunes diversas. Aunque clínicamente presenta características solapantes con el síndrome IPEX, genéticamente se asocia a mutaciones activantes en heterocigosis en el factor de transcripción STAT3.

4.3.2. Diabetes monogénica asociada a síndromes complejos

Además de los síndromes en los que aparece una diabetes en un contexto autoinmune, hasta la fecha se han descrito varios síndromes que conllevan diabetes sin autoinmunidad junto con otra serie de características.

Por ejemplo, hay cuadros de DNP con hipoplasia cerebelar que se asocian con alteraciones en el gen *NEUROD1* (*Neuronal Differentiation 1*) ¹²². Este gen juega un papel crucial en el desarrollo endocrino del páncreas y contribuye a la diferenciación de varios tipos celulares, entre ellos, la línea celular endocrina ¹²³ o la línea celular encargada de formar el cerebelo.

También causan hipoplasia cerebelar las alteraciones en el gen *PTF1A* (*Pancreas Specific Transcription Factor 1a*) que codifica una proteína esencial en el desarrollo normal del páncreas y del cerebelo ¹²⁴. Los pacientes con alteraciones en este último gen presentan además hipoplasia pancreática y disfunción exocrina.

Otro gen descrito asociado al cuadro diabético caracterizado por hipoplasia pancreática y disfunción exocrina es el gen *PDX1 (Pancreatic and Duodenal Homeobox 1)*¹²⁵. Este gen codifica un factor de transcripción involucrado en el desarrollo del páncreas y en la regulación de la expresión de la insulina dependiente de glucosa^{126–128}.

Por otro lado, la presencia de diabetes junto con atresia intestinal e hipoplasia de la vesícula biliar y diarrea se asocian a alteraciones en el gen *RFX6 (Regulatory Factor X6)*^{129–131} que tiene un papel crucial en la diferenciación de las células β pancreáticas¹³².

Así mismo, la aparición de diabetes junto con hipotiroidismo, glaucoma, quistes renales y fibrosis hepática se ha asociado a mutaciones en el factor de transcripción *GLIS3 (GLIS Famili Zinc Finger 3)*^{133,134}. El cuadro clínico asociado a los defectos moleculares en este gen, se debe a que *GLIS3* juega un papel fundamental en la represión y la activación de la transcripción durante el desarrollo de las células β pancreáticas, la tiroides, el ojo, el hígado y los riñones.

La diarrea persistente junto con la diabetes es un indicativo de alteraciones en *NEUROG3 (Neurogenin 3)*, implicado en el desarrollo de diversas células endocrinas, como por ejemplo las células β pancreáticas^{135,136}.

La diabetes que cursa junto con anomalías renales y/o genitourinarias es un indicativo de alteraciones en *HNF1B (HNF1 Homeobox B)*^{72,73,137}, que participa en la regulación del desarrollo de las nefronas y el páncreas embrionario.

Alteraciones en genes como el *IER3IP1* (*Immediate Early Respons 3 Interacting Protein 1*) o *PAX6* (*Paired Box 6*) son la causa de diabetes neonatal junto con alteraciones cerebrales, como por ejemplo, microcefalia y epilepsia infantil en el caso de los defectos en el gen *IER3IP1*¹³⁸, o malformaciones cerebrales, microcefalia y microftalmia en el caso de alteraciones en *PAX6*^{139,140}. La función de *PAX6* en la regulación de la transcripción es crucial en el desarrollo del tejido neuronal y en la diferenciación de las células precursoras de los islotes pancreáticos¹⁴¹. Respecto a la función de *IER3IP1*, se cree que media en el estrés del RE ejerciendo su acción en la diferenciación celular y en la apoptosis.

Los defectos mitocondriales también pueden asociarse a cuadros raros de diabetes. Así, las mutaciones en el ADN mitocondrial (concretamente en los genes *MT-TL1*, *MT-TK* y *MT-TE*) se asocian con un cuadro de diabetes de herencia materna junto con sordera (*MIDD-Maternally Inherited Diabetes and Deafness*)¹⁴².

El síndrome de Rogers o TRMA (*Thiamine Responsibe Megaloblastic Anemia*), que asocia diabetes, sordera y anemia megaloblástica, se debe a mutaciones en el gen *SLC19A2* (*Solute Carrier Family 19 Member 2*)¹⁴³⁻¹⁴⁶, que codifica para un transportador de tiamina.

El síndrome de Wolfram o DIDMOAD (diabetes insípida, diabetes mellitus, atrofia óptica y sordera), con herencia autosómica recesiva, se asocia con mutaciones en el gen *WFS1* (*Wolframin ER Transmembrane Glycoprotein*)¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Esta proteína participa en la regulación intracelular del calcio, modulando el calcio almacenado del RE.

El síndrome de Wolcott-Rallison, donde la diabetes se asocia con displasia espondiloepifisaria, presenta mutaciones en el gen *EIF2AK3* (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 3*)^{150,151}. Este gen codifica una proteína que regula la respuesta celular frente al estrés de RE. El estrés del RE surge debido a la acumulación de proteínas mal plegadas, fenómeno habitual en las células secretoras. En condiciones normales, el estrés desencadena mecanismos compensatorios para evitar el daño celular, en las que participa la proteína EIF2AK3. La ausencia de esta proteína impedirá esos mecanismos compensatorios, provocando la muerte celular tanto en células endocrinas como exocrinas.

El síndrome de Fanconi-Bickel (FBS), se desarrolla por mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas en el gen *SLC2A2*, que codifica el transportador de glucosa, GLUT2¹⁵²⁻¹⁵⁴. Este síndrome implica hepatomegalia, disfunción tubular proximal renal, pérdida de fosfato, retraso de la pubertad y baja estatura, hipergalactosemia y diabetes¹⁵⁵.

Otros cuadros de marcada resistencia a la insulina, como el *Leprechaunismo* o el síndrome de *Rabson-Mendenhall*, se deben a mutaciones en el receptor de la insulina¹⁵⁶. La forma más grave es el *leprechaunismo* o *síndrome de Donohue*, que se caracteriza por retraso del crecimiento intrauterino, alteraciones del control de la glucemia, hiperinsulinemia y rasgos dismórficos¹⁵⁷. El *síndrome de Rabson-Mendenhall* es algo menos grave y presenta algunas diferencias fenotípicas con el anterior como por ejemplo la dentición precoz¹⁵⁸.

5. DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES NEONATAL

La diabetes neonatal es un ejemplo de la medicina personalizada, en la que los progresos en la genética de la enfermedad no solo han permitido ofrecer un mejor consejo genético, sino que también ha permitido conocer mejor la fisiopatología que subyace, preveer su evolución y, por supuesto, seleccionar un tratamiento adecuado para cada defecto molecular ¹⁵⁹. Y es que la identificación temprana de las causas genéticas puede influir en el tratamiento. En los casos en los que es producida por alteraciones en un canal de potasio, la terapia con insulina puede ser reemplazada más eficazmente por otros agentes como las sulfonilureas. Otro ejemplo es el del síndrome de Wolcott-Rallison. El análisis genético permite diagnosticar este subtipo de diabetes neonatal antes de que los pacientes desarrollen displasia del esqueleto o fallo hepático.

Aunque la causa más común de esta patología es la presencia de mutaciones en los genes que codifican para las proteínas que forman los canales de potasio (*ABCC8* y *KCNJ11*), mutaciones en otros 19 genes, así como alteraciones en la metilación de una región cromosómica pueden producir diferentes subtipos clínicos de la enfermedad.

La amplia lista de genes asociados a la enfermedad hace que cada vez sea más lento, laborioso y costoso secuenciar todos los genes posibles usando los métodos tradicionales (secuenciación Sanger). Incluso la secuenciación de los tres genes más frecuentes es costosa, dado que el gen *ABCC8* es muy grande (39 exones). Además, la correcta elección de los genes a testar utilizando este método se basa en la disponibilidad de información fenotípica fiable y completa ^{24,160}, y no siempre es posible obtenerla. En este sentido, la NGS y los análisis informáticos

probablemente se convertirán en el estándar para el cribado de alteraciones que puedan causar diabetes neonatal. Varios estudios ya han demostrado la eficacia de algunas plataformas comerciales estándar para la secuenciación de exoma completo en este tipo de pacientes ³⁹. Además de ser un enfoque más rentable y eficiente para la detección de genes conocidos, es muy probable descubrir nuevas causas genéticas para los pacientes con etiologías desconocidas. A medida que el costo de estas técnicas disminuye, es posible la expansión de las pruebas en otras poblaciones de pacientes diabéticos que aunque no son tratables con sulfonilureas pueden beneficiarse de descubrir un diagnóstico genético, ya que los avances en la comprensión de la fisiopatología de otras causas de la diabetes neonatal pueden conducir a tratamientos más eficaces.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Los diversos estudios realizados en torno a la genética de la diabetes neonatal han revelado mutaciones puntuales y alteraciones cromosómicas asociadas a la patología en más de 30 genes. Sin embargo, alrededor del 20% de los casos de diabetes neonatal no han sido diagnosticados genéticamente y se desconocen cuáles son las alteraciones moleculares que provocan el desarrollo de la enfermedad..

Teniendo en cuenta que la diabetes neonatal es una enfermedad monogénica, se asume que el desarrollo de la misma se debe a mutaciones en un solo gen y que probablemente, dichas mutaciones se encuentran en regiones codificantes o en regiones que pueden afectar directamente a la expresión o función de un producto génico.

En ese contexto, la hipótesis del presente trabajo es que en aquellos casos de diabetes neonatal en los que no se han identificado mutaciones en los genes clásicamente asociados a la enfermedad, el análisis de exoma es una estrategia eficaz para la detección de nuevas mutaciones en genes que no han sido previamente relacionados con la patología.

OBJETIVO PRINCIPAL

Identificar mediante análisis de exoma nuevos genes asociados a la diabetes neonatal en pacientes en los cuales no se ha detectado ninguna alteración etiológica en los genes clásicamente asociados a la enfermedad.

Objetivos específicos

1. Realizar el análisis estructural de los genes o regiones clásicamente asociados a la diabetes neonatal (*ABCC8*, *KCNJ11*, *INS* y la región 6q24) en nuestra cohorte de pacientes.
2. Establecer la relación genotipo-fenotipo entre el defecto molecular de cada paciente y las características clínicas que presenta.
3. Identificar mediante análisis de exoma nuevos genes que puedan explicar el desarrollo de la enfermedad en pacientes con DN sin causa genética conocida.
4. Realizar la caracterización funcional de las alteraciones identificadas en el análisis del exoma con el fin de establecer el impacto funcional de las variantes en la patogénesis de la enfermedad a nivel de célula β pancreática.

ESTRATEGIA DEL ESTUDIO

Este estudio se llevó a cabo en tres fases:

1. Análisis de los genes asociados a la Diabetes monogénica

En esta primera fase se realizó un estudio genético en una selección de pacientes con criterios de diagnóstico para diabetes neonatal.

Se decidió analizar los genes o regiones asociados a la diabetes neonatal con mayor frecuencia: *KCNJ11*, *ABCC8*, *INS* y la región *6q24*.

En el caso de identificar alguna variante en alguno de estos genes, se realizaron búsquedas en bases de datos de mutaciones ya identificadas y asociadas a la enfermedad, con el fin de verificar si la alteración identificada ya se ha descrito. En los casos en los que las alteraciones identificadas no habían sido previamente asociadas a la patología, se analizó el posible impacto funcional de las alteraciones mediante estudios *in silico*, usando diferentes software de predicción (*SIFT*, *Polyphen*, *MutationTaster*).

2. Búsqueda de nuevos genes

En esta fase, se analizaron pacientes sin alteraciones en los genes clásicamente asociados a la diabetes neonatal. Se realizó la secuenciación del exoma completo en ocho pacientes junto con sus progenitores, con el fin de identificar mutaciones que expliquen la diabetes que padecen.

3. Caracterización funcional de variantes potenciales

Por último, en base a los resultados del exoma, se realizó la caracterización funcional de una de las alteraciones potenciales detectadas por WES para poder establecer si realmente pudiera ser la causante de la patología.

PACIENTES

Para llevar a cabo el estudio de detección de alteraciones asociadas a la diabetes neonatal, se establecieron una serie de criterios clínicos y genéticos, con el fin de seleccionar los pacientes que pudieran beneficiarse de este diagnóstico.

1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1.1. Análisis de los genes asociados a la Diabetes monogénica

Para esta primera fase del estudio genético, en la que se analizaron los genes asociados clásicamente a la diabetes neonatal, se incluyeron todos aquellos pacientes con criterios clínicos de diagnóstico de diabetes monogénica neonatal. Las muestras de estos pacientes junto con los datos clínicos, procedentes de hospitales de toda España, fueron remitidas a la Unidad de Investigación de Endocrinología y Diabetes del Hospital Universitario de Cruces.

Finalmente, se obtuvieron para el estudio 42 familias remitidas entre los años 2009 y 2016.

Para la selección de estos pacientes, se establecieron los siguientes criterios de diagnóstico de diabetes neonatal:

- Diabetes diagnosticada en los primeros 6 meses de vida, o diagnosticada dentro del primer año de vida, con ausencia de autoinmunidad

Se obtuvo el correspondiente consentimiento informado para cada paciente. En los casos en los que los pacientes eran menores de 12 años, el consentimiento fue autorizado y firmado por sus padres o tutores legales. En los casos en los que los pacientes tenían una edad comprendida entre los 12 y 16 años, el consentimiento fue autorizado por los padres o por el propio paciente en los casos que se consideró al paciente emocional e intelectualmente capaz de comprender la información. A partir de los 16 años, el consentimiento fue autorizado y firmado por el propio paciente. Además de las muestras de los pacientes, se solicitaron datos clínicos con el fin de poder guiar de manera más precisa el diagnóstico genético y de establecer lazos entre el fenotipo y el genotipo (edad de diagnóstico, nivel de glucemia al diagnóstico, autoanticuerpos anti-páncreas, tratamiento, etc.).

1.2. Búsqueda de nuevos genes

Para el estudio de exoma completo se incluyeron 8 familias con criterios de diabetes monogénica neonatal cuyo diagnóstico permanecía sin esclarecer después de analizar los genes más frecuentes asociados a la enfermedad.

De estas 8 familias, 5 correspondían a la primera fase del estudio realizado, mientras que las otras 3 (DM0258, DM1026 y DM1119) se seleccionaron después de hacer una revisión completa de todos los pacientes existentes en nuestra base de datos, por lo que pertenecen a un estudio previo realizado entre los años 2002 y 2009. Se establecieron los siguientes criterios de selección:

- Diabetes diagnosticada en los primeros 6 meses de vida, o diagnosticada dentro del primer año de vida, con ausencia de autoinmunidad

- Ausencia de diagnóstico genético después del análisis de los genes conocidos por estar asociados a diabetes neonatal.

2. DESCRIPCIÓN DE LOS PACIENTES

2.1. Análisis de los genes asociados a la Diabetes monogénica

Los datos clínicos de los 42 pacientes con criterios de diagnóstico de diabetes neonatal incluidos en este estudio se resumen en la Tabla 4.

En resumen, la mediana de la edad de diagnóstico fue de alrededor de un mes (siendo el mínimo el diagnóstico al nacimiento y el máximo 1 año). Con una mediana de peso al nacimiento de 2410 g (máximo), el 26% de los pacientes presentó retraso de crecimiento intrauterino, el 12% presentó valores de peso y/o altura normales para la edad gestacional, mientras que del resto no obtuvimos datos.

Con una mediana de 431 mg/dl de valor de glucemia al diagnóstico, el 35% de los casos debutó con cetoacidosis metabólica, frente al 24% que únicamente presentó glucemias alteradas.

10 de los casos fueron catalogados como diabetes neonatales transitorias (24%) y 13 como diabetes neonatales permanentes (31%), mientras que el resto se catalogaron como diabetes neonatales sin especificar el tipo.

En 18 de los casos existía historia previa familiar conocida de diabetes y en 17 casos el paciente era el primer caso de diabetes en la familia. En 7 de los casos no pudimos obtener datos sobre los antecedentes familiares.

Tabla 4. Datos clínicos de los pacientes con criterio de Diabetes neonatal remitidos a la Unidad de investigación de Endocrinología y Diabetes del Hospital de Cruces. Dx: edad al diagnóstico. EG: edad gestacional. PN: peso al nacimiento. RCI: retraso de crecimiento intrauterino. Glu: glucemia al diagnóstico. AF: antecedentes familiares.

FAMILIA	SEXO	TIPO DN	Dx	EG	PN	RCI	GLU BASAL (mg/dl)	CETOACIDOSIS	AF
DM1603	V	DNP	40 días	-	-	-	-	-	SI
DM1665	M	DNT	4 meses	38+6	1770	SI	-	-	NO
DM1679	V	DN	10 meses	41	2800	-	850	SI	SI
DM1721	V	DNT	5 días	38	1830	SI	-	-	SI
DM1822	M	DNP	2 meses	40	2710	NO	230	NO	NO
DM1889	V	IPEX	31 días	40+1	2500	-	628	NO	-
DM1978	M	DNP	3 meses	-	-	-	334	SI	-
DM1985	V	DNP	3 meses	40	3750	-	-	SI	NO
DM1986	V	DNP	6 meses	-	3010	NO	452	SI	SI
DM1997	M	DNT	7 días	-	-	-	-	-	NO
DM2039	V	DNP	7 meses	-	-	-	-	-	NO
DM2104	V	DN	6 meses	-	-	-	118	NO	SI
DM2112	M	DNP	3 meses	39	2420	SI	-	-	NO
DM2138	V	DN	1 día	39	3145	-	286	-	-
DM2141	M	DN	6 meses	-	-	-	-	-	-
DM2175	V	DNT	1 mes	38	2970	-	347	NO	SI
DM2180	M	DNP	10 días	41+5	2350	-	850	SI	NO
DM2349	M	DNT	2 meses	40	3130	-	1010	SI	SI
DM2489	V	DNT	5 meses	-	-	NO	410	SI	SI
DM2496	M	DNT	5 meses	40	2400	-	-	SI	SI
DM2504	V	DNP	3 meses	37	2750	-	-	SI	SI
DM2509	M	DNT	14 días	40	2235	SI	-	NO	NO
DM2517	M	DN	40 días	-	-	-	-	-	SI
DM2566	V	DNP	al nacimiento	37	1870	SI	800	SI	SI

Tabla 4. Continuación.

FAMILIA	SEXO	TIPO DN	Dx	EG	PN	RCI	GLU BASAL (mg/dl)	CETOACIDOSIS	AF
DM2579	V	DNT	Periodo neonatal	40	2020	SI	-	-	NO
DM2598	M	DNP	14 días	39	3200	-	200	NO	NO
DM2622	M	DNT	24 días	40	2420	-	452	NO	NO
DM2658	V	DN	al nacimiento	39	3070	NO	-	-	NO
DM2770	V	DN	12 meses	-	-	-	-	-	NO
DM2798	M	DNP	2 meses	-	2800	NO	-	-	SI
DM2812	V	DN	2 días	36	1440	SI	-	-	SI
DM2854	V	DN	8 días	38	2660	-	176	NO	SI
DM2921	V	DN	-	37+6	1630	SI	-	SI	SI
DM2941	V	DN	2 días	38+2	2285	-	143	NO	-
DM3027	V	DNP	2 meses	39	2300	-	-	SI	SI
DM3034	V	DN	1 día	34+2	1770	SI	250	NO	SI
DM3074	M	DN	12 días	32	1300	-	-	-	-
DM3097	M	DN	2 días	38+5	2195	SI	-	-	-
DM3176	V	DN	2 días	27	750	-	-	-	NO
DM3194	V	DN	7 meses	40	4560	-	1496	SI	NO
DM3272	M	DN	1 mes	39+3	2146	SI	800	SI	NO
DM3344	V	DN	1 mes	-	2390	-	700	SI	NO

2.2. Búsqueda de nuevos genes

Las características clínicas de los 8 candidatos seleccionados para el estudio de exoma completo se detallan a continuación. En la Figura 6 se pueden observar los pedigrís de las 8 familias seleccionadas.

2.2.1. DM0258

Varón nacido en 1997, consta de un cuadro sindrómico además de presentar diabetes neonatal permanente. 39 semanas de edad gestacional y 2440 g de peso al nacimiento.

Presenta diabetes neonatal desde los 17 días de vida (en tratamiento con insulina), que comenzó con hiperglucemias que ascendían hasta 500 mg/dl, glucosuria, pero sin cetonuria ni grave afectación del estado general.

Además, se diagnosticó de hipotiroidismo no autoinmune, hipoacusia bilateral mixta (transmisión y neurosensorial), catarata congénita y talla baja (con retraso ponderoestatural). Ha presentado varios episodios de infecciones en el tracto urinario e hiperpotasemia idiopática durante los primeros 3 meses de vida. Además, padece diarrea crónica.

No presenta antecedentes familiares relacionados con la diabetes. Padre sano y madre intervenida de cardiopatía congénita a los 5 años.

Debido a las características clínicas del paciente se realizó estudio mitocondrial que resultó negativo. Posteriores análisis de la región 6q24 y de los genes *KCNJ11*, *INS*, *FOXP3*, *GCK*, *CDK4*, *MODY4* y *GATA6* también resultaron negativos.

2.2.2. DM1026

Varón nacido en 2004, diagnosticado de diabetes neonatal a los 18 días de vida y en tratamiento con insulina. Ingresó con deshidratación severa e hiperglucemia (1161 mg/dl), glucosuria y cetonuria, diagnosticándose como cetoacidosis diabética neonatal.

Parto eutócico a las 35+3 semanas, con un peso al nacimiento de 2800 g. No presenta antecedentes familiares de Diabetes. No presenta anticuerpos y la ecografía abdominal muestra un páncreas normal.

El análisis de la región 6q24 y de los genes *KCNJ11*, *ABCC8*, *INS*, *FOXP3*, *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A* y *HNF1B* resultó negativo.

2.2.3. DM1119

Varón nacido en 2005. Recién nacido pretérmino (36 semanas) con bajo peso para edad gestacional. Diagnosticado de diabetes neonatal permanente e insuficiencia pancreática exocrina junto con la detección de un quiste pancreático. También presenta enteritis autoinmune.

Abuela materna con 8-9 gestaciones que no llegaron a término o con muerte neonatal (en todo los casos eran varones). Madre y padre sanos.

El análisis de la región 6q24 y de los genes *KCNJ11*, *ABCC8*, *INS*, *FOXP3*, *GCK*, *IPF1*, *HNF1B* y *GATA6* resultó negativo.

2.2.4. DM1603

Mujer diagnosticada de diabetes neonatal a los 40 días de vida en tratamiento con insulina. Hija diagnosticada de diabetes a los 7 meses y también en tratamiento con insulina.

El análisis de la región 6q24 y de los genes *KCNJ11*, *ABCC8*, *INS*, *GCK* y *HNF4A* resultó negativo.

2.2.5. DM1985

Mujer nacida en 1985 diagnosticada de diabetes neonatal con anticuerpos anti-IA2 detectables a los tres meses de vida. Edad gestacional 40, y peso al nacimiento 3750g.

Esta paciente presenta además hipotiroidismo neonatal con anticuerpos anti-tiroideos positivos al nacimiento. Desarrollo diarrea acuosa a los 13 meses, por lo que se le diagnosticó de enfermedad celiaca (CD) (portaba anticuerpos anti-gliadina positivos y una atrofia duodenal parcial). Ha sufrido episodios frecuentes de diarrea

acuosa en ausencia de sangre o mucosa. El diagnóstico de CD fue corregido a colitis y gastritis colágena a los 15 años. La paciente presentó un crecimiento adecuado hasta los 4 años, donde comenzó a presentar una disminución de la velocidad, que llegó a alcanzar talla en -3 DE.

El análisis de los genes *KCNJ11*, *ABCC8*, *INS*, y *GATA6* resultó negativo.

2.2.6. DM1997

Mujer nacida en 1988, con diabetes neonatal transitoria-recidivante. Anticuerpos negativos y en tratamiento con insulina. La diabetes neonatal se diagnosticó a los 7 días de vida, y persistió hasta los 3 meses. Nuevo diagnóstico de diabetes a los 12 años. Actualmente en tratamiento con insulina, a dosis bajas y con un buen control glucémico. Además, presenta encefalopatía, insuficiencia renal y una minusvalía por hipoxia cerebral. No tiene antecedentes de diabetes en la familia.

El análisis de la región 6q24 y de los genes *KCNJ11*, *ABCC8*, *INS* y *GCK* resultó negativo.

2.2.7. DM2180

Mujer nacida en 2010 diagnosticada de diabetes neonatal a los 10 días de vida con autoinmunidad negativa. Edad gestacional 41+5 con un peso al nacer de 2350 g.

Ingresó a los 10 días de vida por fallo de medro. Destaca en su ingreso la acidosis metabólica y glucemias de 850 mg/dl. A los 3 años continua en tratamiento con insulina sin mostrar ninguna otra alteración.

No presenta antecedentes familiares de diabetes.

El análisis de la región 6q24 y de los genes *KCNJ11*, *ABCC8*, *INS* y *GCK* resultó negativo.

2.2.8. DM2566

Varón nacido en 2011 diagnosticado de diabetes neonatal al nacimiento con anticuerpos negativos y en tratamiento con insulina (se intenta tratar con sulfonilureas hasta dosis máxima sin respuesta). Presento retraso del crecimiento intrauterino detectado en ecografía del tercer trimestre. Debuta a las 18 horas de vida con acidosis metabólica y glucemias de más de 800 mg/dl.

Padece además, hipoplasia del arco aórtico, comunicación interventricular y estenosis de ramas pulmonares. También anemia y coagulopatía.

Madre con diabetes gestacional en tratamiento con metformina e insulina. Presenta además síndrome de Merkersson (inflamaciones orofaciales, parálisis fácil y lengua fisurada). Padre con hipotiroidismo en tratamiento sustitutivo.

El análisis de la región 6q24 y de los genes *KCNJ11*, *ABCC8*, *INS*, *GCK*, y *GATA6* resultó negativo.

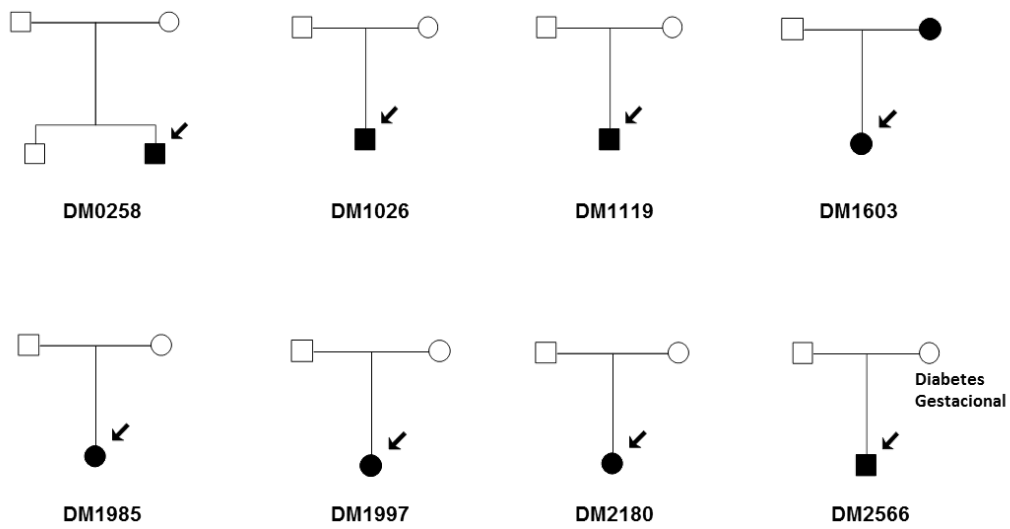


Figura 6. Pedigrís de las 8 familias candidatas a realizar la secuenciación de exoma completo (WES). Los cuadrados corresponden al sexo masculino y los círculos al femenino. El caso índice se muestra señalado con una flecha. Las personas con diabetes se muestran en negro.

METODOLOGÍA

1. ANÁLISIS DE LOS GENES ASOCIADOS A LA DIABETES MONOGÉNICA

Tal y como se ha mencionado previamente, en una primera fase del estudio se analizaron los genes *KCNJ11*, *ABCC8* e *INS* y la región 6q24, conocidos ya por estar asociados a la patología. Con el fin de esclarecer la causa de la diabetes en nuestro grupo de pacientes, también se analizaron en algunos casos genes asociados a otros síndromes que pueden cursar con diabetes neonatal (por ejemplo el gen *FOXP3*).

1.1. Extracción de ADN

El ADN de cada muestra se extrajo partiendo de sangre periférica y congelada a -80°C hasta el momento de su uso.

La extracción se llevó a cabo mediante el kit comercial *QIAamp® Blood Mini* (Qiagen; Düren, Alemania), siguiendo las especificaciones del fabricante.

Los ácidos nucleicos obtenidos se cuantificaron utilizando *NanoDrop® ND-1000* (Innovadyne Technologies, Delaware, EE.UU.) y el *QUBIT dsDNA HS assay kit* (Invitrogen) junto con el *Qubit® 2.0 Fluorometer*. Se identificaron las siguientes longitudes de onda (λ): 260nm (A260) para los ácidos nucleicos, una unidad de densidad óptica (OD) equivalente a 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de doble cadena o 40 $\mu\text{g/ml}$ de ARN; 280nm (A280) para proteínas; y 230nm (A230) para carbohidratos, péptidos, fenoles y aromáticos.

Se calcularon A260/A280 y A260/A230 para determinar la pureza de las muestras, siendo el valor óptimo de 1,8 a 2¹⁶¹. Posteriormente, el ADN se almacenó a -20°C hasta su uso posterior.

1.2. Amplificación de los genes mediante PCR

Para la amplificación de los genes a analizar en cada paciente se utilizó la técnica de PCR (*Polimerase chain reaction*)¹⁶².

Esta técnica consta de tres pasos desarrollados a diferentes temperaturas: desnaturalización (90-94°C), unión de cebadores (la temperatura es específica de éstos y del fragmento a amplificar), y extensión de la polimerasa (72°C). A medida que avanza la PCR, el mismo ADN sintetizado se emplea como molde para replicarlo, poniendo en marcha la reacción en cadena donde el ADN se amplifica exponencialmente. Los cebadores empleados para cada gen estudiado y las condiciones de PCR específicas se resumen en las Tabla 1 y 4 del Anexo 1. Además, cada cebador utilizado tenía una cola M13 (para el *forward*: TGTAACGACGGCCAGT y para el *reverse*: CAGGAAACAGCTATGACC). Esta secuencia nos permite usar siempre los mismos cebadores en la secuenciación, independientemente del gen que hayamos amplificado.

La verificación de la amplificación por PCR se realizó mediante electroforesis horizontal. Los fragmentos migraron en gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE (1X) y se visualizaron mediante tinción con un agente intercalante de ADN denominado *gelred*. Este agente se inserta entre las cadenas de ADN y al excitarse con luz ultravioleta emite luz, por lo que nos permite observar los fragmentos amplificados.

1.3. Secuenciación automática

Para la identificación de mutaciones y cambios en la secuencia de los genes a estudio, se empleó la técnica de secuenciación automática basada en el método Sanger ¹⁶³. Para ello, se utilizó el kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems; California, EE.UU) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Previo a la secuenciación, el producto de PCR se purificó mediante el kit *ExoSAP-IT®* (USB Corporation; Ohio, EE.UU). Este método permite la eliminación de cualquier hebra monocatenaria y deoxinucleósido trifosfato (dNTP) residuales de la PCR que puedan interferir en las posteriores reacciones, mediante dos enzimas hidrolíticas (exonucleasa I y fosfatasa alcalina).

Posteriormente, se mezcló el producto de PCR purificado con un único cebador complementario a la secuencia M13 y se añadió la mezcla del kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* que contenía, la enzima Taq DNA polimerasa, dNTPs y dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs), dNTPs que carecen del grupo hidroxilo en el carbono 3'. Debido a que la polimerasa necesita este grupo hidroxilo para formar un enlace fosfodiéster y así poder agregar el siguiente dNTP, la ausencia de este grupo conlleva el fin de la síntesis de la hebra. Los ddNTPs están marcados con fluorocromos, uno diferente para cada uno de ellos (ddATP, ddTTP, ddCTP y ddGTP). Se realizaron 2 reacciones de secuenciación por cada amplicón, una en sentido directo (con el *primer forward* con cola M13: TGTAACGACGGCCAGT) y otra en sentido contrario (con el *primer reverse* con cola M13: CAGGAAACAGCTATGACC).

Los fragmentos obtenidos en la secuenciación se purificaron mediante precipitación con etanol/EDTA/acetato sódico según el protocolo de *Applied*

Biosystems (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Protocol). Esta purificación permite la eliminación del exceso de ddNTPs marcados, para que luego, al incidir con el láser, no interfieran en la emisión de la señal.

Finalmente, las diferentes hebras de ADN se separaron basándose en el tamaño/carga, mediante una electroforesis capilar. Los diferentes fragmentos se detectan mediante la emisión de las diferentes longitudes de onda por parte de los fluorocromos al ser excitados por el láser. La electroforesis capilar se realizó en un secuenciador automático *ABI PRISM 3130 XL* y los cromatogramas obtenidos fueron analizados mediante el programa *Sequencing analysis v5.2* y *SeqScape v3.1* (Applied Biosystems, California, EE.UU).

1.4. Estudio de la región 6q24

Un total del 70% de las diabetes neonatales transitorias son causadas por la sobreexpresión de los genes paternos en la región cromosómica 6q24 ⁵⁶. En la actualidad, se conocen tres mecanismos por los que se desencadena: la isodisomía paterna del cromosoma 6, la duplicación paterna de la región 6q24 y los defectos en la metilación del cromosoma materno.

Para el estudio de aquellos pacientes cuya sospecha de diabetes podía estar asociada a esta región, se emplearon tres técnicas distintas: el análisis de microsatélites por PCR fluorescente, la PCR múltiple cuantitativa de fragmentos fluorescentes cortos y enzimas de restricción sensibles a la metilación.

1.4.1. Análisis de microsatélites por PCR fluorescente para el estudio de isodisomía paterna de la región 6q24

La isodisomía se define como la presencia de dos cromosomas procedentes del mismo progenitor, por lo que para descartarla recurrimos al análisis de microsatélites.

Para la detección de la isodisomía se analizaron varios microsatélites de la región de interés mediante PCR fluorescente con el fin de establecer qué tipo de herencia había recibido el paciente. Para ello, se estudiaron tanto el caso índice como los progenitores.

Los microsatélites o STR (*Short Tandem Repeats*) son secuencias de ADN altamente polimórficas presentes en todo el genoma humano. Pueden estar compuestos de repeticiones en tándem de hasta cinco nucleótidos, por lo que el número variable de estas repeticiones da lugar a una alta tasa de heterocigosidad del marcador ¹⁶⁴.

Mediante la PCR fluorescente de diferentes microsatélites a lo largo del cromosoma 6 descartamos cualquier isodisomía en este *locus*. Esta tecnología difiere de la PCR convencional en que uno de los cebadores usados para la amplificación es marcado fluorescentemente con el fluoróforo FAM (6-carboxifluoresceína) en su extremo 5' permitiendo la determinación precisa del tamaño de los productos amplificados mediante electroforesis capilar. Determinando el tamaño preciso de cada microsatélite en cada familiar, podemos establecer que patrón de herencia ha recibido el caso índice, es decir, que alelo ha recibido de cada progenitor.

Para cada caso con sospecha de diabetes neonatal asociada a alteraciones en la región 6q24, analizamos 10 microsatélites tanto en el caso índice como en sus padres. La electroforesis capilar se realizó en el secuenciador *ABI3130xl* (Genetic Analyzer Applied Biosystems, California, EE.UU.) y los resultados se analizaron el software de análisis de microsatélites *GeneMapper v4.0* (Applied Biosystems).

Los microsatélites analizados y la localización a lo largo del cromosoma 6 se detallan en la Tabla 2 del Anexo 1. Los cebadores que se utilizaron y las condiciones para la PCR se detallan en la Tabla 3 del Anexo 1.

1.4.2. PCR múltiple cuantitativa de fragmentos fluorescentes cortos para el estudio de duplicaciones en la región 6q24

La PCR múltiple cuantitativa de fragmentos fluorescentes cortos (*QMPSF*, *Quantitative Multiplex PCR of Short fluorescent Fragments*) se basa en la amplificación simultánea de varios genes o regiones diana marcados de manera fluorescente ¹⁶⁵.

Los perfiles fluorescentes de las regiones de interés obtenidos se comparan frente a perfiles fluorescentes de regiones o amplicones usados como control. De esta manera, los cambios cuantitativos de una secuencia se pueden detectar simplemente mediante el aumento o disminución de los perfiles fluorescentes. Un aumento en los picos de los perfiles obtenidos supondría una duplicación en dicha región, mientras que una disminución supondría una delección de la misma.

En nuestro caso, se analizaron 4 fragmentos del cromosoma 6 junto con un amplicón en otro cromosoma usado como control para la detección de los cambios

cuantitativos. Los cebadores que se utilizaron y las condiciones para la PCR se detallan en la Tabla 3 del Anexo 1.

1.4.3. Enzimas de restricción sensibles a la metilación para el estudio de alteraciones de la metilación en el cromosoma 6 materno

Para la detección de alteraciones en la metilación del cromosoma materno, se utilizaron enzimas de restricción sensibles a la metilación. Se realizaron dos reacciones independientes: en la primera, el ADN se digirió con una enzima no sensible a la metilación (digiere independientemente del estado de la metilación); en la segunda reacción, el ADN se digirió con una enzima sensible a la metilación (únicamente digiere cuando no existe metilación). Posteriormente se realizó una PCR convencional de cada digestión y los resultados se observaron en un gel de agarosa.

Partiendo de la base de que únicamente obtendremos un amplificado en la reacción de PCR donde no haya ocurrido la digestión, podemos deducir si la región de interés está metilada o no. La primera reacción de digestión realizada nos servirá de control de la técnica, ya que en ella la digestión ocurrirá siempre independientemente del estado de metilación y por tanto no obtendremos ningún amplicón. Por otro lado, si en la segunda reacción obtenemos un amplicón producto de la PCR realizada, podremos deducir que no ha ocurrido ninguna digestión en el paso previo y que por tanto, la región está metilada, ya que el enzima de restricción utilizado únicamente es capaz de digerir la región si esta está sin metilar. Por el contrario, si no existe amplicón, la digestión habrá ocurrido, por lo que podremos deducir que esa región no estaba metilada.

En nuestro caso, las enzimas utilizados fueron *HapII*, que únicamente digiere cuando no existe metilación, y el enzima *MspI*, que digiere independientemente del estado de la metilación.

Los cebadores que se utilizaron y las condiciones para la PCR se detallan en la Tabla 3 del Anexo 1.

1.5. Predicción *in silico* de las variantes detectadas

Mediante el uso de programas bioinformáticos se puede predecir el efecto funcional que pueden tener las mutaciones sobre un gen o proteína. Para elucidar si las variantes identificadas mediante la secuenciación del exoma podrían tener un efecto patogénico, se analizó cada una de ellas por medio de diferentes software de predicción.

1.5.1. Variantes *missense*

Para predecir los posibles efectos patogénicos de las alteraciones detectadas que generan un cambio de aminoácido en la proteína, se utilizaron tres *softwares*: *PolyPhen*, *SIFT* y *MutationTaster*.

- *PolyPhen* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>): es una herramienta que predice el efecto que una sustitución de un aminoácido puede tener en la estructura y función de una proteína. Las predicciones tienen en cuenta la filogenia de la proteína y la información estructural que existe sobre ella ¹⁶⁶. Es decir, establece el posible impacto de la sustitución en base a la importancia de la región (dominio)

donde ocurre dicha alteración y en base al impacto que pudiera tener en proteínas homologas. Los resultados de *PolyPhen* se clasifican como: benigno, posiblemente perjudicial, probablemente perjudicial o desconocido.

- *SIFT* (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>): este software calcula el posible impacto de la sustitución teniendo en cuenta el nivel de conservación de dicha región. Es decir, realiza múltiples alineamientos con proteínas similares o secuencias proteicas que puedan compartir función para ver si la región alterada esta conservada evolutivamente ¹⁶⁷. En base al grado de conservación, establece si la alteración es tolerable o deletérea.
- *MutationTaster* (www.mutationtaster.org/): este software integra información de diferentes bases de datos (*Ensembl, UniProt, ClinVar, ExAC, 1000 Genomes Project, phyloP, phastCons*) ¹⁶⁸. Además de tener en cuenta si la región en la que se encuentra la alteración está evolutivamente conservada, analiza el posible efecto de la mutación a nivel protéico y a nivel de ARN mensajero.

1.5.2. Variantes en regiones promotoras

Las células eucariotas traducen la información del ADN y sintetizan las proteínas mediante un proceso denominado transcripción. Los promotores son secuencias localizadas normalmente en el inicio del gen, que tienen un papel crucial en este proceso. En los promotores se localizan motivos funcionales, tales como la caja-TATA, caja-GC, caja-CAAT y el sitio de inicio de la transcripción, que funcionan como sitios de unión para diversos factores de transcripción y otras proteínas necesarias para el proceso.

Para predecir si las variantes detectadas en estas regiones pudieran tener algún efecto sobre el nivel de transcripción, se utilizó el programa *Neural Network Promoter Prediction* (www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html). Este programa proporciona un listado de lugares de unión potenciales de diferentes factores de transcripción¹⁶⁹ y predice si la alteración podría alterar alguno de ellos.

1.5.3. Variantes en zonas de *splicing* (corte y empalme entre exones)

El empalme alternativo (*alternative splicing*), es un proceso por el cual el ARN obtenido de la transcripción sufre una serie de modificaciones con el objetivo de producir distintas isoformas de una misma proteína. De forma general, las modificaciones son eliminaciones o retenciones de las secuencias codificantes del gen. Las isoformas generadas, pueden tener funciones diferentes, incluso opuestas. Este mecanismo tiene lugar gracias a una compleja regulación donde intervienen múltiples proteínas, que realizan su función gracias a que reconocen secuencias específicas que marcan el lugar de corte y empalme.

Para predecir los posibles efectos funcionales resultantes de las variantes localizadas en estas regiones de corte y empalme (*splice-site*) se utilizaron *NatGene2* versión 2.42 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>) y *Neural Network Splice Site Prediction* (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

- *NatGene2*: en base a la secuencia nucleotídica, el programa predice los lugares de corte y empalme. Comparando los lugares potenciales de corte y empalme de la secuencia normal y de la secuencia alterada, podemos establecer si las regiones de corte y empalme sufren alguna modificación debido a la alteración.

- *Neural Network Splice Site Prediction*: reconoce las regiones aceptoras y donadoras necesarias para el corte y empalme. Predice si las alteraciones podrían modificar alguno de ellos.

2. BÚSQUEDA DE NUEVOS GENES

Como se ha indicado previamente, a la hora de identificar nuevos genes asociados a la diabetes monogénica se empleó la secuenciación de exoma completo en aquellos pacientes cuyo diagnóstico permanecía sin esclarecer después de analizar los genes conocidos asociados a la enfermedad.

2.1. Secuenciación del exoma completo (*WES, Whole Exome Sequencing*)

El exoma se define tradicionalmente como la secuencia del genoma que engloba todos los exones de los genes que codifican proteínas, y que dependiendo de la especie supone alrededor de 1-2% del genoma¹⁷⁰. Hasta hace relativamente poco, la técnica usada para analizar alteraciones en cualquier región del exoma era la secuenciación Sanger. A nivel clínico, en casos con una sospecha clara sobre la localización de la región alterada, sigue siendo una técnica válida y efectiva. Sin embargo, en casos en que la patología puede deberse a diferentes alteraciones en diferentes genes, y la relación entre el genotipo y el fenotipo no es muy clara, el proceso de diagnóstico puede ser lento y costoso mediante la técnica Sanger. Las tecnologías de secuenciación que se han desarrollado recientemente, denominadas “secuenciación de nueva generación” (*NGS, Next generation sequencing*) nos permiten secuenciar todo el exoma de manera simultánea en lugar de analizar cada región de interés por separado.

Existen varias plataformas tecnológicas para realizar la secuenciación de nueva generación y aunque cada una de ellas tiene características específicas, todas incluyen los siguientes procesos (Figura 7):

1. Obtención de la librería (preparación de ADN molde, hibridación y captura)
2. Amplificación de la librería
3. Secuenciación
4. Análisis de los datos obtenidos

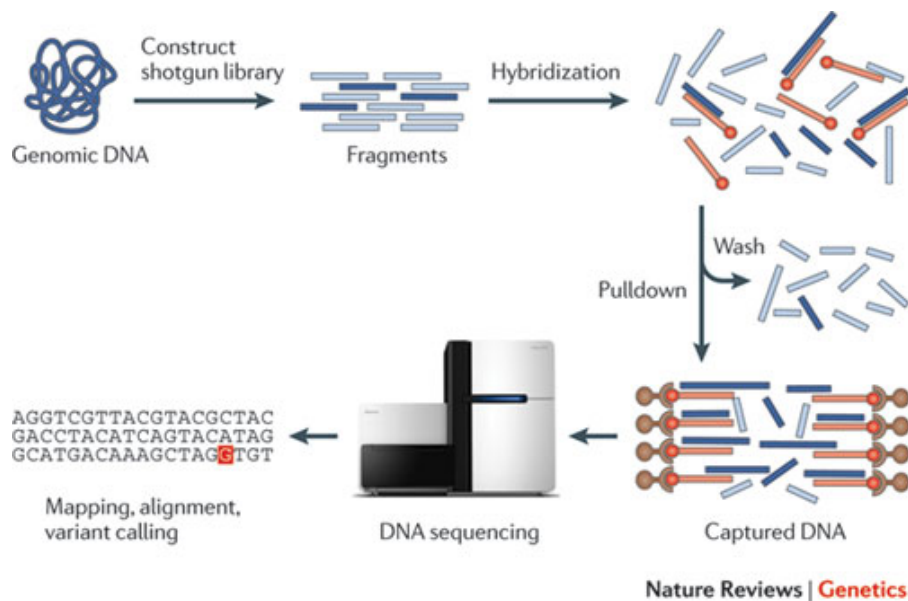


Figura 7. Representación esquemática de los pasos principales a seguir en la secuenciación de exoma completo. Bamshad M. *et al* (2011) ¹⁷¹.

En nuestro caso, la secuenciación del exoma de las 8 familias se llevó a cabo mediante la tecnología de Illumina. La captura y enriquecimiento del exoma se realizó mediante el *Nextera Rapid Capture Expanded exome enrichment* (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), que incluye entre las regiones diana zonas UTR (*Untranslated region*) y miARN además de las regiones codificantes. Posteriormente, la

secuenciación se llevó a cabo en un *HiScanSQ* (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) con el objetivo de generar lecturas pares de 75pb.

2.1.1. Obtención de la librería: Preparación y captura del exoma

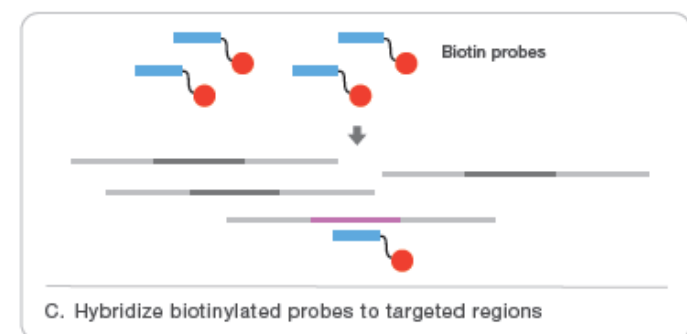
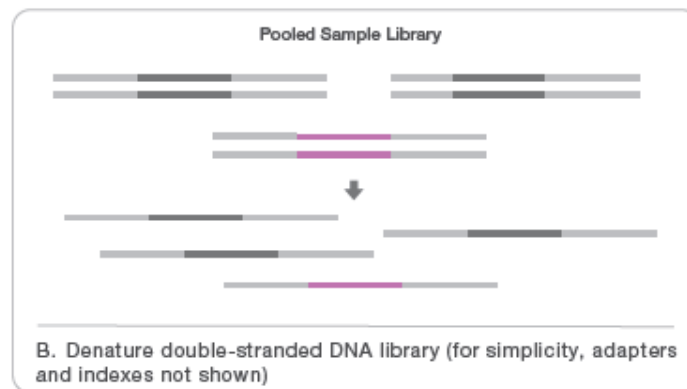
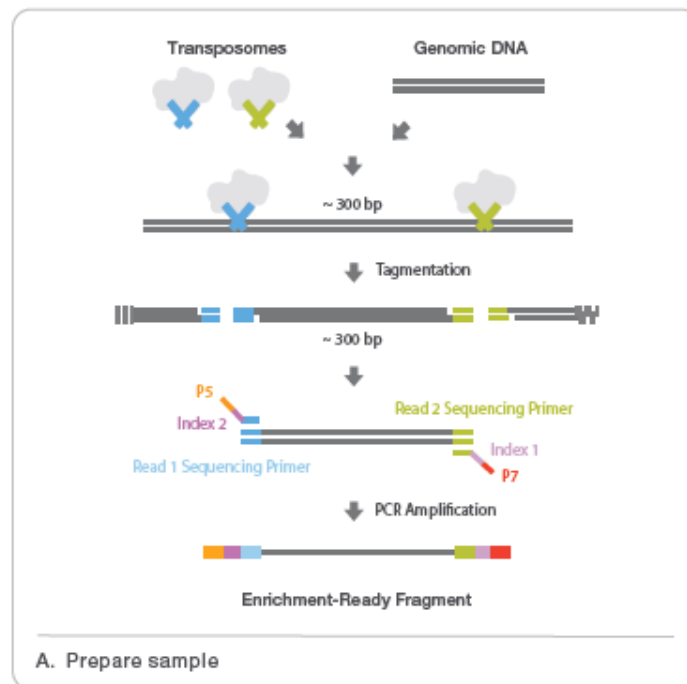
Sería el proceso por el cual conseguimos obtener únicamente las regiones codificantes partiendo del ADN genómico. La tecnología *Nextera* de Illumina realiza varios pasos para ello (Figura 8):

1. *Fragmentación del ADN genómico*. La tecnología *Nextera* utiliza la fragmentación enzimática mediante complejos denominados transposomas (Figura 8A). Las transposasas, enzimas que forman parte de esos complejos, fragmentan el ADN genómico de manera aleatoria en segmentos cortos.
2. *Unión de adaptadores*. Las mismas enzimas, además de fragmentar el ADN, añaden secuencias cortas a cada lado de los fragmentos que son complementarios a los cebadores que se utilizan para amplificar los fragmentos mediante PCR (Figura 8A).
3. *PCR*. Esta PCR tiene como objetivo amplificar los fragmentos generados, y añadir una nueva tanda de secuencias a cada fragmento. Por un lado, se añaden las secuencias necesarias para la posterior secuenciación (denominadas index1 e index2 en la Figura 8A) y que se utilizan para identificar a que muestra pertenece la secuencia. Estas secuencias “Index” permiten la secuenciación conjunta de hasta 96 muestras diferentes ^{172,173}. Por otro lado, se añaden también unos adaptadores comunes (denominados P5 y P7 en la figura 8A), que son

complementarios a los cebadores que recubren la fase sólida en la que inmovilizaremos los fragmentos de nuestra librería.

4. *Captura del exoma*. Una vez realizada la PCR, obtendríamos un conjunto de fragmentos generados aleatoriamente, cada uno con los adaptadores correspondientes añadidos. Sin embargo, tendríamos fragmentos de todo el genoma, por lo que este paso de captura es necesario para quedarnos únicamente con las regiones que nos interesa secuenciar. Se divide en los siguientes pasos:

- a. Desnaturalización del ADN de doble cadena. (Figura 8B).
- b. Hibridación. En este paso, sondas biotinizadas se hibridarán a las hebras de ADN simple obtenidas en el paso previo. Estas sondas reconocen específicamente las regiones diana que queremos secuenciar (Figura 8C).
- c. Enriquecimiento o captura de las regiones de interés. Gracias a que las sondas solo se hibridarán a las secuencias que nos interesa capturar, y que están biotinizadas, en este paso conseguimos “purificar” nuestras regiones de interés. Se añaden bolitas magnéticas de estreptavidina, que se unirán a la biotina que llevan las sondas (Figura 8D). Posteriormente, las bolitas se capturan de forma magnética (Figura 8E). Junto con las bolitas, estamos capturando las sondas biotinizadas, que a su vez van unidas a nuestras secuencias de interés. Las posibles uniones no específicas que se hayan podido generar en el proceso se eliminan mediante lavados por calor. Los fragmentos de ADN capturados se eluyen entonces para separarlos de las bolitas y volver a repetir el proceso, con el objetivo de maximizar la captura. De esta manera, obtendríamos una librería formada por fragmentos de secuencias codificantes (exoma).



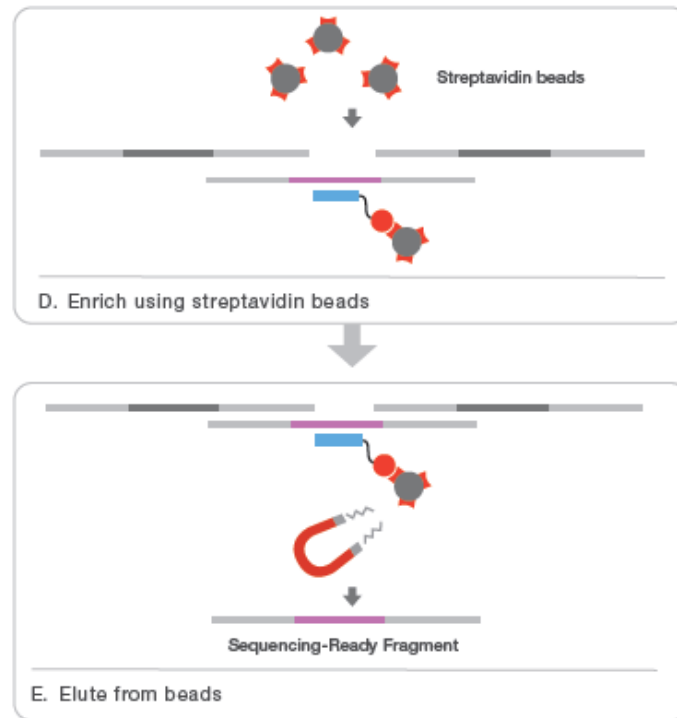


Figura 8. Resumen gráfico de la técnica empleada por Illumina para la preparación y captura del exoma. Illumina ¹⁷⁴.

2.1.2. Inmovilización y amplificación de la librería

Este proceso tiene como objetivo amplificar la librería que hemos obtenido en el paso previo, para facilitar la secuenciación. Para ello, la tecnología de Illumina realiza dos pasos principales:

1. *Inmovilización de la librería.* El ADN molde obtenido se inmoviliza en una superficie sólida de vidrio (Figura 9). Esta inmovilización es posible gracias a los adaptadores comunes P5 y P7 añadidos previamente a los fragmentos de ADN. Estos adaptadores son complementarios a unos oligonucleótidos que recubren el fondo de dicha superficie sólida.

2. *Amplificación de la librería.* En este segundo paso, se lleva a cabo la amplificación “en puente”, que permite la creación de hasta 1000 copias de cada molécula unida a la fase sólida. De nuevo, gracias a los adaptadores P5 y P7, los fragmentos de ADN que los portan se hibridarán a los oligonucleótidos que recubren la fase sólida formando una especie de puente como se puede observar en la Figura 9. A su vez, los oligonucleótidos que recubren la fase sólida son además utilizados como cebadores para la amplificación de los fragmentos.

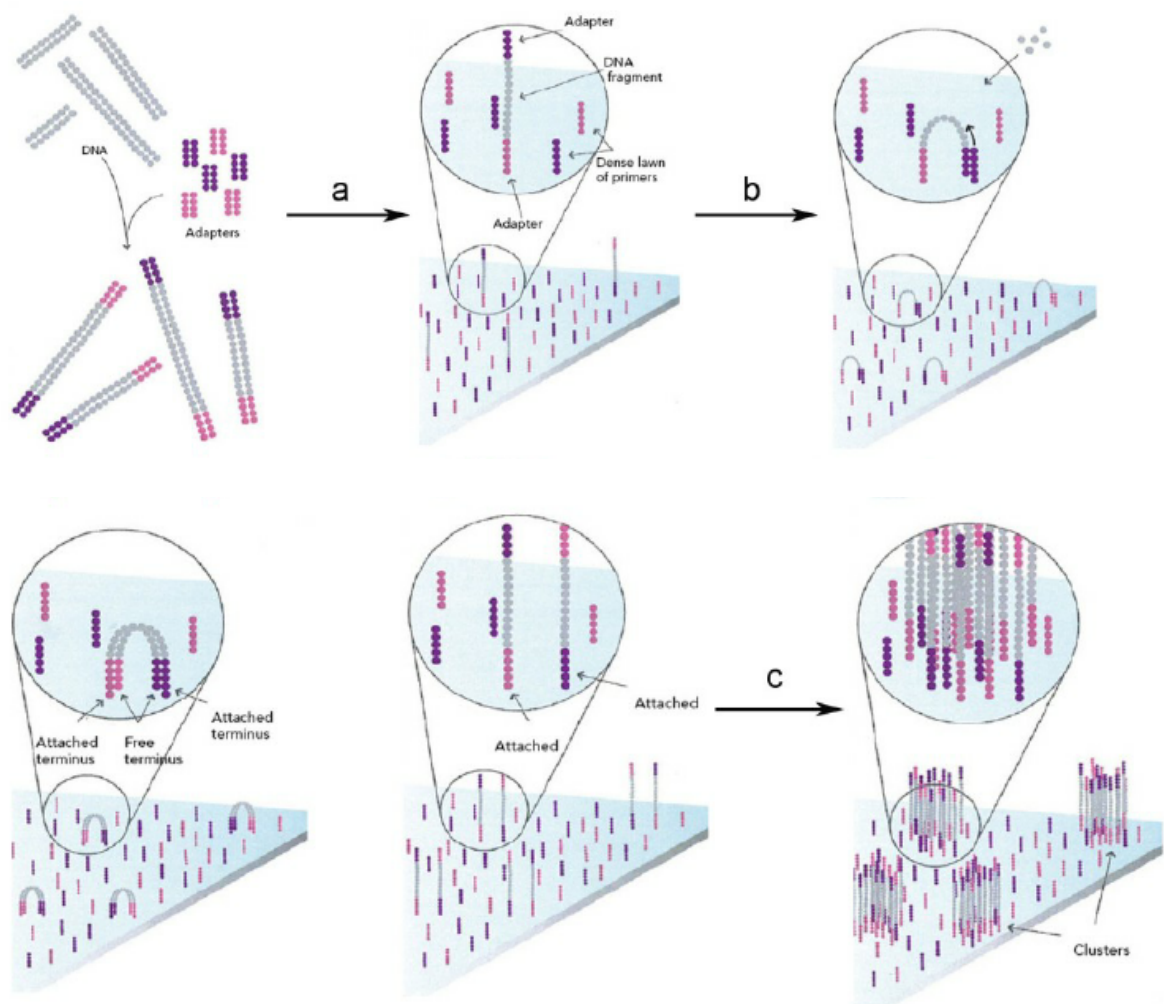


Figura 9. Representación gráfica del proceso de inmovilización de la librería y posterior amplificación “en puente”. Illumina ¹⁷⁴.

2.1.3. Secuenciación del exoma

Una vez que se ha amplificado la librería, se procede a la secuenciación, que en este caso se realiza mediante la tecnología de secuenciación por síntesis (*SBS*, *Sequencing By Synthesis*). Esta tecnología usa cuatro nucleótidos marcados de manera fluorescente para la secuenciación en paralelo de todos los moldes unidos a la superficie sólida. En cada ciclo, un único dNTP es añadido a la cadena que se está generando. La marca fluorescente sirve como terminación de la polimerización, por lo que después de cada incorporación de un dNTP, la fluorescencia es escaneada para la identificación de la base añadida y la marca fluorescente es eliminada enzimáticamente para permitir la incorporación del siguiente nucleótido.

2.2. Análisis bioinformático de la secuenciación de exoma completo y la identificación de nuevos genes candidato

Las tecnologías de secuenciación de nueva generación nos permiten obtener un enorme volumen de datos, cuyo análisis requiere herramientas informáticas sofisticadas además de conocimientos en biología computacional.

El análisis de los datos obtenidos mediante NGS es un proceso complejo, especialmente teniendo en cuenta las longitudes de lectura corta que se generan (75pb en nuestro caso) y el enorme volumen de datos que se obtiene. Se debe realizar un complejo mapeo de las secuencias de cada uno de los individuos contra una secuencia de referencia para poder identificar las variantes en los individuos analizados y, posteriormente, se emplean distintos tipos de controles para filtrar esas variantes. Todo ello, precisa de una infraestructura bioinformática compleja, no sólo

capaz de facilitar este filtrado de información, sino también de aclarar si las mutaciones producen cambios de aminoácidos en la proteína resultante, si son o no conocidas previamente, si se ubican en zonas no codificantes del gen, etc.

Para el análisis de nuestros datos se utilizó la herramienta web *Whole-Exome sequencing Pipeline web tool (WEP)* ¹⁷⁴.

En resumen, esta herramienta realiza los siguientes procesos (Figura 10):

1. *Control de calidad*: descarta aquellas regiones que no se han secuenciado apropiadamente en base a una serie de índices de calidad.
2. *Alineamiento de las secuencias*: las secuencias obtenidas se comparan con una secuencia de referencia. En nuestro caso, la secuencia de referencia utilizada fue UCSC GRCh37/hg19.
3. *Identificación de las variantes*: la herramienta identifica todas las posiciones del cromosoma que son diferentes a la secuencia de referencia.
4. *Anotación de las variantes*: la herramienta realiza búsquedas sobre las variantes identificadas en diferentes bases de datos (posición cromosómica de la variante, cambio nucleotídico, frecuencia de la variante en la población general, etc.).

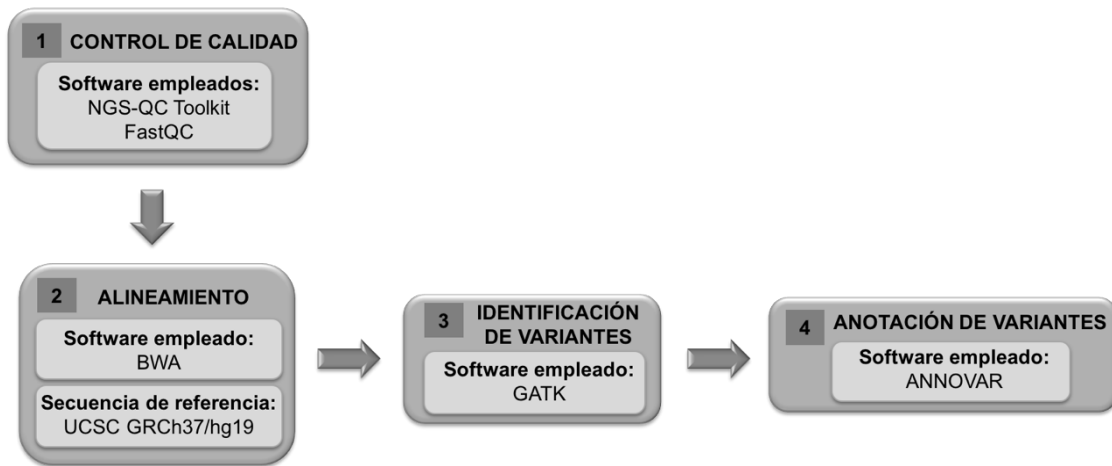


Figura 10. Representación esquemática del proceso de análisis de datos del exoma que realiza la herramienta web WEP.

Con el objetivo de identificar variantes potencialmente patológicas, las variantes localizadas fuera de las regiones exónicas, las variantes sinónimas y las variantes con un $MAF > 0.05$ fueron descartadas (Figura 11). Además, las variantes que apareciesen anotadas en las bases de datos *1000 genomes* o *dbSNP* también fueron descartadas. Finalmente, siguiendo una estrategia de priorización de variantes *de novo*, excluimos todas las variantes heredadas contrastando las variantes del índice contra las detectadas en el exoma de sus padres. En el caso de una familia en la que la madre también presentaba diabetes, optamos por reducir el listado de variantes únicamente a las que el caso índice había heredado por vía materna.

La predicción del efecto funcional de las variantes identificadas se realizó utilizando los software de predicción *SIFT*, *Polyphen-2* y *MutationTaster*^{162,166–168,175}.

Inicialmente, se preseleccionaron aquellas variantes para las que al menos dos software predecían un impacto patogénico. Posteriormente, se realizó una búsqueda de información sobre los genes en los que se localizaban dichas variantes utilizando el software *David functional annotation*. Se trata de un software que realiza búsquedas de todo tipo: ontología del gen (descripción y atributos del producto génico), rutas metabólicas en las que están implicados los genes, enfermedades asociadas, etc.

Finalmente, se seleccionaron las variantes localizadas en genes relacionados con el metabolismo de la glucosa, el desarrollo del páncreas, y con otras funciones potencialmente importantes para la patogénesis de la enfermedad. La presencia de estas variantes seleccionadas fue confirmada mediante la secuenciación automática Sanger en un *ABI3130xl Genetic Analyzer* (Life Technologies, Waltham, MA, USA). Los cebadores que se utilizaron y las condiciones para la PCR se detallan en la Tabla 5 del Anexo 1.

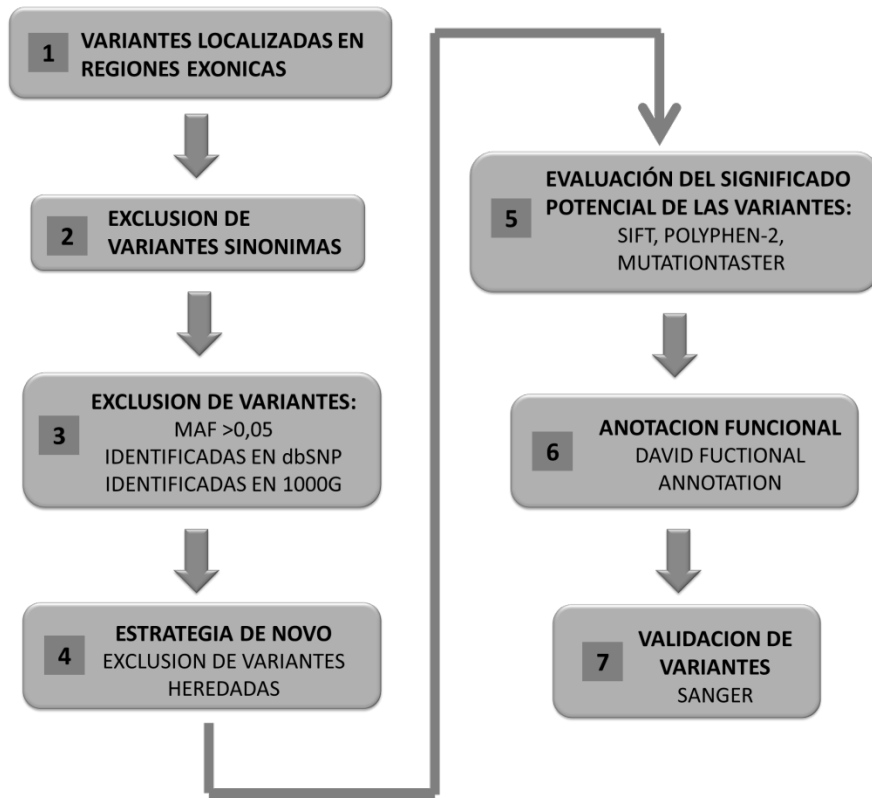


Figura 11. Representación esquemática de la priorización de variantes realizado.

3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA VARIANTE DETECTADA EN EL GEN *STAT3*

Una vez seleccionadas las variantes potencialmente patogénicas, se realizaron estudios funcionales en modelos *in vitro* de célula β pancreática para caracterizar su impacto funcional en las mismas. Para ello, se realizaron una serie de experimentos basados en la mutagénesis dirigida, clonación y amplificación del producto y caracterización funcional de la variante.

3.1. Mutagénesis dirigida

Consiste en generar mutaciones específicas en lugares concretos de la secuencia empleando para ello oligonucleótidos que comprenden la mutación de interés. Para ello se empleó el kit *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis* (Agilent technologies) que permite introducir mutaciones puntuales, deleciones o inserciones en una secuencia de ADN.

Partimos de un vector de ADN de doble hebra resistente a antibiótico (kanamicina en nuestro caso) y con el inserto del gen *STAT3 wild-type* (RC215836, OriGene Technologies) (Figura 12). Mediante el uso de una pareja de cebadores que contenían la mutación y que era complementaria a la región del inserto donde interesaba introducir la mutación, se realizó una PCR. La extensión de los cebadores generó plásmidos mutados. La digestión posterior con la endonucleasa *DpnI*, específica para el ADN metilado y hemimetilado, se utilizó para digerir el ADN molde original y para obtener únicamente el plásmido mutado.

Una vez obtenido el plásmido mutado, se transformó en células competentes *Escherichia coli*-DH5 α , que se sembraron en LB agar (Pronadisa) suplementado con kanamicina y se dejaron crecer a 37°C durante toda la noche. Como únicamente crecen las bacterias que hayan incorporan el plásmido y por tanto hayan ganado la resistencia a la kanamicina, al día siguiente se seleccionó una colonia y se dejó amplificar toda la noche a 37°C en medio LB Broth (Pronadisa).

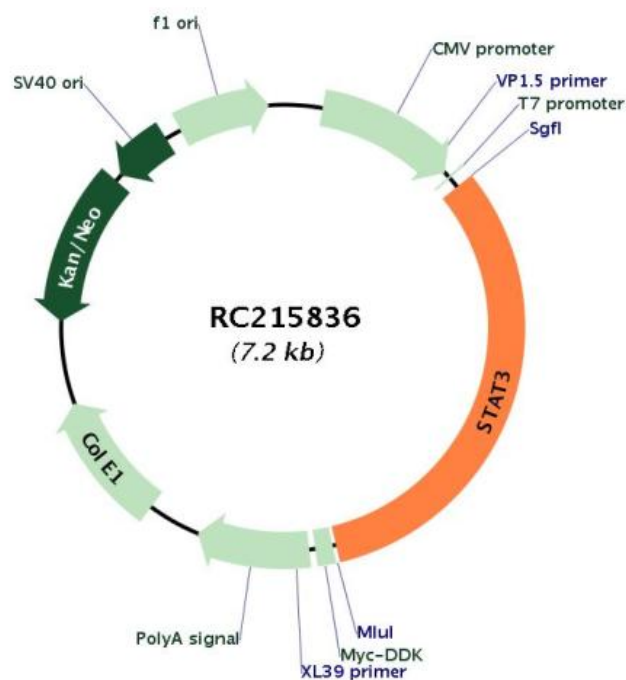


Figura 12. Representación grafica del vector utilizado para el proceso de mutagénesis.

3.2. Extracción de ADN plasmídico

Una vez obtenida la cantidad necesaria de bacterias que contengan nuestro plásmido de interés ($OD_{600} = 3$), se extrajo el ADN plasmídico mediante el kit *QIAGEN Plasmid Mini* (Qiagen; Düren, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, las bacterias se centrifugaron para obtener un lisado que posteriormente se

hizo pasar por una columna de resina de intercambio de aniones, donde el ADN plasmídico se une selectivamente en condiciones de pH bajo y baja concentración de sal. Posteriormente, se eluyó mediante un tampón con altas concentraciones de sal, que se eliminaron después mediante precipitación con isopropanol.

El ADN obtenido se secuenció en un *ABI3130xl* (Life Technologies, Waltham, MA, USA) para verificar que la inserción de la mutación fue la adecuada. Los cebadores utilizados para fueron: 5'-CCGATGCTGGAGGAGAGA-3' (*Forward*) y 5'-GCTCCCTCAGGGTCAAGT-3' (*Reverse*).

3.3. Cultivo de líneas celulares

Para llevar a cabo todos los ensayos *in vitro* se usaron la línea de insulinooma de rata INS-1E¹⁷⁶ y la línea de célula β pancreática humana ENDOC- β H1¹⁷⁷.

La línea INS-1E se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con 10 mM HEPES, 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (*FBS, heat-inactivated fetal bovine serum*), 100 U/mL penicilina, 100 μ g/mL estreptomycin, 1 mM piruvato sódico, y 50 μ M 2-mercaptoetanol. Para las transfecciones se utilizó el mismo medio pero sin antibióticos.

La línea EndoC- β H1, se cultivó en DMEM con 5.6 mM glucosa, 2% albúmina de suero bovino (*BSA; bovine serum albumin*) (Roche Diagnostics), 50 μ M 2-mercaptoetanol, 10 mM nicotinamida (Calbiochem), 5.5 μ g/ml transferrina (Sigma-Aldrich), 6.7 ng/ml selenito de sodio (Sigma-Aldrich), 100 U/ml penicilina, y 100 μ g/ml estreptomycin. El mismo medio pero con un 1% FBS y sin BSA ni antibióticos se usó para los experimentos de transfección.

3.4. Transfección de plásmidos para la sobreexpresión génica

La transfección consiste en introducir material genético en el interior de las células mediante vectores u otras herramientas.

Existen diferentes métodos para llevar a cabo la transfección: los métodos físicos, basados en la introducción mecánica de las moléculas en el interior de la célula (microinyección directa y electroporación); o los métodos químicos, basados en la formación de complejos que las células sean capaces de adquirir e incorporar, bien sea directamente mediante la ruta endocítica (fosfato cálcico) o por afinidad a las membranas (lipofección). En nuestro caso empleamos la lipofección. Se basa en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y el ADN. El complejo se fusiona con la membrana plasmática y permite la entrada del ADN en el citosol. Esta técnica se llevó a cabo mediante *Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent* (Invitrogen, Paisley, UK), siguiendo las especificaciones del fabricante.

Para nuestro estudio, las células INS-1E se tripsinizaron 72 horas antes de la transfección y se sembraron en placas de cultivo tratadas de 24 pocillos. Se sembraron unas 100.000 células por pocillo, para que en el momento de la transfección la confluencia de las células fuese de alrededor del 70%. Una vez transfectadas se incubaron en un incubador de CO₂ al 5% y a 37°C de temperatura durante toda la noche. Al día siguiente se les reemplazó el medio de transfección por el medio de cultivo normal y se incubaron durante 48 horas más o tras 36 horas se trataron con interleucina 6 (IL-6) (20ng/ml) durante 12 horas.

3.5. Western-Blot

Para la determinación de la expresión de proteínas se empleó la tecnología Western blot.

La separación de proteínas se realizó en un gel de acrilamida al 8% y la consiguiente transferencia a membrana de nitrocelulosa mediante la *Trans-blot® turbo™ transfer system de BioRad* siguiendo las especificaciones del fabricante. Posteriormente la membrana se bloqueó durante una hora con leche al 5% diluida en TBST (100mM Tris.HCl, 1.5M NaCl, 0.5% Tween-20, pH 7.5) y se incubó toda la noche con un anticuerpo primario específico de la proteína de interés. Después de esta incubación, se realizaron una serie de lavados con TBST, con el objetivo de retirar el anticuerpo que no se hubiera unido a la membrana, y se realizó una segunda incubación, en este caso con un anticuerpo secundario. Este anticuerpo reconoce el anticuerpo primario y está conjugado con la enzima peroxidasa, que permite la revelación de las bandas protéicas añadiendo simplemente un sustrato. Las bandas inmunoreactivas se revelaron mediante el *SuperSignal West Femto chemiluminescent substrate* (Thermo Scientific, Chicago, IL, USA) y se visualizaron con *Bio-Rad Molecular Imager ChemiBoc XRS with ImageLab software* (BioRad, Hercules, CA, USA).

Los anticuerpos utilizados eran específicos para la detección STAT3 total (sc-482; Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX), STAT3 fosforilado (#9507; Cell Signaling, Danvers, MA), Isl-1 (sc-390793; Santa Cruz Biotechnologies), insulina (#8138; Cell Signaling), y α -tubulina (T9026; Sigma-Aldrich).

3.6. Ensayo de luciferasa

El ensayo de luciferasa es una herramienta que permite monitorizar la actividad promotora en el control de la expresión génica. Se utilizan vectores que contienen la secuencia codificante de la luciferasa bajo el control de un promotor que tendrá dominios de unión al factor de transcripción que nos interese analizar. De esta manera, la luciferasa se transcribirá únicamente en el caso de que el factor de transcripción se una al promotor. La luciferasa cataliza una reacción enzimática que genera luz, por lo que podemos cuantificar la actividad del factor de transcripción mediante un luminómetro.

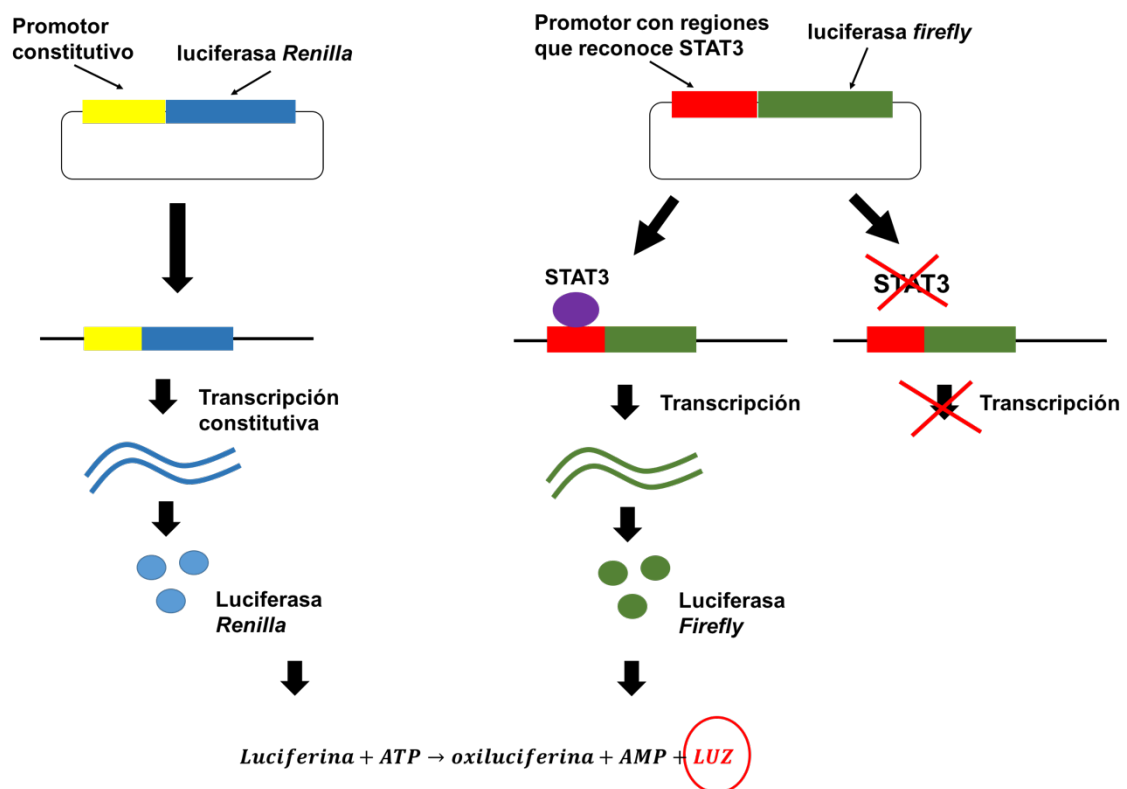


Figura 13. Representación gráfica del ensayo de luciferasa.

Para el ensayo, se transfectaron las células con el plásmido STAT3-WT o con el STAT3-mutado. Además de estos plásmidos, las células se co-transfectaron con otro dos plásmidos: un plásmido que contenía el gen de la luciferasa *firefly* bajo el control del promotor que reconoce STAT3; y un plásmido que llevaba un gen luciferasa distinto al usado previamente (luciferasa *Renilla*) bajo el control de un promotor constitutivo (Figura 13). El plásmido que porta la luciferasa *Renilla* se expresara de manera constante y nos permite usarlo como medida de control para la eficiencia de la transfección. El plásmido que porta la luciferasa *firefly*, únicamente se expresara si el *STAT3* interacciona con el promotor al que está asociado la luciferasa. Por tanto, la luciferasa se transcribirá en la célula de manera proporcional a como lo haría el gen que regula el promotor que queremos estudiar.

Posteriormente las células se sometieron a una sustancia que provoca la lisis celular, dejando libre la luciferasa que se hubiera expresado. Añadiendo el sustrato adecuado, la luciferasa cataliza la reacción de la luciferina y ATP formando AMP, oxiluciferina y luz. La luz emitida se cuantificó mediante un luminómetro, permitiéndonos establecer los niveles de actividad.

Para el ensayo de luciferasa, la línea INS-1E fue co-transfectada con 200ng del *STAT3-responsive dual firefly/Renilla luciferase Signal reporter* (Qiagen). La actividad de la luciferasa se determinó mediante el kit comercial *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega, Madison, WI, USA).

3.7. Extracción de ARN y retrotranscripción

La extracción de ARN se realizó por medio del kit comercial *RNeasy Mini* (Qiagen) siguiendo las especificaciones del fabricante.

El ARN obtenido se cuantificó utilizando el *NanoDrop® ND-1000* (Innovadyne Technologies, Delaware, EE.UU.) y se calcularon los valores A260/A280 y A260/A230 para determinar la pureza de las muestras, siendo el valor óptimo de entre 1,8 y 2¹⁶¹. El ARN se almacenó a -80°C hasta su uso.

Una vez extraído el ARN, el siguiente paso fue obtener el ADN complementario (ADNc), y para ello se realizó una retrotranscripción mediante el kit *Quantitect Reverse Transcription* (Qiagen).

3.8. Análisis de expresión mediante ensayos Taqman

La sonda TaqMan está formada por un fluoróforo unido covalentemente al extremo 5' de un oligonucleótido, y un desactivador de fluorescencia (*quencher*) en el extremo 3'.

Cada sonda está diseñada de manera que hibrida con una región específica de ADN y que va a ser amplificada por un conjunto específico de cebadores. A medida que la Taq polimerasa sintetiza la cadena, la actividad exonucleasa de esta misma degrada la sonda. La degradación separa el fluoróforo, rompiendo así la proximidad entre éste y el *quencher*, permitiendo así la emisión de fluorescencia. La fluorescencia

detectada es directamente proporcional a la cantidad de fluoróforo liberado y, por lo tanto, a la cantidad de ADN molde presente en la PCR.

La expresión de *Isl-1*, *PAX6*, *LMX1A*, *INS-1* e *INS-2* de rata e *INS* humano se determinó mediante esta técnica usando *Taqman Gene expression Assays* (Life Technologies) en una máquina de PCR a tiempo real (*Eco Real Time PCR machine, Illumina*). Los valores de expresión fueron corregidos por los genes gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) (para rata) o β -actina (para humano) y por la expresión de *STAT3* para controlar las posibles desviaciones derivadas de la eficiencia de la transfección. Las referencias de todos los *Taqman Gene expression Assays* utilizados se detallan en la Tabla 7 del Anexo 1.

3.9. Análisis de la secreción de insulina

Mediante la estimulación de las células bajo diferentes concentraciones de glucosa y/o fármacos que potencian la secreción de insulina, podemos evaluar la capacidad de respuesta insulínica de las células β pancreáticas. La insulina es la hormona primaria responsable del control del metabolismo de la glucosa, y su secreción se rige por la concentración de glucosa plasmática⁹⁹.

Para la determinación de la secreción de insulina, las líneas celulares INS-1E y ENDOC- β H1 se incubaron durante una hora o toda la noche respectivamente en un medio sin glucosa. Posteriormente, las células se incubaron en la solución Krebs-Ringer suplementada con diferentes concentraciones de glucosa. La solución Krebs-Ringer es una solución de sales equilibrada que mantiene la integridad de las células.

Después, las células INS-1E se incubaron durante 30 minutos en la solución Krebs-Ringer (*KRB, Krebs-Ringer Buffer*) suplementada con 1.67 mM, 16.7 mM o 167 mM glucosa + 10 μ M Forskolina (compuesto que incrementa los niveles de AMP cíclico, molécula clave en las respuestas hormonales como la de la insulina). Las ENDOC- β H1 se incubaron durante una hora en la solución Krebs-Ringer con 0 mM, 20 mM or 200 mM glucosa + 10 μ M forskolina. Finalmente, se procedió a la recogida del sobrenadante para medir la insulina secretada al medio, y de las células para medir el contenido intracelular de insulina.

Las mediciones de los niveles de insulina se realizaron mediante un kit comercial de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) específico para la insulina de rata y de humano (Merckodia, Uppsala, Sweden). Los resultados obtenidos se normalizaron por el contenido intracelular de insulina determinado a partir de los lisados celulares recogidos y por la eficiencia de la transfección del gen *STAT3*. Para la normalización del contenido de insulina, también se determinó el contenido de proteína total por medio de un ensayo de BCA (*Bicinchoninic acid Assay*) (Thermo Scientific).

3.9.1. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

El ELISA usado en nuestro caso es un inmunoensayo enzimático que utiliza la técnica de sándwich directo. Consta de dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra determinantes antigénicos separados de la molécula de insulina.

En una placa específica para este tipo de ensayos, que tenía fijado el anticuerpo anti-insulina, se añadieron las muestras y los estándares necesarios para realizar la curva patrón. Seguidamente se les añadió un anticuerpo anti-insulina

conjugado con peroxidasa. La insulina presente en la muestra se uniría a los anticuerpos anti-insulina unidos al pocillo de la muestra, mientras que los anticuerpos anti-insulina conjugados con peroxidasa también se unirían a la insulina al mismo tiempo. Después de varios lavados para eliminar los anticuerpos no marcados con enzima, se añadió sustrato marcado con 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), que se une a los anticuerpos conjugados. Se añadió ácido al pocillo para detener la reacción y el punto final colorimétrico se leyó en un espectrofotómetro ajustado a la longitud de onda de luz apropiada.

3.9.2. Ensayo de BCA

El ensayo de proteínas BCA es un ensayo basado en el ácido bicinconónico (BCA) para la detección colorimétrica. El producto de reacción de color morado que se genera exhibe absorbancia a 562nm que es casi lineal con concentraciones de proteína crecientes en un amplio intervalo de trabajo (20-2000µg/ml).

En nuestro caso, las concentraciones de proteína se determinaron en referencia a concentraciones estándares de BSA. Se prepararon una serie de diluciones de concentración conocida a partir de la proteína BSA y se ensayaron junto con las muestras desconocidas para determinar la concentración de cada muestra en base a la curva estándar.

3.10. Inmunoprecipitación de cromatina

La inmunoprecipitación de la cromatina (*ChIP, Chromatin Immunoprecipitation*) es un método que permite el estudio de las interacciones entre proteínas específicas o

formas modificadas de proteínas y una región de ADN. Se puede emplear para determinar si un factor de transcripción concreto interactúa con el promotor de un gen de interés.

El proceso comienza con la fijación de las interacciones ADN-proteína. En nuestro caso, se fijaron las interacciones ADN-proteína añadiendo formaldehído a las células en crecimiento que habían sido transfectadas previamente con STAT3-WT o STAT3-mutado. Posteriormente, la cromatina se fragmentó mediante sonicación (20 ciclos de 1 min (30s ON-30s OFF) y las muestras se prelavaron mediante una incubación de 1 h con proteína A/ADN de esperma de salmón a 4°C para reducir la inmunoprecipitación inespecífica. Después, se incubaron durante la noche a 4°C con la proteína A bloqueada con BSA al 5% y el anticuerpo anti-STAT3 (Santa Cruz Biotechnologies) o anticuerpo anti-IgG de conejo (Abcam, Cambridge, UK) como control negativo. A la mañana siguiente se eluyeron, se trataron con proteinasa K y se incubaron durante 3 horas a 62°C en solución con un alto contenido de sal (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCL pH 8.1 y 500mM NaCL) para invertir los enlaces covalentes. Los fragmentos de ADN se analizaron mediante PCR cuantitativa, y el ADN *input* (fracción de la muestra a estudiar, el 10% en nuestro caso, que no ha sido sometida a inmunoprecipitación) se analizó simultáneamente para la normalización de las muestras a estudio. La PCR cuantitativa se realizó utilizando *Sybr Green* (BIORAD) con el siguiente par de cebadores que amplifican el lugar de unión de STAT3 en la región que va desde la base -1262 a la base -1143 en el promotor del gen *Isl-1* de rata: 5'-CTCAGAAAGACGGTAGATTT-3' y 5'-AGCTTTCTAATTTGTTTCC-3'.

El nivel de enriquecimiento de la región del promotor de *Isl-1* fue calculado siguiendo el método comparativo de Ct¹⁷⁸ y utilizando la región promotora del gen *GAPDH* como control. En resumen, el valor de Ct del ADN input de cada muestra

(teniendo en cuenta el factor de dilución) fue restado al Ct de la muestra inmunoprecipitada correspondiente, obteniendo el valor de ΔCt , tanto para la secuencia control (GAPDH) como para la secuencia a estudio. La fórmula empleada fue la siguiente:

$$\Delta Ct [ChIP \text{ normalizado}] = (Ct[ChIP]) - (Ct[Input] - \text{Log}_2(\text{Factor de dilución del Input}))$$

Finalmente, el valor del porcentaje de cada muestra se representó respecto a su correspondiente input y se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ del input} = 100 / 2^{\Delta Ct [ChIP \text{ normalizado}]}$$

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para la comparación entre variables se asumió, basándonos en el teorema central del límite, que las variables eran normales. Por tanto, se utilizaron pruebas paramétricas como el test *T de Student*. En el caso de las variables no paramétricas, se utilizó el test *U de Mann Whitney*.

En aquellos casos en los que la variable cuantitativa presentaba más de 2 categorías, se llevó a cabo una ANOVA seguido de un test *t de student* corregido por Bonferroni.

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa *GraphPad Prism 5*.

Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación financiado por IT 795-13, y por ISCIII – PI14/01104, cofinanciado con fondos FEDER.

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DE LOS GENES ASOCIADOS A LA DIABETES NEONATAL

En esta primera fase del estudio, se realizó el análisis estructural de los genes asociados a DMN (*ABCC8*, *KCNJ11*, *INS* y región 6q24) en 42 familias que presentaban diabetes neonatal. Inicialmente, el estudio genético se realizó en el caso índice o prueba de cada familia y en el caso de detectar alguna alteración, se analizaron también los demás miembros de la familia.

Para cada una de las mutaciones identificadas, se verificó si las variantes habían sido previamente descritas asociadas a la patología. En los casos en los que no estaban descritas, se analizó su posible efecto funcional mediante programas bioinformáticos.

Finalmente, se estudiaron las características clínicas de los pacientes con el fin de intentar correlacionar las variantes identificadas y el posible impacto patogénico y clínico de las mismas.

1.1. Análisis estructural de los genes clásicamente asociados a la diabetes neonatal

El estudio estructural de los genes *ABCC8*, *KCNJ11* e *INS* y el estudio de la región 6q24 reveló alteraciones en 30 de los pacientes analizados (71%). En 12 pacientes, un 29%, el análisis de estos genes no reveló ninguna variante que pudiera explicar la clínica de los pacientes (Figura 14).

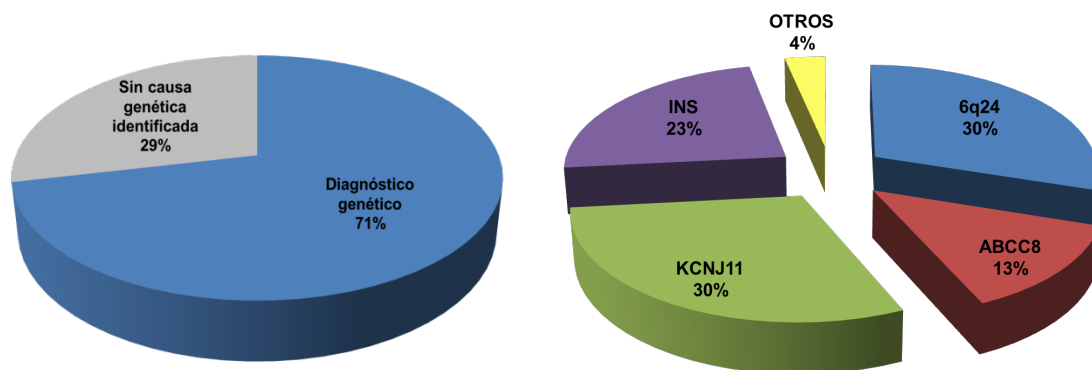


Figura 14. Descripción grafica de los porcentajes de diagnóstico genético obtenidos.

El 43% de los pacientes con causa genética identificada presentaba alteraciones en los genes que codifican para los canales de potasio (*KCNJ11* y *ABCC8*). Un 30% mostraba alteraciones en la región 6q24 y un 23% en el gen de la insulina. Detectamos también una alteración en el gen *FOXP3*, asociado al síndrome IPEX, que incluye dentro de su cuadro clínico la diabetes neonatal ¹⁷⁹ (Figura 14).

En cuanto a las mutaciones detectadas en la región 6q24 (Tabla 5), 4 eran isodisomias paternas, 4 duplicaciones en el alelo paterno, y una pérdida de metilación del alelo materno. Respecto a las mutaciones detectadas en los otros genes, todas fueron mutaciones con cambio de sentido (*missense*) en regiones exónicas, a excepción de dos mutaciones que alteraban el patrón de lectura (*frameshift*), también en regiones exónicas, y una alteración intrónica. De todas las alteraciones detectadas, el 68% habían sido previamente descritas asociadas con la diabetes neonatal.

Tabla 5. Descripción de las mutaciones detectadas. Se detalla la región donde se han detectado, el tipo de mutación y si se habían descrito previamente asociadas con la patología.

GEN O REGIÓN	ALTERACIÓN	NÚMERO
6q24	Isodisomía paterna	4
	Duplicación del alelo paterno	4
	Pérdida de metilación del alelo materno	1
KCNJ11	Missense descritas previamente	5
	Missense NO descritas	4
ABCC8	Missense descritas previamente	2
	Missense NO descritas	2
INS	Missense descritas previamente	3
	Missense NO descritas	2
	Intrónicas descritas previamente	1
	Frameshift descritas previamente	1
FOXP3	Frameshift NO descritas previamente	1

En cuanto a la heredabilidad, observamos que el 44% de las mutaciones identificadas surgieron *de novo*, ya que ninguno de los progenitores portaba la alteración detectada. En un 33% de los casos el paciente había heredado la mutación por vía paterna o materna y en el 23% restante el patrón de herencia quedó sin clasificar debido a que no pudimos obtener muestra de los progenitores (Figura 15).

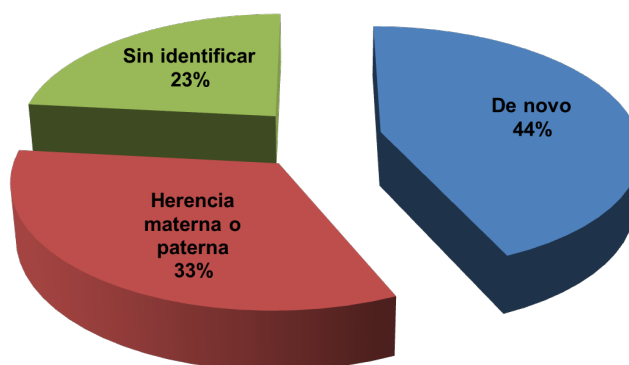


Figura 15. Descripción gráfica de la heredabilidad de las mutaciones identificadas.

La lista de las mutaciones detectadas con información más extensa sobre ellas (gen mutado, nomenclatura de la alteración identificada a nivel de ADN y de proteína, portadores de la alteración en cada familia, etc.) se detalla en las Tablas 1 y 2 del Anexo 2. Los parámetros clínicos obtenidos de cada paciente se detallan en la Tabla 4 del apartado de pacientes.

1.2. Correlación clínico-genética

Con el objetivo de determinar una relación entre la variante detectada (genotipo) y el fenotipo patológico se analizaron parámetros clínicos en cada paciente. Inicialmente, los pacientes se agruparon según la alteración molecular que presentaban, y se realizó una mediana de los siguientes datos clínicos: edad de diagnóstico, edad gestacional, peso al nacimiento, glucemia al diagnóstico y presencia/ausencia de CIR.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la edad de diagnóstico y en el peso al nacimiento (Tabla 6).

Los pacientes con alteraciones en la región 6q24 fueron los que presentaron un menor peso al nacimiento (6q24 vs *KCNJ11* o *INS* $p < 0,05$). Estos resultados concuerdan con la tasa de presencia de CIR, mayoritaria en los pacientes con alteraciones en la región 6q24 (7 de los 9 pacientes presentaba CIR, y en los dos restantes no obtuvimos información clínica acerca de esa condición). Como excepción, observamos que no había diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes portadores de mutaciones en 6q24 y los que portaban mutaciones en *ABCC8*, pero debido a uno de los pacientes con una alteración en *ABCC8*, que había

sufrido un parto prematuro independiente a la alteración que portaba.

Tabla 6. Los datos de la siguiente tabla se muestran como mediana+DE, excepto CIR, que se representa como porcentaje. Dx: edad de diagnóstico. EG: edad gestacional. PN: peso al nacimiento. GLU: glucemia al diagnóstico. CIR: crecimiento intrauterino retardado. * $p < 0.05$ para el test *U de Mann Whitney*.

	6q24	KCNJ11	ABCC8	INS
Dx*	3,5 + 40,87	60 + 52,70	11 + 12,04	60 + 114,98
EG*	39 + 3,78	39 + 1,25	38 + 5,68	40 + 0,5
PN*	1830 + 322,68	2730 + 340,02	2815 + 1118,76	2420 + 347,41
GLU (mg/dl)*	196,5 + 75,66	393 + 241,19	200 + 92,57	452 + 334,94
CIR (%)	77	22	0	0

Respecto a la edad de diagnóstico, observamos que los portadores de defectos moleculares en la región 6q24 presentaban una edad de diagnóstico más temprana que el resto. La comparación resultó estadísticamente significativa en los tres casos (6q24 vs *KCNJ11*, 6q24 vs *ABCC8* y 6q24 vs *INS* $p < 0,05$). Los pacientes con alteraciones en el gen *KCNJ11* y en el gen de la insulina no presentaban diferencias entre ellos en cuanto a la edad del diagnóstico. Sin embargo, sí que observamos una diferencia significativa entre los que portaban mutaciones en *ABCC8* y en *INS* ($p = 0,0121$).

Por otro lado, los portadores de mutaciones en el gen *INS* fueron los que mostraron los índices glucémicos más altos al diagnóstico, aunque no observamos ninguna diferencia estadística. En lo que a la edad gestacional se refiere, no se observaron diferencias entre los pacientes que presentaban alteraciones moleculares en distintos genes.

2. BÚSQUEDA DE NUEVOS GENES

Tras el análisis estructural de los genes clásicamente asociados a DN, se realizó una revisión de las características clínicas de los pacientes en los que no se había identificado ninguna alteración genética. Ocho de esos pacientes fueron seleccionados para realizarles el análisis de exoma completo.

2.1. Análisis del exoma

Las lecturas secuenciadas fueron mapeadas contra el genoma humano de referencia (UCSC GRCh37/hg19) y las variantes anotadas fueron filtradas siguiendo criterios de calidad específicos. Los resultados de esta serie de filtros se resumen en la Tabla 1 y 2 del Anexo 3.

Con el objetivo de identificar variantes potencialmente patológicas, se filtraron las variantes localizadas fuera de las regiones exónicas, las variantes sinónimas después, y por último, las variantes con un $MAF > 0.05$. Teniendo en cuenta que los progenitores eran sanos, y que esto podría indicar una alteración *de novo* en los casos índice, excluimos todas las variantes heredadas contrastando las variantes del índice contra las detectadas en el exoma de sus progenitores (Tabla 7). Seguimos esta estrategia en todas las familias, a excepción de una (familia 04, Tabla 7), en la que la madre también presentaba diabetes, por lo que en este caso optamos por quedarnos únicamente con las variantes que el probando había heredado por vía materna. El listado de los genes en los que identificamos variantes en cada uno de los 8 casos se resumen en las Tablas 3 y 4 del Anexo 3.

Una vez realizado el mapeo y filtrado técnico, el número de variantes detectadas se redujo a una media de 50.000 variantes en cada paciente (Tabla 7). De estas 50.000 variantes, únicamente alrededor de 1000 fueron variantes exónicas, no sinónimas y no descritas anteriormente según las bases de datos *1000 Genomes* y *dbSNP*. Una vez excluidas las variantes heredadas tanto por vía materna como por vía paterna, redujimos el número de variantes candidato a unas 30. En el caso del individuo 04, cuya madre también estaba afecta de diabetes, después de seleccionar únicamente las variantes que hubiera heredado por vía materna, redujimos el listado a 152.

La evaluación del efecto funcional de las variantes identificadas se realizó por medio de varios software de predicción, incluyendo *SIFT*, *Polyphen-2* y *MutationTaster*. Mediante estos software, seleccionamos aquellas variantes que tenían un potencial efecto deletéreo en la función del gen o de la proteína. Finalmente, para identificar potenciales variantes etiológicas, se realizó por un lado un análisis mediante el software *David functional annotation*, y por otro, una búsqueda bibliográfica en *PUBMED* para determinar si los genes identificados estaban relacionados con cualquier función interesante para la patogénesis de la enfermedad (es decir, relación con la función basal de las células beta pancreáticas, desarrollo o diferenciación de la célula beta, etc.). La serie de variantes candidato seleccionadas en cada caso índice se detalla en la Tabla 8. Las mutaciones fueron validadas por secuenciación Sanger en el probando y excluidas en ambos padres, exceptuando la familia 04, en la que la variante se confirmó tanto en el caso índice como en su madre, ambos diabéticos.

Tabla 7. Resumen del proceso de filtrado utilizado para la selección de variantes candidato en las 8 familias. *Única familia en la que filtramos las variantes seleccionando únicamente las heredadas por vía materna.

	DM0258			DM1026			DM1119			DM1603		
	I01	M01	P01	I02	M02	P02	I03	M03	P03	I04	M04	P04
Variantes (crudo)	282106	329364	322077	404941	294681	338404	288143	238972	311007	315935	211118	309529
Variantes después del filtrado técnico	45709	61314	49709	64228	46357	55328	57122	48107	61596	55838	41036	66061
Variantes exónicas	13151	15852	14170	16205	13643	14971	15413	13946	15946	15266	12741	16644
Variantes no sinónimas	5978	7226	6418	7402	6150	6795	7012	6385	7270	6915	5702	7598
Variantes que no constan en 1000g y/o con un MAF<0.05	1985	2026	2043	1998	1921	1976	2068	2213	2085	1964	2260	2244
Variantes que no constan en dbSNP	1279	1268	1325	1147	1202	1218	1282	1412	1317	1196	1604	1359
Priorización de novo	20			34			31			152*		

	DM1985			DM1997			DM2180			DM2566		
	I05	M05	P05	I06	M06	P06	I07	M07	P07	I08	M08	P08
Variantes (crudo)	316186	284847	274380	318222	255041	265084	305688	310126	355439	361470	296827	350142
Variantes después del filtrado técnico	64951	60496	56722	60355	51843	53483	50518	53068	58147	60184	50872	62142
Variantes exónicas	16413	16120	15621	15906	14769	14835	14519	14721	15390	16069	14506	16514
Variantes no sinónimas	7473	7332	7101	7202	6655	6722	6645	6684	6986	7322	6547	7510
Variantes que no constan en 1000g y/o con un MAF<0.05	2050	2068	2227	2144	2197	2136	2096	2110	2000	2274	2013	2409
Variantes que no constan en dbSNP	1286	1298	1412	1328	1431	1420	1268	1250	1212	1486	1311	1553
Priorización de novo	21			31			21			23		

Tabla 8. Resumen de las variantes candidato seleccionadas en cada caso índice. Se muestra el gen en el que está localizada la alteración, la posición cromosómica, la modificación que supone tanto a nivel de ADN codificante como a nivel protéico, y la predicción in silico del potencial patogénico de dichas alteraciones. PolyPhen/SIFT/MutationTaster: (-) tolerada o benigna; PolyPhen/MutationTaster: (+) dañina; SIFT: (+) posiblemente dañina, (++) probablemente dañina. dSNP/1000g: MAF de las variantes.

CASO	GEN	CROMOSOMA	POSICIÓN	TRANSCRIPTO	PRESENCIA	ADNC	PROTEÍNA	POLYPHEN-2	SIFT	MutationTaster	dSNP/1000g
I01	WFS1	chr4	6302499	NM_001145853	het	c.C977A	p.A326E	-	++	+	
I02	ATF4	chr22	39918522	NM_001675	het	c.C971T	p.A324V	-	++	+	0.0023
I03	-	-									
I04	KCNG2	chr18	77659091	NM_012283	het	c.G676A	p.V226M	++	++	+	
I05	STAT3	chr17	40485752	NM_003150	het	c.C988T	p.P330S	++	++	+	
I06	PTPRN2	chr7	157903582	NM_130842	het	c.C1531T	p.R511W	++	+	-	
I07	-	-									
I08	-	-									

3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN STAT3

La priorización de variantes obtenidas por medio de la secuenciación del exoma nos condujo a una alteración candidato en el gen *STAT3* en la familia DM1985. La alteración identificada era una transición de C a T en heterocigosis, en la posición 988 del ADN codificante, que reemplaza una prolina por una serina en la posición aminoacídica 330 (c.988C>T; p.Pro330Ser).

Los software caracterizaban la variante como potencialmente deletérea, y la comparación entre especies del aminoácido modificado mostraba además que la región estaba altamente conservada (Figura 16). Esta conservación evolutiva sugiere que el residuo puede tener un papel clave en la función de la proteína y que la modificación de este puede alterarla.

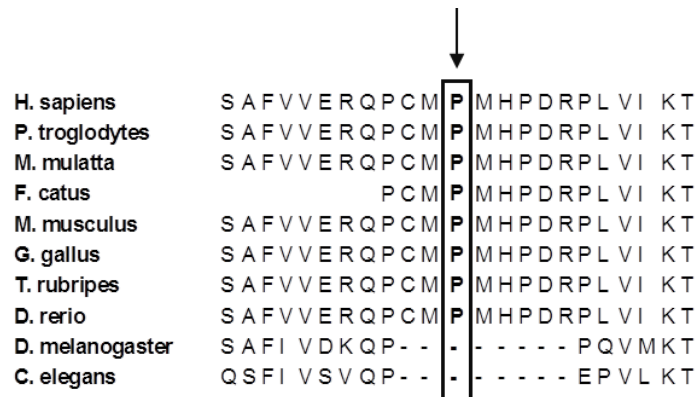


Figura 16. Alineamiento de la secuencia proteica de STAT3 de diferentes especies. Se observa que el aminoácido en posición 330 está altamente conservado entre las especies.

La clínica del paciente coincidía con la clínica de pacientes con alteraciones en dicho factor de transcripción ^{121,175,180}, por lo que se decidió realizar la caracterización funcional de dicha variante a nivel de célula β pancreática.

STAT3 es un factor de transcripción que se activa por el efecto de diversas citocinas, factores de crecimiento u hormonas ^{181,182}. Este factor es activado en el citoplasma por las quinasas *Janus* para ejercer un papel regulador en diversas funciones biológicas, incluyendo la diferenciación celular, la proliferación, la apoptosis o la inflamación ^{181,182}. Puede actuar tanto como activador como inhibidor de otros genes, dependiendo del promotor que tenga como diana ¹⁸³. En el páncreas, la señal de STAT3 es necesaria para el correcto desarrollo y mantenimiento del páncreas endocrino ¹⁸⁴. Además, la activación de STAT3 inducida por leptina juega un papel crucial en la inhibición de la secreción de insulina en rata ¹⁸⁵.

Los estudios funcionales realizados hasta el momento se centraban en la caracterización de las alteraciones del factor de transcripción STAT3 a nivel del sistema inmune. Teniendo en cuenta la implicación pancreática de este factor y que nuestro paciente presentaba diabetes, decidimos caracterizar nuestra alteración a nivel de célula beta pancreática.

3.1. La mutación identificada no afecta al estado de fosforilación de STAT3

El factor de transcripción STAT3 es activado por la fosforilación de la tirosina en posición 705, que induce la dimerización, la translocación nuclear y la unión al ADN ¹⁸⁶. Se ha demostrado previamente que los cambios de fosforilación en algunos residuos de Serina de la proteína STAT3 pueden afectar el estado de fosforilación de la Tirosina 705, afectando eventualmente a su activación ¹⁸⁷. La mutación que identificamos en STAT3 conduce a un cambio de un aminoácido no fosforilable (prolina) a un aminoácido fosforilable (serina), creando un potencial sitio de fosforilación que podría afectar el estado de fosforilación total y por tanto a la activación de STAT3.

Para determinar si la mutación afectaba al estado de fosforilación, la línea INS-1E de insulinoma de rata se transfectó con un plásmido de sobreexpresión vacío, con un plásmido que codifica para el STAT3 humano no mutado (“wild-type” (STAT3-WT)) o con un plásmido que codifica para el STAT3 mutado (STAT3-P330S). Como en condiciones basales el STAT3 se encuentra desfosforilado, las células fueron además tratadas con IL-6, una de las interleucinas que provoca la activación y por tanto fosforilación de este factor de transcripción.

El nivel de fosforilación de STAT3, así como la expresión a nivel de proteína de STAT3 total se determinaron mediante Western-blot (Figura 17).

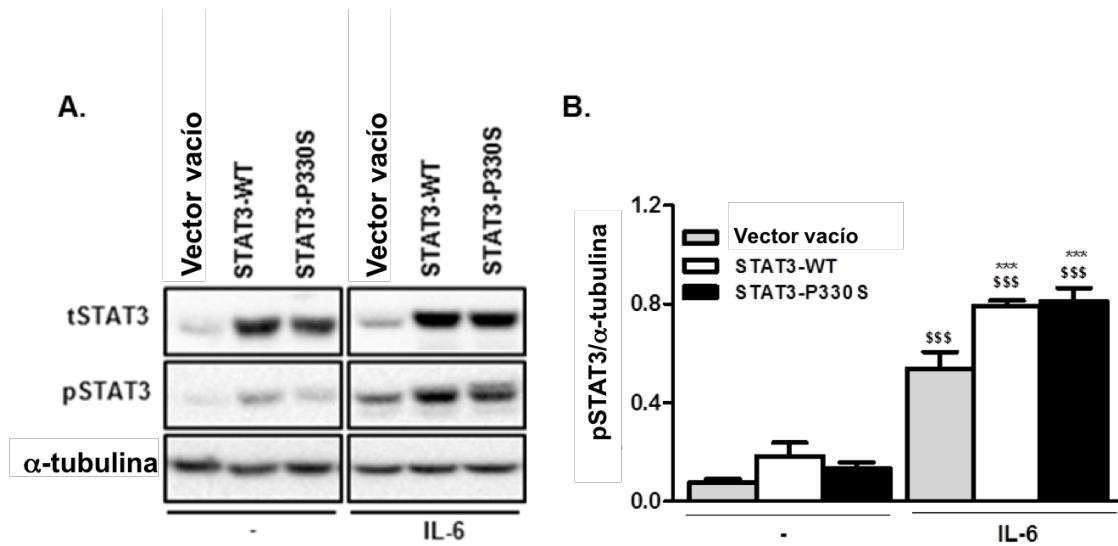


Figura 17. La mutación identificada en STAT3 no afecta al estado de fosforilación del mismo. (A-B) Las células INS-1E se transfectaron con un plásmido vacío, o con un plásmido que codifica para el STAT3 “wild type” humano (STAT3-WT) o el STAT3 mutado (STAT3-P330S). Se mantuvieron sin tratar o se trataron con IL-6 recombinante (20ng/ml) durante 12 horas. Los niveles de STAT3 total y fosforilado se analizaron por medio de Western blot usando α -tubulina como control de carga. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes (A). Los resultados de densitometría (B) están representados como medias \pm EEM, donde ^{\$\$\$}p<0.001 vs no tratadas (-) y transfectadas con el mismo plásmido; y ^{***}p<0.001 vs el plásmido vacío tratado con IL-6. Se realizó una ANOVA seguido de un test *t* de Student corregido por Bonferroni.

Tanto en condiciones basales como tras la exposición a IL-6, los niveles endógenos de proteína STAT3 total eran muy bajos en comparación a las células transfectadas con los plásmidos que sobreexpresaban STAT3-WT o STAT3-P330S (Figura 17A). Estos resultados confirmaron la eficiencia de los plásmidos para sobreexpresar STAT3 en nuestro modelo *in vitro* de célula β .

Bajo condiciones no tratadas, la fosforilación de STAT3 fue insignificante en todas las condiciones y no difirió entre las células transfectadas con el plásmido que sobreexpresaba el STAT3-WT y las que sobreexpresaban STAT3 mutado (Figura 17A y 17B). El tratamiento con IL-6 (20ng/ml) condujo a un aumento de la fosforilación de STAT3 en todas las condiciones experimentales, pero los niveles de fosforilación no difirieron entre las células transfectadas con el plásmido WT y las transfectadas con el plásmido STAT3 mutado (Figura 17A y 17B).

Estos resultados demostraron que la mutación P330S no afecta al estado de fosforilación de STAT3 ni en condiciones basales ni tras la estimulación de las células con IL-6.

3.2. La mutación identificada aumenta la actividad del factor de transcripción STAT3

Con el objetivo de determinar cómo afectaba la mutación a la actividad del factor de transcripción STAT3, realizamos un ensayo de luciferasa. El ensayo de luciferasa nos permite monitorizar la actividad de STAT3 mediante un plásmido que contiene el gen de la luciferasa bajo el control de un promotor con lugares de unión que reconoce STAT3.

La sobreexpresión de la proteína STAT3 mutada provocó un aumento de la actividad del gen reportero luciferasa del 22% en comparación con la sobreexpresión de la proteína STAT3-WT (Figura 18A). Estos resultados se confirmaron en células tratadas

con IL-6, aunque el aumento provocado por el STAT3 mutado en la actividad del gen reportero luciferasa fue menos pronunciado que en condiciones basales (Figura 18B).

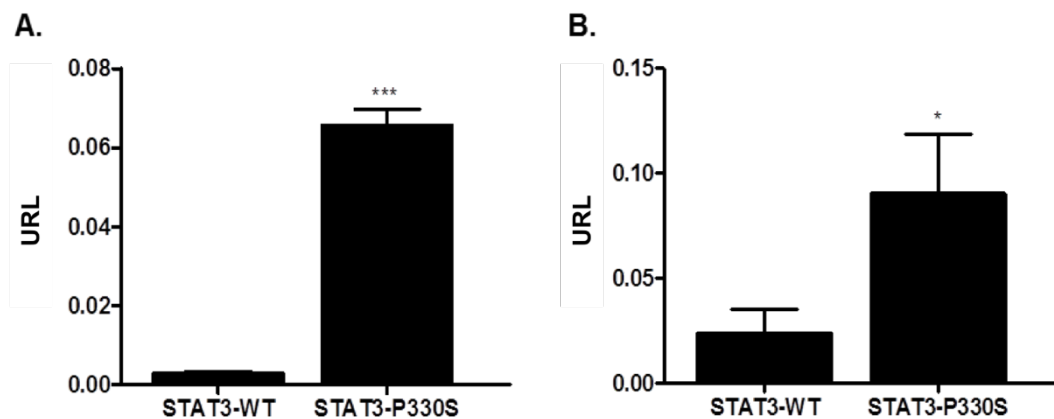


Figura 18. La mutación identificada P330S aumenta la actividad del factor de transcripción STAT3. (A-B) Las células se transfectaron como en la Figura 17 y se co-transfectaron con un constructo de luciferasa que responde STAT3 y con un constructo que expresa *Renilla* de forma constitutiva (usada como control interno). Tras 24 horas, las células se dejaron sin tratar (A) o se trataron con IL-6 (20ng/ml) durante 12 horas (B). Posteriormente se determinó la actividad de la luciferasa. Los resultados son medias \pm EEM de seis experimentos independientes, mostrados como unidades relativas de luciferasa (URL), donde *** p <0.001 y * p <0.05 vs células transfectadas con STAT3-WT. Se realizó un test t de Student.

Estos resultados demuestran que la mutación P330S induce una hiperactivación constitutiva de STAT3 y sugieren que independientemente de su estado de fosforilación, el STAT3 mutante tiene una capacidad de unión al ADN incrementada que conduce a una actividad transcripcional mayor de sus genes diana.

3.3. La mutación activante en STAT3 provoca una disminución en la expresión del factor de transcripción Isl-1

STAT3 juega un papel crucial en ciertas funciones basales de las células beta, como la regulación de la secreción de insulina ^{184,185}. Con el objetivo de caracterizar el efecto funcional de la mutación en el funcionamiento basal de la célula beta, decidimos evaluar el posible impacto de esta en la expresión de genes implicados en la ruta de la secreción de insulina.

La secreción de insulina está regulada por varios factores de transcripción tales como Pax4, Nkx6.1, Maf, Foxa, Pdx1 e Isl-1, la mayoría de los cuales son necesarios para el desarrollo pancreático y las funciones basales de las células beta pancreáticas ¹⁸⁸. Mediante la predicción bioinformática de lugares de unión potenciales para STAT3 observamos que tres factores de transcripción conocidos por regular la expresión de insulina albergaban sitios de unión para el factor de transcripción STAT3 en sus promotores: Isl-1, PAX6 y LMX1A.

Con el objetivo de ver si el control de la expresión de dichos factores de transcripción se veía afectado por la mutación en STAT3, examinamos el efecto de la mutación activadora en la expresión endógena de *Isl-1*, *PAX6* y *LMX1A* en células β pancreáticas tanto de rata como de humanas. Para ello, se analizó la expresión a nivel de ARN de estos genes en células transfectadas con los plásmidos de sobreexpresión de STAT3-WT y STAT3 mutado (Figura 19).

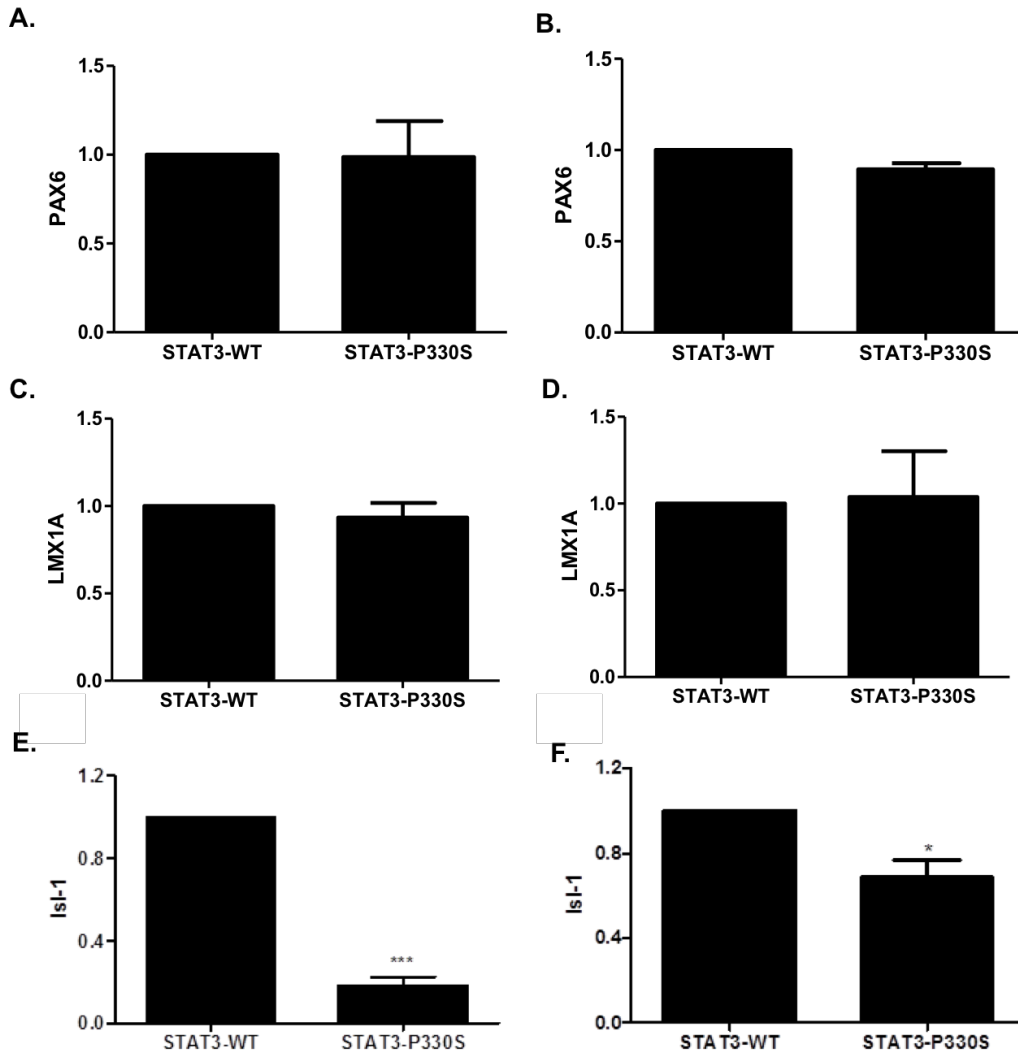


Figura 19. La mutación activante en STAT3 disminuye la expresión del factor de transcripción *Isl-1* en células beta pancreáticas de rata y de humano, pero no afecta a la expresión de los factores *PAX6* y *LMX1A*. INS-1E y ENDOC-βH1 fueron transfectadas con un plásmido que codifica el STAT3-WT o el STAT3-P330S. Se determinó la expresión a nivel de ARN de los genes *PAX6*, *LMX1A* e *Isl-1* de rata (A-C-E) y humano (B-D-F) mediante RT-PCR. Los resultados se normalizaron con la *GAPDH* (A-C-E) o *β-actina* (B-D-F) y con la expresión de STAT3 para el control de las diferencias en la eficiencia de la transfección. Los resultados son medias ± EEM de 3-6 experimentos independientes. *** $p < 0.001$ y * $p < 0.05$ vs STAT3-WT; Se utilizó un test *t* de Student.

Mientras que la expresión de *PAX6* y *LMX1A* no difirió entre las células transfectadas con el plásmido WT y el plásmido STAT3 mutado (Figura 19, A-D), la expresión de *Isl-1* se redujo en un 75% en células β de rata en comparación con las células transfectadas con el plásmido de sobreexpresión STAT3-WT (Figura 19E). Estos resultados se confirmaron en células β humanas, aunque la mutación en STAT3 provocaba una disminución de la expresión de *Isl-1* menos pronunciada (32%) que en el caso de las células β de rata (Figura 19F).

3.4. La inhibición de *Isl-1* provocada por el STAT3 mutado conduce a una disminución de la expresión de la insulina

El factor de transcripción *Isl-1* se expresa en los tres tipos de células principales del páncreas endocrino y se ha demostrado que participa en la regulación de la expresión de insulina en célula β pancreática¹⁸⁹. En individuos franceses caucásicos con obesidad mórbida, un SNP en el gen *Isl-1* ha sido asociado con el riesgo a padecer diabetes tipo 2 y con el aumento del peso corporal¹⁹⁰.

El factor de transcripción STAT3 está implicado en la regulación transcripcional de *Isl-1* y se ha demostrado que en roedores, la fosforilación de STAT3 inducida por leptina conduce a una disminución de la actividad de *Isl-1* y a una reducción en la expresión de la insulina¹⁸⁵, sugiriendo que la forma activada (fosforilada) de STAT3 es un inhibidor de la transcripción de *Isl-1*.

Para evaluar si la inhibición de Isl-1 provocada por la mutación en STAT3 correlacionaba con una menor expresión de la insulina, se determinaron los niveles de ARN de la insulina en células β pancreáticas transfectadas con los plásmidos STAT3-WT y STAT3-P330S (Figura 20). Debido a que en el caso de la rata existe una duplicación del gen de la insulina que evolutivamente ha dado resultado dos isoformas funcionales, analizamos la expresión de ambos genes, *INS-1* e *INS-2* ¹⁹¹.

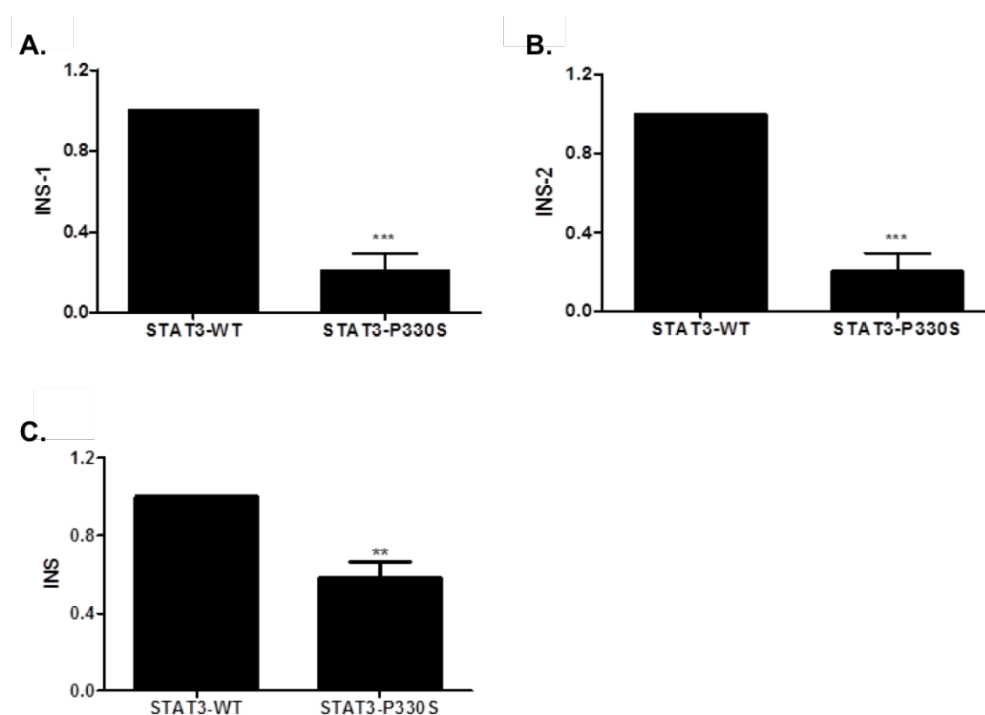


Figura 20. La disminución de la expresión de Isl-1 provocada por la mutación en STAT3 conduce a una disminución en la expresión de la insulina. Las células INS-1E y ENDOC- β H1 fueron transfectadas con un plásmido que codifica el STAT3-WT o el STAT3-P330S. Se determinó la expresión de *INS-1* (A), *INS-2* (B) de rata y de *INS* (C) humano mediante RT-PCR. Los resultados se normalizaron con la *GAPDH* (A-B) o *β -actina* (C) y con la expresión de STAT3 para el control de las diferencias en la eficiencia de la transfección. Los resultados son medias \pm EEM de 4-6 experimentos independientes, donde *** p <0.001 y ** p <0.005 vs STAT3-WT; Se realizó un test *t* de Student.

La expresión de *INS-1* e *INS-2* era un 70% más baja en las células β de rata transfectadas con el plásmido de sobreexpresión de STAT3 mutado (Figura 20A y 20B). Estos resultados se confirmaron en las células β pancreáticas humanas, aunque la disminución de la expresión de la insulina en las células transfectadas con la proteína STAT3 mutada era menos pronunciada (42%) que en las células β de rata (Figura 20C).

Esto resultados se confirmaron a nivel proteico como se observa en la Figura 21. La reducción en la expresión de *Isl-1* y de la insulina a nivel de ARN concuerda con la disminución a nivel de proteína.

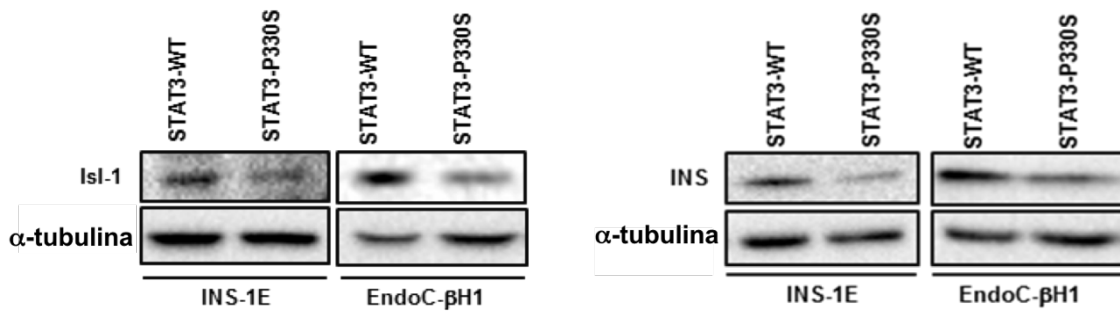


Figura 21. La mutación en STAT3 disminuye la expresión de Isl-1 y de la insulina a nivel de proteína. (A y B) La expresión de las proteínas Isl-1 e INS de rata y humano en células transfectadas con el plásmido STAT3-WT y STAT3-P330S se analizaron por Western blot usando α -tubulina como control de carga.

3.5. La mutación activante identificada aumenta la capacidad de unión de STAT3 a la región promotora de *Isl-1*

Para determinar si la mutación en STAT3 aumenta su capacidad de unión al promotor del gen *Isl-1*, realizamos un experimento de inmunoprecipitación de cromatina (ChiP).

Las células INS-1E fueron transfectadas con el plásmido de sobreexpresión de STAT3-WT o STAT3-P330S y utilizando fragmentos de ADN precipitados con el anticuerpo anti-STAT3 como molde, la región promotora de *Isl-1* en la posición -1262 a -1143 pb (anteriormente se ha demostrado que es un lugar de unión para el factor de transcripción STAT3¹⁸⁵) se cuantificó mediante PCR cuantitativa.

Como se muestra en la Figura 22, el factor de transcripción STAT3 mutado mostraba una mayor capacidad de unión a la región promotora de *Isl-1* en comparación con la proteína WT. Con las muestras inmunoprecipitadas con el anticuerpo control IgG no se consiguió amplificación, por lo que se concluyó que las amplificaciones obtenidas en las muestras inmunoprecipitadas con el anticuerpo específico para STAT3 eran altamente específicas.

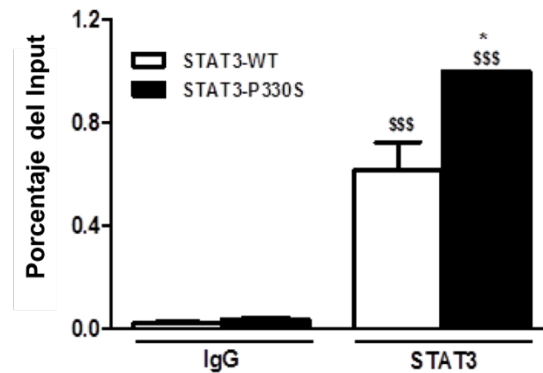


Figura 22. La mutación activante identificada aumenta la capacidad de unión de STAT3 a la región promotora de *Isl-1*. El ChIP revela un aumento en la capacidad de unión de STAT3 al promotor de *Isl-1*. Se utilizó el anticuerpo IgG como control negativo. Los resultados son medias \pm EEM de 4 experimentos independientes mostrados como porcentaje del input. * $p < 0.05$ vs células transfectadas con STAT3-WT; *** $p < 0.001$ vs IgG y células transfectadas con el mismo plásmido. Se realizó una ANOVA seguido de un test *t* de Student corregido por Bonferroni.

3.6. La mutación en STAT3 provoca una disminución de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa

Para determinar si el STAT3 mutado causaba una alteración en la secreción de insulina, analizamos la secreción de insulina estimulada por glucosa en células β de rata y de humanas transfectadas con los plásmidos STAT3-WT o STAT3-P330S.

Como se muestra en la Figura 23A, en las células INS-1E transfectadas con el plásmido STAT3-WT, tanto en concentraciones altas de glucosa (16,7 mM) como en

concentraciones altas de glucosa en combinación con Forskolina, la secreción de insulina aumentaba entre 2 y 5 veces, en comparación con las células sometidas a concentraciones de glucosa bajas (1,67mM). Las células β humanas respondían peor a la estimulación con glucosa y solo se observó un aumento significativo al comparar las células tratadas con 20mM glucosa en combinación con IBMX y las células tratadas en medio sin glucosa (Figura 23B).

Bajo cualquier concentración de glucosa, la liberación de insulina en las células de rata transfectadas con el plásmido STAT3 mutado era menor que en las células transfectadas con el plásmido STAT3-WT. Así, las células transfectadas con el plásmido STAT3-P330S liberaron alrededor de un 40-60% menos de insulina que las células transfectadas con la proteína STAT3-WT.

Estos resultados se confirmaron en la línea de células β pancreáticas humanas ENDOC- β H1 (figura 23B). La sobreexpresión del plásmido STAT3 mutado condujo a una disminución en la secreción de insulina tanto en el caso de las células estimuladas con concentraciones altas de glucosa (20mM) como con concentraciones altas de glucosa en combinación con IBMX.

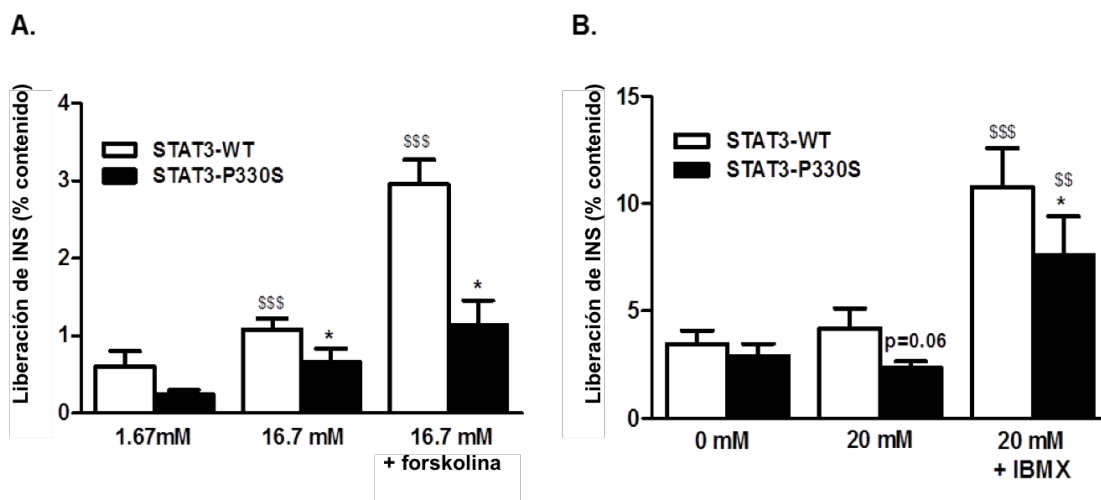


Figura 23. La mutación en el factor de transcripción STAT3 provoca una disminución de la liberación de insulina. Las líneas INS-1E (A) y ENDOC-βH1 (B) fueron transfectadas con un plásmido que codifica el STAT3-WT o STAT3-P330S. Se determinó la secreción de insulina, después de una estimulación a distintas concentraciones de glucosa: 1.67 mmol/L, 16.7 mmol/L glucosa o 16.7 mmol/L glucosa + 10 μM forskolina en el caso de las INS-1E (A) o 0 mmol/L glucosa, 20mmol glucosa o 20mmol glucosa + 45 μM IBMX en el caso de las EndoC-βH1 (B). Los valores obtenidos de insulina se normalizaron por la expresión de STAT3 para controlar las diferencias en la eficiencia de la transfección y se representan como porcentaje del contenido de insulina. Los resultados son medias ± EEM de 5-6 experimentos independientes, donde * $p < 0.05$ vs células transfectadas con STAT3-WT bajo la misma condición de estimulación; \$\$\$ $p < 0.001$ y \$\$ $p < 0.01$ vs estimulación de 1.67mM glucosa (A) o 0mM glucosa (B) y células transfectadas con el mismo plásmido. Se realizó una ANOVA seguido de un test *t* de Student corregido por Bonferroni.

Para determinar si la disminución en la secreción de insulina correlacionaba con una disminución del contenido intracelular de la insulina se analizó el contenido intracelular de la insulina teniendo en cuenta la cantidad de proteína total (Figura 24).

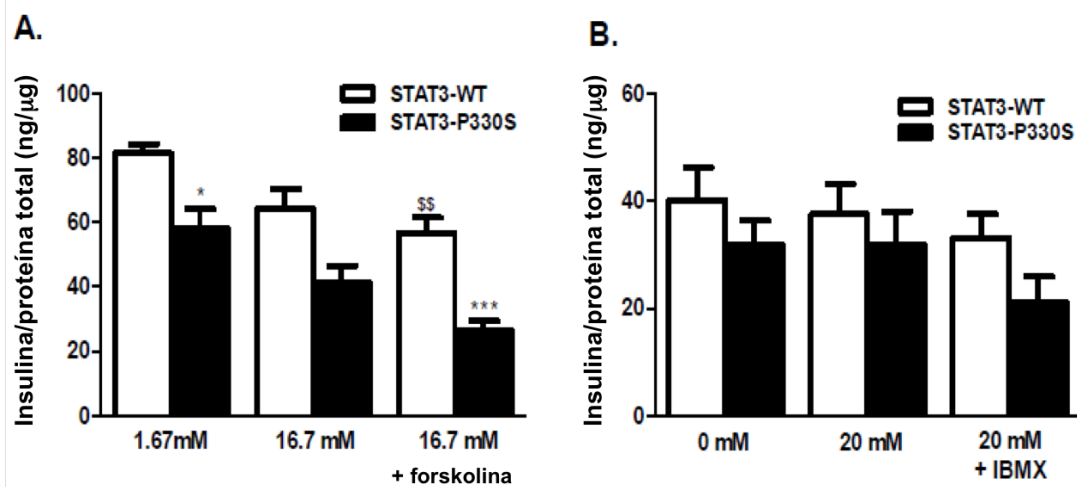


Figura 24. La mutación en STAT3 reduce el contenido total de insulina tanto en células β de rata como en células β humanas. Las líneas INS-1E (A) y ENDOC- β H1 (B) fueron transfectadas con un plásmido que codifica el STAT3-WT o STAT3-P330S. Las células se estimularon con distintas concentraciones de glucosa: 1.67 mmol/L, 16.7 mmol/L glucosa o 16.7 mmol/L glucosa + 10 μ M forskolina en el caso de las INS-1E (A) o 0 mmol/L glucosa, 20mmol glucosa o 20mmol glucosa + 45 μ M IBMX en el caso de las EndoC- β H1 (B). El contenido total de insulina se midió en los lisados celulares y se corrigió por el contenido proteico total y por la expresión de STAT3 como control de las diferencias en la eficiencia de la transfección. Los resultados son medias \pm EEM de 5-6 experimentos independientes, donde ^{***} $p < 0.001$ y ^{*} $p < 0.05$ vs células transfectadas con STAT3 WT bajo la misma condición de estimulación; ^{\$\$} $p < 0.01$ vs 1.67mM de glucosa y transfectados con el mismo plásmido. Se realizó una ANOVA seguido de un test *t* de Student corregido por Bonferroni.

El análisis del contenido intracelular de insulina mostró que la sobreexpresión de la proteína STAT3 mutada disminuía el contenido de insulina intracelular en comparación con las células transfectadas con el plásmido STAT3-WT (Figura 9). Estos resultados confirmaron los resultados en el análisis proteico obtenidos por Western blot (Figura 6),

donde observamos una disminución en los niveles de proteína INS en las células transfectadas con el plásmido STAT3-P330S.

DISCUSIÓN

El objetivo principal del presente trabajo ha sido identificar las alteraciones genéticas responsables de la diabetes neonatal o de comienzo precoz en pacientes sin alteraciones potencialmente patológicas en genes clásicamente asociados a la enfermedad. Para llevar a cabo este estudio, inicialmente se realizó un estudio genético de los genes asociados con la diabetes neonatal en nuestra cohorte de pacientes. Tras realizar la secuenciación de dichos genes y descartar mutaciones que pudieran explicar la clínica de los pacientes, se seleccionaron ocho pacientes para realizar un estudio de exoma completo con el fin de identificar nuevas mutaciones asociadas con la enfermedad. Por último, se realizó el estudio funcional de una de las alteraciones identificadas en el análisis del exoma con el fin de establecer el impacto funcional de dicha variante en la patogénesis de la enfermedad a nivel de célula β pancreática.

1. ANÁLISIS DE LOS GENES CLASICAMENTE ASOCIADOS A LA DIABETES NEONATAL

En nuestra cohorte de 42 pacientes, el estudio estructural de los genes *ABCC8*, *KCNJ11* e *INS* y el estudio de la región 6q24 reveló alteraciones en 30 de los afectados (71%). Entre las mutaciones detectadas, 8 no habían sido descritas previamente en la literatura. La patogenicidad de las mutaciones se demostró usando los software de predicción y la cosegregación de la mutación en la familia.

En doce pacientes (29%) no se detectaron mutaciones en ninguno de los genes analizados. Estos resultados concuerdan con otros estudios realizados previamente, en

los que entre un 20 y un 40% de los pacientes con diabetes neonatal no presentaron mutaciones en los genes clásicamente asociados con la diabetes neonatal ⁸. Por ejemplo, un estudio realizado en una cohorte de pacientes en Japón no consiguió identificar la causa genética en el 26% de los pacientes analizados ¹⁹². En estudios realizados en cohortes chinas ¹⁹³ y ucranianas ¹⁹⁴, el porcentaje de pacientes a los que no se les detectó ninguna alteración en los genes clásicamente asociados a la DN era del 48% y 45% respectivamente. En un estudio internacional más reciente realizado en el Reino Unido ¹⁹⁵, el porcentaje de pacientes sin causa genética conocida todavía seguía siendo del 20%.

En nuestra cohorte, un 43% de los pacientes presentaba alteraciones en los genes que codifican para los canales de potasio (*KCNJ11* y *ABCC8*), mientras que el 30% portaba alteraciones en la región 6q24 y un 23% en el gen de la insulina. Además, en uno de los pacientes que además de padecer diabetes neonatal tenía un cuadro poliautoinmune caracterizado por enteropatía y autoinmunidad tiroidea, detectamos una alteración en el gen *FOXP3*, que ha sido previamente asociado al síndrome IPEX, un cuadro multisistémico autoinmune que incluye las patologías que padecía el paciente (enteropatía que causa diarrea severa y desnutrición, eczema, autoinmunidad tiroidea, etc.) ¹²⁰. En concordancia con la prevalencia descrita por otros autores ⁷⁶, la mayoría de los casos de diabetes neonatal permanente presentan alteraciones en los canales de potasio, siendo las alteraciones en la insulina la segunda causa mas común. También de acuerdo con otros estudios, los pacientes con DNT de nuestra cohorte presentan mayoritariamente alteraciones en la región 6q24.

1.1. Alteraciones en la región 6q24

Un total del 70% de las TNDM son causadas por defectos que causan la sobreexpresión paterna de genes imprintados localizados en la región 6q24 ⁵⁶. En nuestra cohorte sin embargo, sólo el 40% del total de pacientes con TNDM presentaron alteraciones en la región 6q24.

En ciertos casos, la diabetes neonatal se caracteriza por un severo retraso del crecimiento intrauterino (CIR) y el diagnóstico de la diabetes en los primeros días de vida. Varios estudios han asociado estas características con alteraciones en la sobreexpresión de los genes de la región 6q24 ⁴⁹. En nuestra cohorte, todos los pacientes que tenían alteraciones en la región 6q24 se caracterizaron por presentar un CIR severo. Teniendo en cuenta estos resultados, parece que la presencia de CIR está claramente ligada a alteraciones en la región 6q24, por lo que esta característica clínica en pacientes con diabetes neonatal podría servir como marcador para priorizar el análisis de la región 6q24 en los procesos de diagnóstico genético.

1.2. Alteraciones en los canales de potasio

Todos los pacientes con alteraciones en *ABCC8*, a excepción de uno, heredaron la mutación de uno de sus progenitores. En una de las familias, aun habiendo heredado la mutación por vía paterna, el clínico refiere que el padre es sano. Este mismo hecho se ha descrito en la literatura en distintas familias que presentan alteraciones en *ABCC8*. Se calcula que alrededor de un 30% de los pacientes con diabetes monogénica asociada a

ABCC8 tienen progenitores asintomáticos portadores de la misma alteración^{68,76}. Este fenómeno también se ha descrito en otras formas monogénicas de diabetes como en el caso de la DN causada por mutaciones en el gen *HNF1B*, donde se ha observado que un 23% de los portadores de mutaciones causativas no presentaban diabetes¹⁹⁶. Esto sugiere que algunas mutaciones asociadas a esta patología tienen penetrancia incompleta

Que las alteraciones asociadas a la diabetes neonatal puedan tener una penetrancia incompleta es un factor que hay que tener en cuenta a la hora de descartar posibles mutaciones etiológicas, ya que puede darse casos en los que las alteraciones son heredadas de progenitores asintomáticos. Por ello, en estos casos, antes de descartar dichas mutaciones sería conveniente realizar estudios de predicción *in silico* para predecir potenciales efectos funcionales de la mutación que no hayan sido previamente descritos. Los resultados que proporcionan los softwares de predicción se deben emplearse sólo como indicativos del posible impacto patogénico de las variantes detectadas, y por lo tanto, para establecer si una variante nueva es patogénica es necesario estudiar su efecto funcional de manera experimental en modelos *in vitro* o *in vivo*.

Por el contrario, las alteraciones en el gen *KCNJ11* identificadas en pacientes de nuestra cohorte presentaron penetrancia completa, ya que en todas las familias la alteración detectada estaba asociada a la aparición de diabetes. Respecto al tipo de diabetes, todos los pacientes presentaban diabetes neonatal permanente, a excepción de uno, que presentaba una forma transitoria. Como ya se ha descrito anteriormente, las alteraciones en *KCNJ11* comúnmente desencadenan una forma permanente, pero

pueden aparecer asociadas a formas transitorias ^{54-56,197,198}. En las formas transitorias, parece que las mutaciones son funcionalmente menos severas que en las formas permanentes según estudios *in vitro* ¹⁹⁷.

Se desconocen la prevalencia de la DNT con mutaciones en los canales de potasio y las características clínicas asociadas. Las primeras referencias acerca de los pacientes con DNT y mutaciones en los canales de potasio sugieren que tanto la aparición como la remisión de la diabetes de estos es más tardía que en los que presentan alteraciones en la región 6q24 ^{56,197}. En el caso de nuestra cohorte, el paciente que presenta la mutación en KCNJ11 y DNT debutó a los 3 meses, mientras que los pacientes con DNT en los que identificamos alteraciones en 6q24 debutaron con una mediana de 9,5 días.

Debido a que la proteína Kir6.2 también se expresa en otras tejidos, incluyendo tejido neuronal y muscular, aproximadamente un 20% tienen diversos grados de disfunción y deterioro neurológico, que forman parte del síndrome DEND ^{88, 89}. Dos de nuestros pacientes, DM1978 y DM2112 presentan además de la diabetes neonatal, diversos trastornos neurológicos (retraso psicomotor, convulsiones y retraso del lenguaje). En ambos pacientes identificamos la alteración V59M en el gen KCNJ11, mutación que ya ha sido descrita asociada a la aparición de este síndrome de carácter neurológico ⁹², por lo que en nuestra cohorte confirmamos que existe esa relación entre el genotipo y el fenotipo.

1.3. Alteraciones en el gen de la insulina

Dado el papel crucial que tiene la insulina en la homeostasis de la glucosa, es de esperar que las mutaciones en esta proteína puedan estar implicadas en el desarrollo de la patología. De hecho, las alteraciones en el gen de la insulina suponen la tercera causa más frecuente de los casos de diabetes monogénicas neonatales ^{95,96,105}.

Teniendo en cuenta estos datos, decidimos estudiar el gen de la insulina en los pacientes en los que habíamos excluido alteraciones en *KCNJ11*, *ABCC8* y en la región 6q24. En nuestra cohorte de pacientes detectamos que siete pacientes tenían mutaciones en el gen de la insulina y que además cinco de ellos presentaban las mutaciones en regiones codificantes del gen (exones).

Según la literatura científica, las mutaciones en las regiones codificantes del gen de la insulina tienen un efecto funcional similar que está relacionado con la interrupción de la biosíntesis de insulina o con la activación del estrés del retículo endoplasmático. De hecho, algunas de las mutaciones que hemos detectado en nuestros pacientes provocan alteraciones en residuos de cisteína reactivos o están localizadas en residuos que participan en la formación de puentes disulfuro. Estas características indican que estas mutaciones podrían interferir en la correcta biosíntesis de la insulina, ya que la formación de puentes disulfuro es crucial para el correcto plegamiento de la proteína ^{94-96,105}. Y es que la insulina se sintetiza a partir de la proinsulina (precursora), que sufrirá ciertas modificaciones enzimáticas, que eliminarán concretamente una región central de la proteína (denominada péptido C) ^{199,200}. Este corte hace que queden libres los extremos

C-terminal y N-terminal, que se unirán por medio de los enlaces disulfuro para formar la molécula de insulina.

En cuanto a las alteraciones en las regiones no codificantes del gen de la insulina, se ha descrito previamente que pueden interferir en los mecanismos postranscripcionales que sufre la insulina para convertirse en una molécula madura y activa²⁰¹⁻²⁰³. Por ejemplo, un elemento CIS localizado en la región 5'UTR del RNA mensajero de la preproinsulina es esencial para la activación de la traducción de la insulina en respuesta a la glucosa²⁰². Otro ejemplo clave serían las deleciones localizadas en la región promotora de la insulina, concretamente en los elementos C1 y E1 que a su vez son regiones que reconocen los factores de transcripción MAFA y NEUROD1. Las deleciones en estas regiones provocan que estos factores de transcripción no se puedan unir a la zona para activar la transcripción de la insulina²⁰⁴. Además, estudios funcionales han demostrado que las mutaciones en regiones UTR del gen de la insulina tienen un impacto deletéreo en la traducción y estabilidad de la proteína, y por lo tanto, en la actividad de la misma²⁰⁵⁻²⁰⁷.

Que las alteraciones asociadas a la diabetes neonatal en el gen de la insulina puedan localizarse en regiones no codificantes es un factor que hay que tener en cuenta a la hora de descartar posibles mutaciones etiológicas. Por ello, en estos casos, antes de descartar este *locus* como causante de la patología sería conveniente realizar estudios tanto de las regiones codificantes como de las no codificantes.

2. Correlación clínico-genética

Con el objetivo de determinar una relación entre la variante detectada (genotipo) y el fenotipo patogénico analizamos los parámetros clínicos de los pacientes habiéndolos agrupado en cuanto a la alteración molecular que portaban.

Observamos que los pacientes con alteraciones en la región 6q24 fueron los que presentaron un menor peso al nacimiento, dato que concuerda con la tasa de presencia de CIR, mayoritaria en los pacientes con alteraciones en la región 6q24^{44,56}. Estos pacientes también eran el grupo que presentaba una edad de diagnóstico más temprana que el resto. El diagnóstico precoz podría deberse al CIR que presentan la mayoría de los casos, clínica que provocaría un estudio y control del paciente más exhaustivos por parte de los clínicos, que al fin y al cabo llevaría a la detección de la diabetes y del defecto molecular.

Según algunos estudios^{75,96}, los pacientes con mutaciones en heterocigosis en el gen *INS* presentan una clínica similar (edad al diagnóstico y peso al nacimiento) a los pacientes que portan alteraciones en los canales K_{ATP} . Sin embargo, los pacientes que presentan mutaciones recesivas en el gen de la insulina, tienen una clínica más similar a los que portan alteraciones en la región 6q24 o mutaciones recesivas en el gen de la glucoquinasa (*GCK*). En nuestra cohorte de pacientes, todas las mutaciones detectadas en el gen de la insulina estaban en heterocigosis, y tal como se había descrito previamente en la literatura, estos pacientes tenían una edad de diagnóstico y peso al

nacimiento similar a los pacientes con alteraciones en los canales de potasio. La mediana del peso al nacimiento de los pacientes con alteraciones en *KCNJ11*, *ABCC8* e *INS* de nuestra cohorte fue de 2730g, 2815g y 2420g respectivamente. En cuanto a la mediana de edad de diagnóstico, los pacientes con alteraciones en *INS* y *KCNJ11* presentaban una mediana de 60 días mientras que los pacientes con alteraciones en *ABCC8* una mediana de 11 días. Esta última diferencia probablemente surge por la diferencia en el número de pacientes diagnosticados con cada alteración molecular, y que en el caso del *ABCC8* únicamente fueron cuatro pacientes, respecto a los 9 y 7 pacientes diagnosticados con mutaciones en *KCNJ11* e *INS* respectivamente.

En resumen, teniendo en cuenta las características clínicas de nuestros pacientes, concretamente la edad al diagnóstico y el peso al nacimiento, podemos concluir que en nuestra cohorte, los pacientes con alteraciones en la región 6q24 son los que muestran una clínica más característica. Estos pacientes tienen un menor peso al nacimiento y son diagnosticados en los primeros días de vida, mientras que los pacientes con alteraciones en los canales de potasio o en el gen de la insulina tienen un peso al nacimiento más alto y pueden ser diagnosticados hasta 6 meses después del nacimiento. A la hora de realizar estudios de diagnóstico genético, estas diferencias en las características clínicas pueden ser orientativas de qué genes pueden estar alterados y por tanto, pueden utilizarse para priorizar el análisis de un gen en concreto.

3. Análisis de exoma completo

En ocho pacientes en los que no detectamos mutaciones en los genes clásicamente asociados a diabetes neonatal, realizamos un estudio de exoma completo con la intención de identificar mutaciones potencialmente patogénicas. Gracias al estudio de exoma, identificamos cinco variantes potencialmente patogénicas que podrían explicar la patogénesis de la enfermedad en dichos pacientes.

En el caso DM0258, identificamos una variante en el gen *WFS1* (*Wolframin ER Transmembrane Glycoprotein*). La Wolframina es una proteína localizada en el retículo endoplasmático, que participa en la síntesis, plegamiento y modificación de otras proteínas ¹⁴⁸. Las alteraciones en el gen que la codifica (*WFS1*), están asociadas al síndrome de Wolfram ¹⁴⁹, una enfermedad neurodegenerativa rara, autosómica recesiva, caracterizada por la aparición precoz de diabetes junto con atrofia óptica, diabetes insípida y sordera (MIM 222300).

La clínica del paciente podría explicarse con este síndrome (el paciente presentaba sordera neurosensorial y catarata congénita además de diabetes neonatal), sin embargo, únicamente habíamos localizado una alteración en heterocigosis, y este síndrome se caracteriza por una herencia recesiva. Por ello, inicialmente se descartó la posibilidad de que en el proceso de filtrado hubiéramos descartado alguna otra alteración en el mismo gen, debido a que nuestro proceso de selección se asumía una estrategia *de novo*. Es decir, descartamos la posibilidad de que el paciente hubiera heredado un alelo alterado por alguno de sus padres, y la alteración en el otro alelo hubiera surgido *de novo*.

Estudios previamente publicados por otros autores, habían descrito un síndrome denominado “Wolfram-like”, en el que la clínica era más leve que en el Síndrome de Wolfram clásico^{208–211}. El síndrome “Wolfram-like” tiene herencia autosómica dominante, por lo que la mutación detectada mediante el análisis de exoma en el gen *WFS1* podría ser la responsable de la clínica en este paciente.

En el caso DM1026, la variante candidato se localizaba en el gen *ATF4* (*Activating Transcription Factor 4*) que codifica un factor de transcripción con el mismo nombre. Este factor de transcripción está relacionado con el metabolismo de la glucosa y está implicado en la ruta metabólica de la secreción de insulina²¹². El factor *ATF4* pertenece a la familia de las proteínas que detectan regiones específicas para la unión del AMP cíclico (AMPc). Estudios previos han demostrado que en modelos animales la ausencia de *ATF4* además de provocar anemia y un desarrollo anormal del ojo, está implicado en la regulación de la homeostasis energética y en el metabolismo de la glucosa^{213–215}. Además, estudios en modelos *in vitro* demuestran que *ATF4* interactúa con *TRB3* (*Pseudokinase Tribbles homolog 3*) y que este complejo a su vez actúa como un competidor inhibitor del AMPc, impidiendo que este se una al factor de transcripción *CREB* (*cAMP Response Element-Binding*). Este factor de transcripción es clave en la regulación de los genes implicados en la exocitosis²¹².

En este mismo paciente, encontramos otra variante en otro gen, que aunque solo un software la catalogaba como deletérea, nos pareció interesante, ya que la variante estaba localizada en el gen *CACNA1A* (*Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 A*) que codifica un canal de calcio dependiente de voltaje. Este canal está

implicado en procesos dependientes de calcio, como la contracción muscular o la liberación de hormonas o neurotransmisores²¹⁶. La entrada del calcio en la célula β es necesaria para el proceso de liberación de la insulina, por lo que este gen podría participar en dicho proceso.

En el caso DM1119, no detectamos ninguna alteración que cumpliera los criterios de selección. Sin embargo, detectamos una alteración que aunque los softwares la catalogaban como benigna, estaba localizada en un gen importante para el desarrollo del páncreas: *NOTCH1 (Translocation-Associated Notch Protein TAN-1)*. Este gen codifica una proteína de gran relevancia en el control de la diferenciación celular durante el desarrollo del tejido pancreático exocrino y endocrino²¹⁷. Además de estar involucrado en la embriogénesis pancreática, su actividad juega un papel clave en el mantenimiento y la regulación de la expresión de varios genes en la célula β adulta. Estudios funcionales realizados en células β primarias muestran que el bloqueo de la ruta en la que participa *NOTCH1* induce apoptosis, un proceso que ha sido relacionado con la disfunción de la célula β en diabetes²¹⁸.

En el caso DM1603, la búsqueda de anotaciones relacionadas con procesos importantes para la función basal de la célula β o para el metabolismo de la glucosa nos llevó a seleccionar una variante candidato en el gen *KCNG2 (Potassium Voltage-Gated Channel Modifier Subfamily G Member 2)*. El gen *KCNG2* codifica un canal de voltaje de potasio, implicado en diversas funciones tales como la regulación de la liberación de

neurotransmisores, secreción de insulina, transporte epitelial de electrolitos, etc. Realizando una búsqueda bibliográfica más extensa, únicamente hayamos que este tipo de canal es específico del músculo cardíaco ²¹⁹, hecho que confirmamos realizando una búsqueda en *Protein atlas*, donde observamos que este canal se expresa mayoritariamente en tejido cardíaco, y apenas en tejido pancreático.

En el caso DM1985, la búsqueda bibliográfica permitió reducir el listado de 21 candidatos a un único candidato: una variante en el gen *STAT3* (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*). Según estudios recientes, mutaciones activantes en el gen *STAT3*, y en concreto en el dominio de unión al DNA de dicha proteína (lugar donde se localiza la variante que identificamos) se asociaban con un cuadro autoinmune multisistémico de comienzo precoz ¹²¹, que en algunos casos incluye también la diabetes de comienzo precoz. La alteración identificada en *STAT3* cuadraba con la clínica del caso, ya que la paciente presentaba además de diabetes, hipotiroidismo autoinmune, alteraciones intestinales de carácter autoinmune y retraso ponderoestatural ^{121,175,180}. Además, la conservación evolutiva alta que mostraban los software sugiere que el residuo puede tener un papel clave en la función de la proteína y que la modificación de este puede alterarla.

En el caso DM1997, seleccionamos como variante candidato una alteración localizada en el gen *PTPRN2*. Este gen codifica una proteína transmembrana integral localizada en vesículas de núcleo denso (*DCV, Dense Core Vesicles*). Estas vesículas son características de las células neuroendocrinas (islotos pancreáticos, células

adrenales, neuronas, etc.), entre las que se encuentran las células beta, alfa y lambda ^{221,222}. Pertenece a la familia de las proteínas tirosina fosfatasas (PTP) y tiene cierta actividad fosfatidil inositol fosfatasa ²²³. Es decir, tendría la capacidad de hidrolizar un grupo fosfato al inositol-1,4,5-trifosfato. Este lípido es crucial en la cascada de la secreción de insulina, ya que se une a los receptores proteicos localizados en el retículo endoplasmático permitiendo la liberación de Ca^{2+} almacenado. Este aumento de Ca^{2+} contribuye al ya surgido por la entrada del Ca a través de los canales de voltaje, y provoca la activación de sinaptotagmina, que ayuda a la liberación de la insulina previamente almacenada en las vesículas secretoras. Por tanto, podría participar en la regulación de la ruta de la secreción de insulina.

Estudios en modelos animales de diabetes autoinmune (ratas *NOD*, *non obese diabetic mice*) muestran que la delección de *PTPRN2* causa intolerancia a la glucosa y secreción alterada de insulina ²²⁴. Además, esta proteína es conocida ya por ser un autoantígeno de la diabetes mellitus insulino dependiente ²²⁵.

Por último, en el caso de los individuos DM2180 y DM2566, aun habiendo obtenido 21 y 23 variantes candidato respectivamente, ninguna cumplía los criterios de selección. Ni las anotaciones funcionales mediante el software *David Functional Annotation* ni la búsqueda bibliográfica en PUBMED nos ayudó a seleccionar ninguna de las variantes, ya que ninguno de los genes en los que se localizaban estaban descritos asociados a funciones en procesos importantes para la función de la célula β .

4. Beneficios del análisis de exoma completo en el diagnóstico genético de la diabetes neonatal

El diagnóstico genético de la diabetes neonatal es importante ya que puede tener un impacto directo en el tratamiento y seguimiento de la enfermedad, así como en el consejo genético. El desarrollo de herramientas de secuenciación de última generación como la secuenciación completa del exoma ha supuesto un avance importante para el diagnóstico genético de la diabetes neonatal. Por un lado, esta técnica permite analizar de manera simultánea todos los genes clásicamente asociados con la enfermedad, disminuyendo el tiempo necesario para obtener un resultado y reduciendo costes. Aunque actualmente la técnica más utilizada para el diagnóstico genético de la DMN es la secuenciación mediante el método Sanger, teniendo en cuenta el gasto por base secuenciada, esta técnica conlleva un mayor gasto que la secuenciación del exoma mediante NGS.

Por otro lado, el estudio de exoma completo permite también analizar las regiones codificantes de todo el genoma ampliando la posibilidad de identificar alteraciones patogénicas fuera de los genes clásicamente asociados (identificación de nuevos genes). A día de hoy, el desarrollo de esta tecnología ya ha permitido identificar nuevos genes causativos de diferentes patologías ²²⁶⁻²²⁹. En el caso de la diabetes neonatal, el uso de esta tecnología ha permitido la identificación de dos nuevos genes, *GATA6* y *STAT3*, y un nuevo elemento regulador en el gen *PTF1A*, cuyas mutaciones causan agenesia pancreática ²³⁰.

En resumen, en el diagnóstico de enfermedades monogénicas genéticamente heterogéneas, el análisis de exoma completo es un método más eficaz tanto en relación a los costes como en relación al tiempo de ejecución.

En los últimos años la mejora de las técnicas de secuenciación de nueva generación se está desarrollando a un ritmo frenético y es muy posible que en un corto plazo de tiempo existan protocolos clínicos que incorporen esta tecnología en el diagnóstico genético rutinario de la diabetes neonatal. De hecho, en base a nuestros resultados y a los resultados de otros grupos que han realizado estudios de exoma completo en pacientes con diabetes neonatal sin causa genética identificada, sería conveniente realizar un análisis de exoma completo para identificar posibles mutaciones patogénicas en otros genes.

En nuestra cohorte de 8 pacientes se han identificado 5 mutaciones potencialmente responsables de la diabetes neonatal que padecen (62%). De las mutaciones identificadas hemos realizado la caracterización funcional de una de ellas que está localizada en el gen *STAT3* y hemos demostrado que tiene un impacto deletéreo en la función de la célula b pancreática y que por lo tanto puede ser la responsable de la clínica de la paciente que la porta. Aunque el resto de mutaciones identificadas han sido etiquetadas como patogénicas en los análisis de predicción *in silico*, es necesario realizar estudios funcionales para esclarecer su verdadero impacto en la patogénesis de la enfermedad.

5. Caracterización funcional del factor de transcripción STAT3

Como ya se ha mencionado previamente, el proceso de selección de variantes potencialmente patogénicas nos condujo a seleccionar una variante candidata en el gen *STAT3* en la familia 05 (P330S). La clínica del paciente coincidía con la clínica de pacientes con alteraciones en ese factor de transcripción, por lo que se decidió realizar la caracterización funcional de dicha variante.

Como muchos otros factores de transcripción, el STAT3 es activado por la fosforilación, que da paso a su dimerización y translocación al núcleo para ejercer su acción en la expresión de diversos genes ¹⁸⁶. La mutación que identificamos en STAT3 conduce a un cambio de un aminoácido no fosforilable (prolina) a un aminoácido fosforilable (serina), creando un potencial sitio de fosforilación que podría afectar al estado de fosforilación total de la proteína y por tanto a la activación de STAT3 ¹⁸⁷. Sin embargo, observamos que el cambio del residuo prolina por serina no afectaba a la fosforilación del factor de transcripción ni en condiciones basales ni después de una estimulación con IL-6 (citocina que activa STAT3 en diversos tipos celulares ^{231,232}).

Mediante un ensayo de luciferasa demostramos que la mutación detectada aumentaba la actividad de STAT3. Es decir, que la mutación P330S inducía una hiperactivación constitutiva del factor de transcripción, que independientemente de su estado de fosforilación, provocaba un aumento en su capacidad de unión al ADN.

Nuestros resultados están en consonancia con estudios previos en los que se ha demostrado que las mutaciones con cambio de sentido o *missense* en el dominio de unión al ADN de STAT3 aumentan significativamente la actividad de STAT3 ¹²¹. Otras mutaciones localizadas en el dominio SH2 o en el dominio de transactivación de STAT3 también provocan un aumento de la actividad de STAT3, aunque este efecto es menos drástico ¹²¹.

Por el contrario, se ha descrito que mutaciones identificadas en la misma región de la proteína provocan una disminución en su capacidad de unión al ADN en pacientes con el síndrome de Hiper IgE ²³³. Este síndrome se caracteriza por la aparición de dermatitis eczematoide, infecciones dérmicas y pulmonares recurrentes y presencia de altos niveles de IgE ²³². Al contrario que las mutaciones activantes, las mutaciones inactivantes causan en estos pacientes una respuesta disminuida de las células T en cuanto al reconocimiento de antígenos ²³⁴. Podríamos decir que mutaciones opuestas causan un cuadro clínico opuesto: las activantes causan un cuadro autoinmune, mientras que las inactivantes causan un cuadro con deficiencias en el sistema inmune.

Estudios *in silico* de la estructura proteica de STAT3 han propuesto que las mutaciones localizadas en el dominio SH2 de la proteína provocan una mayor afinidad de unión al ADN debido al aumento de la interacción electrostática con el ADN ¹²¹. Sin embargo, todavía no se ha descrito el mecanismo exacto por el cual las mutaciones activantes en el dominio de unión al ADN de STAT3 conducen a un aumento de su actividad.

Teniendo en cuenta que STAT3 juega un papel crucial en ciertas funciones basales de las células beta, como la regulación de la secreción de insulina ^{184,185}, tras su análisis funcional en modelos *in vitro* de célula β , confirmamos que este factor de transcripción inhibía la expresión del factor de transcripción Isl-1, implicado a su vez en la regulación de la expresión de la insulina. De la misma manera, observamos que la inhibición de la expresión de Isl-1 provocada por la mutación en STAT3 resultaba en una disminución en la expresión de la insulina y en una disminución drástica en la secreción de insulina estimulada por glucosa.

En resumen, este estudio demostró que la mutación P330S en el gen *STAT3* conducía a una disminución de la síntesis de insulina en las células β pancreáticas y que podría ser la responsable directa del desarrollo de la diabetes neonatal en la paciente portadora de la mutación.

Aunque el presente estudio funcional se ha centrado en la caracterización del impacto de la mutación en la función basal de las células β pancreáticas, , no podemos excluir que la hiperactivación de STAT3 pueda tener otros efectos deletéreos a nivel de célula β (por ejemplo, en su viabilidad, en su capacidad de replicación, etc..). De hecho, la activación constitutiva de STAT3 se ha vinculado con la desregulación de los genes del control del ciclo celular y con la activación de procesos pro-apoptóticos ²³⁵. Además, a nivel pancreático, se ha descrito que STAT3 modula el ciclo celular de las células β y las protege de daños en el ADN ²³⁶. En ratones en los que STAT3 ha sido deletado de manera específica en las células β pancreáticas se ha observado que estos ratones

tienen defectos severos en la secreción de insulina y muestran alteraciones en la arquitectura de los islotes pancreáticos ²³⁷.

Aunque se ha demostrado previamente que las mutaciones de ganancia de función en el gen *STAT3* conducen a una autoinmunidad de inicio precoz al afectar a la regulación de las células relacionadas con el sistema inmune ^{121,175,220,238}, estos resultados demuestran que las mutaciones activadoras en *STAT3* afectan a la secreción de insulina. Estos resultados sugieren que las mutaciones activantes en el gen *STAT3* pueden provocar el desarrollo de la NDM como resultado de dos mecanismos contrapuestos, por un lado, a través de la desregulación de las células del sistema inmune, y por otro, mediante la disfunción de las funciones basales de las células beta pancreáticas.

CONCLUSIONES

1. Mediante el estudio de los genes clásicamente asociados a diabetes neonatal se resuelven alrededor del 70% de los casos de diabetes neonatal, por lo que el análisis estructural de estos genes debe considerarse siempre que exista sospecha de diabetes neonatal.
2. Además del análisis estructural de las regiones codificantes de los genes asociados a diabetes monogénica, para optimizar el diagnóstico genético de la diabetes neonatal se deberían analizar las regiones intrónicas y regiones UTR de dichos genes, ya que alteraciones en esas regiones están asociadas con el desarrollo de la patología.
3. La edad al diagnóstico, el peso al nacimiento y el tipo de diabetes neonatal (permanente o transitoria) son características clínicas que se deben tener en cuenta para orientar el estudio genético y priorizar el análisis de unos genes sobre otros..
4. Teniendo en cuenta que un correcto diagnóstico genético de la diabetes neonatal puede suponer una mejora en el tratamiento, es importante optimizar los métodos de diagnóstico. Así, los análisis de exoma completo son una herramienta útil para aumentar la eficacia del diagnóstico genético de la diabetes neonatal.
5. Para confirmar la patogenicidad de las mutaciones identificadas mediante análisis del exoma completo, es necesario realizar estudios funcionales. En este sentido, los resultados de este trabajo demuestran que la mutación activante identificada en el factor de transcripción STAT3 inhibe la síntesis y secreción de insulina y por tanto, puede ser la responsable etiológica del desarrollo de la DN en la paciente portadora de la misma.

REFERENCIAS

1. Adam, J. M. F. & Tarigan, N. P. Comparison of The World Health Organization (WHO) two-step strategy and OGTT for diabetes mellitus screening. *Acta Med. Indones.* 36, 3–7
2. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. American Diabetes Association: clinical practice recommendations 2002. *Diabetes Care* 25 Suppl 1, S1-147 (2002).
3. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 37, S81–S90 (2014).
4. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 40, S11–S24 (2017).
5. Todd, J. A., Bell, J. I. & McDevitt, H. O. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 329, 599–604 (1987).
6. Kelly, M. A., Mijovic, C. H. & Barnett, A. H. Genetics of type 1 diabetes. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 15, 279–291 (2001).
7. MacFarlane, A. J., Strom, A. & Scott, F. W. Epigenetics: deciphering how environmental factors may modify autoimmune type 1 diabetes. *Mamm. Genome* 20, 624–32 (2009).
8. Naylor, R. N., Greeley, S. A. W., Bell, G. I. & Philipson, L. H. Genetics and pathophysiology of neonatal diabetes mellitus. *J. Diabetes Investig.* 2, 158–69 (2011).
9. Greeley, S. A. W., Naylor, R. N., Philipson, L. H. & Bell, G. I. Neonatal diabetes: an expanding list of genes allows for improved diagnosis and treatment. *Curr. Diab. Rep.* 11, 519–32 (2011).
10. Rubio-Cabezas, O. & Argente, J. Current insights into the genetic basis of diabetes mellitus in children and adolescents. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 21, 917–40 (2008).

11. Alkorta-Aranburu, G. *et al.* Phenotypic heterogeneity in monogenic diabetes: The clinical and diagnostic utility of a gene panel-based next-generation sequencing approach. *Mol. Genet. Metab.* 113, 315–320 (2014).
12. Weiss, R. E. & Refetoff, S. *Genetic diagnosis of endocrine disorders.* (Academic Press/Elsevier, 2010).
13. Murphy, R., Ellard, S. & Hattersley, A. T. Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 4, 200–13 (2008).
14. Porter, J. R. & Barrett, T. G. Monogenic syndromes of abnormal glucose homeostasis: clinical review and relevance to the understanding of the pathology of insulin resistance and beta cell failure. *J. Med. Genet.* 42, 893–902 (2005).
15. Bowman, P. *et al.* Heterozygous ABCC8 mutations are a cause of MODY. *Diabetologia* 55, 123–127 (2012).
16. Shields, B. M. *et al.* Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing? *Diabetologia* 53, 2504–8 (2010).
17. Slingerland, A. S. & Hattersley, A. T. Mutations in the Kir6.2 subunit of the KATP channel and permanent neonatal diabetes: new insights and new treatment. *Ann. Med.* 37, 186–95 (2005).
18. Lambert, A. P. *et al.* Identifying hepatic nuclear factor 1alpha mutations in children and young adults with a clinical diagnosis of type 1 diabetes. *Diabetes Care* 26, 333–7 (2003).
19. Møller, A. M. *et al.* Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in Caucasian families originally classified as having Type I diabetes. *Diabetologia* 41, 1528–31 (1998).
20. Kleinberger, J. W. & Pollin, T. I. Personalized medicine in diabetes mellitus: current opportunities and future prospects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1346, 45–56 (2015).

21. Gloyn, A. L. *et al.* Activating Mutations in the Gene Encoding the ATP-Sensitive Potassium-Channel Subunit Kir6.2 and Permanent Neonatal Diabetes. *N. Engl. J. Med.* 350, 1838–1849 (2004).
22. 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).
23. Babenko, A. P. *et al.* Activating Mutations in the *ABCC8* Gene in Neonatal Diabetes Mellitus. *N. Engl. J. Med.* 355, 456–466 (2006).
24. Støy, J. *et al.* Diagnosis and treatment of neonatal diabetes: an United States experience†. *Pediatr. Diabetes* 9, 450–459 (2008).
25. Hattersley, A., Bruining, J., Shield, J., Njolstad, P. & Donaghue, K. C. The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents. *Pediatr. Diabetes* 10, 33–42 (2009).
26. Rafiq, M. *et al.* Effective Treatment With Oral Sulfonylureas in Patients With Diabetes Due to Sulfonylurea Receptor 1 (SUR1) Mutations. *Diabetes Care* 31, 204–209 (2008).
27. Stanik, J. *et al.* Prevalence of permanent neonatal diabetes in Slovakia and successful replacement of insulin with sulfonylurea therapy in KCNJ11 and *ABCC8* mutation carriers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 1276–82 (2007).
28. Slingerland, A. S. *et al.* Sulphonylurea therapy improves cognition in a patient with the V59M KCNJ11 mutation. *Diabet. Med.* 25, 277–281 (2008).
29. Pearson, E. R. *et al.* Genetic cause of hyperglycaemia and response to treatment in diabetes. *Lancet* 362, 1275–1281 (2003).
30. Pearson, E. R. *et al.* Molecular genetics and phenotypic characteristics of MODY caused by hepatocyte nuclear factor 4alpha mutations in a large European collection. *Diabetologia* 48, 878–85 (2005).
31. Stride, A. *et al.* The genetic abnormality in the beta cell determines the response to

- an oral glucose load. *Diabetologia* 45, 427–35 (2002).
32. Stride, A. *et al.* Cross-sectional and longitudinal studies suggest pharmacological treatment used in patients with glucokinase mutations does not alter glycaemia. *Diabetologia* 57, 54–6 (2014).
 33. Edghill, E. L., Flanagan, S. E. & Ellard, S. Permanent neonatal diabetes due to activating mutations in ABCC8 and KCNJ11. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 11, 193–198 (2010).
 34. Vaxillaire, M. & Froguel, P. Monogenic forms of diabetes mellitus: an update. *Endocrinol. Nutr.* 56 Suppl 4, 26–9 (2009).
 35. Ellard, S., Patrinos, G. P. & Oetting, W. S. Clinical Applications of Next-Generation Sequencing: The 2013 Human Genome Variation Society Scientific Meeting. *Hum. Mutat.* 34, 1583–1587 (2013).
 36. Philippe, J. *et al.* What Is the Best NGS Enrichment Method for the Molecular Diagnosis of Monogenic Diabetes and Obesity? *PLoS One* 10, e0143373 (2015).
 37. Ellard, S. *et al.* Improved genetic testing for monogenic diabetes using targeted next-generation sequencing. *Diabetologia* 56, 1958–1963 (2013).
 38. Fajans, S. S., Bell, G. I. & Polonsky, K. S. Molecular Mechanisms and Clinical Pathophysiology of Maturity-Onset Diabetes of the Young. *N. Engl. J. Med.* 345, 971–980 (2001).
 39. Bonnefond, A. A. *et al.* Molecular diagnosis of neonatal diabetes mellitus using next-generation sequencing of the whole exome. *PLoS One* 5, e13630 (2010).
 40. Siddiqui, K., Musambil, M. & Nazir, N. Maturity onset diabetes of the young (MODY)—History, first case reports and recent advances. *Gene* 555, 66–71 (2015).
 41. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 35 Suppl 1, S64-71 (2012).
 42. Nyunt, O. *et al.* Investigating maturity onset diabetes of the young. *Clin. Biochem.*

Rev. 30, 67–74 (2009).

43. Lowe, H. Diabetes mellitus: implications, costs and issues. *West Indian Med. J.* 50 Suppl 1, 13–4
44. Shield, J. P. Neonatal diabetes: new insights into aetiology and implications. *Horm. Res.* 53 Suppl 1, 7–11 (2000).
45. Shield, J. P. H. Neonatal diabetes: how research unravelling the genetic puzzle has both widened our understanding of pancreatic development whilst improving children's quality of life. *Horm. Res.* 67, 77–83 (2007).
46. Polak, M. & Cavé, H. Neonatal diabetes mellitus: a disease linked to multiple mechanisms. *Orphanet J. Rare Dis.* 2, 12 (2007).
47. Polak, M. Neonatal Diabetes Mellitus: Insights for More Common Forms of Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 3774–3776 (2007).
48. Castaño, L. & Pérez De Nanclares, G. Diabetes monogénica neonatal y en la edad pediátrica Monogenic diabetes during the neonatal period and in the pediatric patient. *Av Diabetol* 23, 341–349 (2007).
49. Mackay, D. J. G. & Temple, I. K. Transient neonatal diabetes mellitus type 1. *Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.* 154C, 335–342 (2010).
50. Rica, I. *et al.* The majority of cases of neonatal diabetes in Spain can be explained by known genetic abnormalities. *Diabet. Med.* 24, 707–13 (2007).
51. von Mühlendahl, K. E. & Herkenhoff, H. Long-Term Course of Neonatal Diabetes. *N. Engl. J. Med.* 333, 704–708 (1995).
52. Temple, I. K. *et al.* An imprinted gene(s) for diabetes? *Nat. Genet.* 9, 110–112 (1995).
53. Schimmel, U. Long-standing sulfonylurea therapy after pubertal relapse of neonatal diabetes in a case of uniparental paternal isodisomy of chromosome 6. *Diabetes Care* 32, e9 (2009).

54. Flanagan, S. E. *et al.* Mutations in ATP-Sensitive K⁺ Channel Genes Cause Transient Neonatal Diabetes and Permanent Diabetes in Childhood or Adulthood. *Diabetes* 56, 1930–1937 (2007).
55. Metz, C. *et al.* Neonatal diabetes mellitus: Chromosomal analysis in transient and permanent cases. *J. Pediatr.* 141, 483–489 (2002).
56. Temple, I. K. *et al.* Transient neonatal diabetes: widening the understanding of the etiopathogenesis of diabetes. *Diabetes* 49, 1359–66 (2000).
57. Gardner, R. J. *et al.* Localisation of a gene for transient neonatal diabetes mellitus to an 18.72 cR 3000 (~5.4 Mb) interval on chromosome 6q. *J Med Genet* 36, 192–196 (1999).
58. Mackay, D. J. G. *et al.* Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in ZFP57. *Nat. Genet.* 40, 949–51 (2008).
59. Kamiya, M. *et al.* The cell cycle control gene ZAC/PLAGL1 is imprinted--a strong candidate gene for transient neonatal diabetes. *Hum. Mol. Genet.* 9, 453–60 (2000).
60. Temple, I. K. & Shield, J. P. H. Transient neonatal diabetes, a disorder of imprinting. *J. Med. Genet.* 39, 872–5 (2002).
61. Arima, T. *et al.* A conserved imprinting control region at the HYMAI/ZAC domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1475–1483 (2001).
62. Du, X., Ounissi-Benkalha, H., Loder, M. K., Rutter, G. A. & Polychronakos, C. Overexpression of ZAC impairs glucose-stimulated insulin translation and secretion in clonal pancreatic beta-cells. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 28, 645–53 (2012).
63. Abdollahi, A. LOT1 (ZAC1/PLAGL1) and its family members: mechanisms and functions. *J. Cell. Physiol.* 210, 16–25 (2007).
64. Yamamoto, K. *et al.* Overexpression of PACAP in transgenic mouse pancreatic

beta-cells enhances insulin secretion and ameliorates streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* 52, 1155–62 (2003).

65. Ma, D. *et al.* Impaired glucose homeostasis in transgenic mice expressing the human transient neonatal diabetes mellitus locus, TNDM. *J. Clin. Invest.* 114, 339–48 (2004).
66. Shield, J. P. H. *et al.* An assessment of pancreatic endocrine function and insulin sensitivity in patients with transient neonatal diabetes in remission. *Arch. Dis. Child. - Fetal Neonatal Ed.* 89, F341–F343 (2004).
67. Patch, A. M., Flanagan, S. E., Boustred, C., Hattersley, A. T. & Ellard, S. Mutations in the ABCC8 gene encoding the SUR1 subunit of the K_{ATP} channel cause transient neonatal diabetes, permanent neonatal diabetes or permanent diabetes diagnosed outside the neonatal period. *Diabetes, Obes. Metab.* 9, 28–39 (2007).
68. Vaxillaire, M. *et al.* New ABCC8 mutations in relapsing neonatal diabetes and clinical features. *Diabetes* 56, 1737–41 (2007).
69. Klupa, T. *et al.* Mutations in the ABCC8 (SUR1 subunit of the K(ATP) channel) gene are associated with a variable clinical phenotype. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 71, 358–62 (2009).
70. Pörksen, S. *et al.* Disease progression and search for monogenic diabetes among children with new onset type 1 diabetes negative for ICA, GAD- and IA-2 Antibodies. *BMC Endocr. Disord.* 10, 16 (2010).
71. Gonsorcikova, L. *et al.* Familial mild hyperglycemia associated with a novel ABCC8-V84I mutation within three generations. *Pediatr. Diabetes* 12, 266–9 (2011).
72. Edghill, E. L. *et al.* Hepatocyte nuclear factor-1 beta mutations cause neonatal diabetes and intrauterine growth retardation: support for a critical role of HNF-1beta in human pancreatic development. *Diabet. Med.* 23, 1301–6 (2006).
73. Yorifuji, T. *et al.* Neonatal diabetes mellitus and neonatal polycystic, dysplastic kidneys: Phenotypically discordant recurrence of a mutation in the hepatocyte

nuclear factor-1beta gene due to germline mosaicism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2905–8 (2004).

74. D'Amato, E. & Lorini, R. Letter re: Neonatal Diabetes Mellitus and Mutation in the HNF-1 β Gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 5906–5907 (2005).
75. Garin, I. *et al.* Recessive mutations in the INS gene result in neonatal diabetes through reduced insulin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 3105–10 (2010).
76. Ellard, S. *et al.* Permanent Neonatal Diabetes Caused by Dominant, Recessive, or Compound Heterozygous SUR1 Mutations with Opposite Functional Effects. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 375–382 (2007).
77. Inagaki, N. *et al.* Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270, 1166–70 (1995).
78. Shyng, S. & Nichols, C. G. Octameric stoichiometry of the KATP channel complex. *J. Gen. Physiol.* 110, 655–64 (1997).
79. Mikhailov, M. V *et al.* 3-D structural and functional characterization of the purified KATP channel complex Kir6.2-SUR1. *EMBO J.* 24, 4166–75 (2005).
80. Ashcroft, F. M. ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. *J. Clin. Invest.* 115, 2047–2058 (2005).
81. Ashcroft, F. M., Harrison, D. E. & Ashcroft, S. J. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* 312, 446–8
82. Ashcroft, F. M. & Gribble, F. M. ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* 42, 903–919 (1999).
83. Rorsman, P. The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia* 40, 487–95 (1997).
84. Nichols, C. G. KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* 440, 470–476 (2006).

85. Light, P. & Light, P. E. The molecular mechanisms and pharmacotherapy of ATP-sensitive potassium channel gene mutations underlying neonatal diabetes. *Pharmacogenomics. Pers. Med.* 3, 145 (2010).
86. Ashcroft, F. M. The Walter B. Cannon Physiology in Perspective Lecture, 2007. ATP-sensitive K⁺ channels and disease: from molecule to malady. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, E880-9 (2007).
87. Gloyn, A. L., Siddiqui, J. & Ellard, S. Mutations in the genes encoding the pancreatic beta-cell K_{ATP} channel subunits Kir6.2 (*KCNJ11*) and SUR1 (*ABCC8*) in diabetes mellitus and hyperinsulinism. *Hum. Mutat.* 27, 220–231 (2006).
88. Gloyn, A. L. *et al.* KCNJ11 activating mutations are associated with developmental delay, epilepsy and neonatal diabetes syndrome and other neurological features. *Eur. J. Hum. Genet.* 14, 824–30 (2006).
89. Clark, R. H. *et al.* Muscle dysfunction caused by a KATP channel mutation in neonatal diabetes is neuronal in origin. *Science* 329, 458–61 (2010).
90. Ashcroft, F. M. New Uses for Old Drugs: Neonatal Diabetes and Sulphonylureas. *Cell Metab.* 11, 179–181 (2010).
91. Hattersley, A. T. & Ashcroft, F. M. Activating mutations in Kir6.2 and neonatal diabetes: new clinical syndromes, new scientific insights, and new therapy. *Diabetes* 54, 2503–13 (2005).
92. Shimomura, K. *et al.* Mutations at the Same Residue (R50) of Kir6.2 (KCNJ11) That Cause Neonatal Diabetes Produce Different Functional Effects. *Diabetes* 55, 1705–1712 (2006).
93. Philla, K. Q., Bauer, A. J., Vogt, K. S. & Greeley, S. A. W. Successful transition from insulin to sulfonylurea therapy in a patient with monogenic neonatal diabetes owing to a KCNJ11 F333L [corrected] mutation. *Diabetes Care* 36, e201 (2013).
94. Stoy, J. *et al.* Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 15040–15044 (2007).

95. 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).
96. 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).
97. Molven, A. *et al.* Mutations in the Insulin Gene Can Cause MODY and Autoantibody-Negative Type 1 Diabetes. *Diabetes* 57, 1131–1135 (2008).
98. Meur, G. *et al.* Insulin gene mutations resulting in early-onset diabetes: marked differences in clinical presentation, metabolic status, and pathogenic effect through endoplasmic reticulum retention. *Diabetes* 59, 653–61 (2010).
99. Schuit, F. C., Huypens, P., Heimberg, H. & Pipeleers, D. G. Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes* 50, 1–11 (2001).
100. Rajan, S. *et al.* In vitro processing and secretion of mutant insulin proteins that cause permanent neonatal diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E403–10 (2010).
101. Hodish, I. *et al.* Misfolded proinsulin affects bystander proinsulin in neonatal diabetes. *J. Biol. Chem.* 285, 685–94 (2010).
102. Park, S.-Y., Ye, H., Steiner, D. F. & Bell, G. I. Mutant proinsulin proteins associated with neonatal diabetes are retained in the endoplasmic reticulum and not efficiently secreted. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 1449–54 (2010).
103. Liu, M. *et al.* Mutant INS-gene induced diabetes of youth: proinsulin cysteine residues impose dominant-negative inhibition on wild-type proinsulin transport. *PLoS One* 5, e13333 (2010).

104. Hodish, I. *et al.* In vivo misfolding of proinsulin below the threshold of frank diabetes. *Diabetes* 60, 2092–101 (2011).
105. 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).
106. Støy, J. *et al.* Clinical and molecular genetics of neonatal diabetes due to mutations in the insulin gene. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 11, 205–215 (2010).
107. Raile, K. *et al.* Diabetes caused by insulin gene (INS) deletion: clinical characteristics of homozygous and heterozygous individuals. *Eur. J. Endocrinol.* 165, 255–60 (2011).
108. Fendler, W. *et al.* Paternally inherited proinsulin mutations may result in earlier onset of monogenic diabetes mutation identity effect in monogenic diabetes. *Diabetes Care* 34, e9 (2011).
109. Matschinsky, F. M. Glucokinase, glucose homeostasis, and diabetes mellitus. *Curr. Diab. Rep.* 5, 171–6 (2005).
110. Njølstad, P. R. *et al.* Permanent neonatal diabetes caused by glucokinase deficiency: inborn error of the glucose-insulin signaling pathway. *Diabetes* 52, 2854–60 (2003).
111. Njølstad, P. R. *et al.* Neonatal Diabetes Mellitus Due to Complete Glucokinase Deficiency. *N. Engl. J. Med.* 344, 1588–1592 (2001).
112. Velho, G. & Froguel, P. Genetic, metabolic and clinical characteristics of maturity onset diabetes of the young. *Eur. J. Endocrinol.* 138, 233–9 (1998).
113. Gloyn, A. L. *et al.* Complete glucokinase deficiency is not a common cause of permanent neonatal diabetes. *Diabetologia* 45, 290 (2002).
114. Turkkahraman, D. *et al.* Permanent neonatal diabetes mellitus caused by a novel homozygous (T168A) glucokinase (GCK) mutation: initial response to oral sulphonylurea therapy. *J. Pediatr.* 153, 122–6 (2008).

115. Pal, M. Medicinal chemistry approaches for glucokinase activation to treat type 2 diabetes. *Curr. Med. Chem.* 16, 3858–74 (2009).
116. Haynes, N.-E. *et al.* Discovery, structure-activity relationships, pharmacokinetics, and efficacy of glucokinase activator (2R)-3-cyclopentyl-2-(4-methanesulfonylphenyl)-N-thiazol-2-yl-propionamide (RO0281675). *J. Med. Chem.* 53, 3618–25 (2010).
117. Ohyama, S. *et al.* A small-molecule glucokinase activator lowers blood glucose in the sulfonylurea-desensitized rat. *Eur. J. Pharmacol.* 640, 250–6 (2010).
118. Farmer, A. *et al.* EURO-WABB: an EU rare diseases registry for Wolfram syndrome, Alström syndrome and Bardet-Biedl syndrome. *BMC Pediatr.* 13, 130 (2013).
119. Faiyaz-UI-Haque, M. *et al.* Novel and recurrent mutations in the *AIRE* gene of autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1 (APS1) patients. *Clin. Genet.* 76, 431–440 (2009).
120. Bacchetta, R., Barzaghi, F. & Roncarolo, M.-G. From IPEX syndrome to *FOXP3* mutation: a lesson on immune dysregulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* n/a-n/a (2016). doi:10.1111/nyas.13011
121. Flanagan, S. E. *et al.* Activating germline mutations in *STAT3* cause early-onset multi-organ autoimmune disease. *Nat. Genet.* 46, 812–4 (2014).
122. Rubio-Cabezas, O. *et al.* Homozygous mutations in *NEUROD1* are responsible for a novel syndrome of permanent neonatal diabetes and neurological abnormalities. *Diabetes* 59, 2326–31 (2010).
123. Bernardo, A. S., Hay, C. W. & Docherty, K. Pancreatic transcription factors and their role in the birth, life and survival of the pancreatic β cell. *Mol. Cell. Endocrinol.* 294, 1–9 (2008).
124. Sellick, G. S. *et al.* Mutations in *PTF1A* cause pancreatic and cerebellar agenesis. *Nat. Genet.* 36, 1301–1305 (2004).

125. Melloul, D., Tsur, A. & Zangen, D. Pancreatic Duodenal Homeobox (PDX-1) in health and disease. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 15, 1461–72 (2002).
126. Stoffers, D. A., Zinkin, N. T., Stanojevic, V., Clarke, W. L. & Habener, J. F. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat. Genet.* 15, 106–10 (1997).
127. Stoffers, D. A., Ferrer, J., Clarke, W. L. & Habener, J. F. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat. Genet.* 17, 138–9 (1997).
128. Wright, N. M., Metzger, D. L., Borowitz, S. M. & Clarke, W. L. Permanent neonatal diabetes mellitus and pancreatic exocrine insufficiency resulting from congenital pancreatic agenesis. *Am. J. Dis. Child.* 147, 607–9 (1993).
129. Mitchell, J. *et al.* Neonatal diabetes, with hypoplastic pancreas, intestinal atresia and gall bladder hypoplasia: search for the aetiology of a new autosomal recessive syndrome. *Diabetologia* 47, 2160–7 (2004).
130. Chappell, L. *et al.* A further example of a distinctive autosomal recessive syndrome comprising neonatal diabetes mellitus, intestinal atresias and gall bladder agenesis. *Am. J. Med. Genet. A* 146A, 1713–7 (2008).
131. Martinovici, D. *et al.* Neonatal hemochromatosis and Martinez-Frias syndrome of intestinal atresia and diabetes mellitus in a consanguineous newborn. *Eur. J. Med. Genet.* 53, 25–8 (2010).
132. Smith, S. B. *et al.* Rfx6 directs islet formation and insulin production in mice and humans. *Nature* 463, 775–80 (2010).
133. Senée, V. *et al.* Mutations in GLIS3 are responsible for a rare syndrome with neonatal diabetes mellitus and congenital hypothyroidism. *Nat. Genet.* 38, 682–7 (2006).
134. Watanabe, N. *et al.* A murine model of neonatal diabetes mellitus in Glis3-deficient mice. *FEBS Lett.* 583, 2108–2113 (2009).

135. Rubio-Cabezas, O. *et al.* Permanent Neonatal Diabetes and Enteric Anendocrinosis Associated With Biallelic Mutations in NEUROG3. *Diabetes* 60, 1349–53 (2011).
136. Pinney, S. E. *et al.* Neonatal diabetes and congenital malabsorptive diarrhea attributable to a novel mutation in the human neurogenin-3 gene coding sequence. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 1960–5 (2011).
137. Haldorsen, I. S. *et al.* Lack of pancreatic body and tail in HNF1B mutation carriers. *Diabet. Med.* 25, 782–7 (2008).
138. Poulton, C. J. *et al.* Microcephaly with simplified gyration, epilepsy, and infantile diabetes linked to inappropriate apoptosis of neural progenitors. *Am. J. Hum. Genet.* 89, 265–76 (2011).
139. Yasuda, T. *et al.* PAX6 mutation as a genetic factor common to aniridia and glucose intolerance. *Diabetes* 51, 224–30 (2002).
140. Solomon, B. D. *et al.* Compound heterozygosity for mutations in PAX6 in a patient with complex brain anomaly, neonatal diabetes mellitus, and microphthalmia. *Am. J. Med. Genet. A* 149A, 2543–6 (2009).
141. St-Onge, L., Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Mansouri, A. & Gruss, P. Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing α -cells in mouse pancreas. *Nature* 387, 406–409 (1997).
142. Murphy, R., Turnbull, D. M., Walker, M. & Hattersley, A. T. Clinical features, diagnosis and management of maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) associated with the 3243A>G mitochondrial point mutation. *Diabet. Med.* 25, 383–399 (2008).
143. Bergmann, A. K. *et al.* Thiamine-responsive megaloblastic anemia: identification of novel compound heterozygotes and mutation update. *J. Pediatr.* 155, 888–892.e1 (2009).
144. Yeşilkaya, E. *et al.* A novel mutation in the SLC19A2 gene in a Turkish female with thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome. *J. Trop. Pediatr.* 55, 265–7

- (2009).
145. Aycan, Z. *et al.* Thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome with atrial standstill: a case report. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 33, 144–7 (2011).
 146. Lagarde, W. H., Underwood, L. E., Moats-Staats, B. M. & Calikoglu, A. S. Novel mutation in the SLC19A2 gene in an African-American female with thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 125A, 299–305 (2004).
 147. Inoue, H. *et al.* A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat. Genet.* 20, 143–8 (1998).
 148. Rigoli, L., Lombardo, F. & Di Bella, C. *Wolfram syndrome and WFS1 gene.* *Clinical Genetics* 79, 103–117 (2011).
 149. Kumar, S. Wolfram syndrome: Important implications for pediatricians and pediatric endocrinologists. *Pediatric Diabetes* 11, 28–37 (2010).
 150. Wolcott, C. D. & Rallison, M. L. Infancy-onset diabetes mellitus and multiple epiphyseal dysplasia. *J. Pediatr.* 80, 292–7 (1972).
 151. Delépine, M. *et al.* EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat. Genet.* 25, 406–9 (2000).
 152. Santer, R. *et al.* The mutation spectrum of the facilitative glucose transporter gene SLC2A2 (GLUT2) in patients with Fanconi-Bickel syndrome. *Hum. Genet.* 110, 21–9 (2002).
 153. Santer, R., Schneppenheim, R., Suter, D., Schaub, J. & Steinmann, B. Fanconi-Bickel syndrome--the original patient and his natural history, historical steps leading to the primary defect, and a review of the literature. *Eur. J. Pediatr.* 157, 783–97 (1998).

154. Santer, R. *et al.* Mutations in GLUT2, the gene for the liver-type glucose transporter, in patients with Fanconi-Bickel syndrome. *Nat. Genet.* 17, 324–6 (1997).
155. Taha, D., Al-Harbi, N. & Al-Sabban, E. Hyperglycemia and hypoinsulinemia in patients with Fanconi-Bickel syndrome. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 21, 581–6 (2008).
156. Longo, N., Langley, S. D., Griffin, L. D. & Elsas, L. J. Mutations in the insulin receptor and their effect on glucose transport. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 105, 204–13 (1992).
157. Longo, N., Langley, S. D., Griffin, L. D. & Elsas, L. J. Reduced mRNA and a nonsense mutation in the insulin-receptor gene produce heritable severe insulin resistance. *Am. J. Hum. Genet.* 50, 998–1007 (1992).
158. Longo, N. *et al.* Impaired growth in Rabson-Mendenhall syndrome: lack of effect of growth hormone and insulin-like growth factor-I. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 799–805 (1994).
159. Greeley, S. A. W. *et al.* The Cost-Effectiveness of Personalized Genetic Medicine: The case of genetic testing in neonatal diabetes. *Diabetes Care* 34, 622–627 (2011).
160. Russo, L. *et al.* Permanent diabetes during the first year of life: multiple gene screening in 54 patients. *Diabetologia* 54, 1693–1701 (2011).
161. Manchester, K. L. Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. *Biotechniques* 19, 208–10 (1995).
162. Mullis, K. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51, 263–273 (1986).
163. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, a R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463–7 (1977).
164. Adinolfi, M., Pertl, B. & Sherlock, J. Rapid detection of aneuploidies by microsatellite

- and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenat. Diagn.* 17, 1299–1311 (1997).
165. Killian, A. *et al.* A Simple Method for the Routine Detection of Somatic Quantitative Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 132, 645–653 (2007).
 166. Adzhubei, I. A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* 7, 248–249 (2010).
 167. Ng, P. C. & Henikoff, S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 31, 3812–4 (2003).
 168. Schwarz, J. M., Rödelsperger, C., Schuelke, M. & Seelow, D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat. Methods* 7, 575–6 (2010).
 169. Reese, M. G. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Comput. Chem.* 26, 51–56 (2001).
 170. Ng, S. B. *et al.* Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 461, (2009).
 171. Bamshad, M. J. *et al.* Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat. Publ. Gr.* 12, (2011).
 172. Feng, Y.-J., Liu, Q.-F., Chen, M.-Y., Liang, D. & Zhang, P. Parallel tagged amplicon sequencing of relatively long PCR products using the Illumina HiSeq platform and transcriptome assembly. *Mol. Ecol. Resour.* 16, 91–102 (2016).
 173. ILLUMINA® SEQUENCING.
 174. D'Antonio, M. *et al.* WEP: a high-performance analysis pipeline for whole-exome data. *BMC Bioinformatics* 14, S11 (2013).
 175. Milner, J. D. *et al.* Early-onset lymphoproliferation and autoimmunity caused by germline STAT3 gain-of-function mutations. *Blood* 125, 591–599 (2015).

176. Ortis, F. *et al.* Cytokine-induced proapoptotic gene expression in insulin-producing cells is related to rapid, sustained, and nonoscillatory nuclear factor-kappaB activation. *Mol. Endocrinol.* 20, 1867–79 (2006).
177. Ravassard, P. *et al.* A genetically engineered human pancreatic β cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *J. Clin. Invest.* 121, 3589–97 (2011).
178. Lin, X., Tirichine, L. & Bowler, C. Protocol: Chromatin immunoprecipitation (ChIP) methodology to investigate histone modifications in two model diatom species. *Plant Methods* 8, 48 (2012).
179. Bin Dhuban, K. & Piccirillo, C. A. The immunological and genetic basis of immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 15, 525–532 (2015).
180. Haapaniemi, E. M. *et al.* and mycobacterial disease in patients with activating mutations in STAT3. 125, 639–649 (2015).
181. Levy, D. E. & Darnell, J. E. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 651–62 (2002).
182. Abroun, S. *et al.* STATs: An Old Story, Yet Mesmerizing. *Cell J.* 17, 395–411 (2015).
183. Caldenhoven, E. *et al.* STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J. Biol. Chem.* 271, 13221–7 (1996).
184. Kostromina, E. *et al.* Glucose intolerance and impaired insulin secretion in pancreas-specific signal transducer and activator of transcription-3 knockout mice are associated with microvascular alterations in the pancreas. *Endocrinology* 151, 2050–9 (2010).
185. Chen, J. *et al.* LIM-homeodomain transcription factor Isl-1 mediates the effect of leptin on insulin secretion in mice. *J. Biol. Chem.* 288, 12395–405 (2013).
186. Darnell, J. E., Kerr, I. M. & Stark, G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional

- activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415–1421 (1994).
187. Decker, T. & Kovarik, P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19, 2628–37 (2000).
 188. Oliver-Krasinski, J. M. & Stoffers, D. A. On the origin of the beta cell. *Genes Dev.* 22, 1998–2021 (2008).
 189. Yan, C. *et al.* Protein Inhibitor of Activated STAT Y (PIASy) Regulates Insulin Secretion by Interacting with LIM Homeodomain Transcription Factor Isl1. *Sci. Rep.* 6, 39308 (2016).
 190. Barat-Houari, M. *et al.* Positional candidate gene analysis of Lim domain homeobox gene (Isl-1) on chromosome 5q11-q13 in a french morbidly obese population suggests indication for association with type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 1640–1643 (2002).
 191. Shiao, M.-S., Liao, B.-Y., Long, M. & Yu, H.-T. Adaptive Evolution of the Insulin Two-Gene System in Mouse. *Genetics* 178, (2008).
 192. Suzuki, S. *et al.* Molecular Basis of Neonatal Diabetes in Japanese Patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 3979–3985 (2007).
 193. Cao, B. *et al.* Genetic Analysis and Follow-Up of 25 Neonatal Diabetes Mellitus Patients in China. *J. Diabetes Res.* 2016, 6314368 (2016).
 194. Globa, E. *et al.* Neonatal diabetes in Ukraine: incidence, genetics, clinical phenotype and treatment. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 28, 1279–86 (2015).
 195. De Franco, E. *et al.* The effect of early, comprehensive genomic testing on clinical care in neonatal diabetes: an international cohort study. *Lancet (London, England)* 386, 957–63 (2015).
 196. Bellanné-Chantelot, C. *et al.* Clinical spectrum associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations. *Ann. Intern. Med.* 140, 510–7 (2004).

197. Gloyn, A. L. *et al.* Relapsing diabetes can result from moderately activating mutations in KCNJ11. *Hum. Mol. Genet.* 14, 925–934 (2005).
198. Yorifuji, T. *et al.* The C42R mutation in the Kir6.2 (KCNJ11) gene as a cause of transient neonatal diabetes, childhood diabetes, or later-onset, apparently type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 3174–3178 (2005).
199. Steiner, D. F. & Oyer, P. E. The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 57, 473–80 (1967).
200. Eyzaguirre, F. & Codner, E. [Insulin analogues: searching for a physiological replacement]. *Rev. Med. Chil.* 134, 239–50 (2006).
201. Permutt, M. A. & Kipnis, D. M. Insulin biosynthesis. I. On the mechanism of glucose stimulation. *J. Biol. Chem.* 247, 1194–9 (1972).
202. Wicksteed, B. *et al.* A cis-element in the 5' untranslated region of the preproinsulin mRNA (ppIGE) is required for glucose regulation of proinsulin translation. *Cell Metab.* 5, 221–7 (2007).
203. Goodge, K. A. & Hutton, J. C. Translational regulation of proinsulin biosynthesis and proinsulin conversion in the pancreatic β -cell. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11, 235–242 (2000).
204. Matsuoka, T. *et al.* Members of the large Maf transcription family regulate insulin gene transcription in islet beta cells. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6049–62 (2003).
205. Sander, M., Griffen, S. C., Huang, J. & German, M. S. A novel glucose-responsive element in the human insulin gene functions uniquely in primary cultured islets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 11572–7 (1998).
206. Wicksteed, B. *et al.* Cooperativity between the preproinsulin mRNA untranslated regions is necessary for glucose-stimulated translation. *J. Biol. Chem.* 276, 22553–8 (2001).

207. Tillmar, L., Carlsson, C. & Welsh, N. Control of insulin mRNA stability in rat pancreatic islets. Regulatory role of a 3'-untranslated region pyrimidine-rich sequence. *J. Biol. Chem.* 277, 1099–106 (2002).
208. Eiberg, H. *et al.* Autosomal dominant optic atrophy associated with hearing impairment and impaired glucose regulation caused by a missense mutation in the WFS1 gene. *J. Med. Genet.* 43, 435–440 (2006).
209. Valéro, R., Bannwarth, S., Roman, S., Paquis-Flucklinger, V. & Vialettes, B. Autosomal dominant transmission of diabetes and congenital hearing impairment secondary to a missense mutation in the WFS1 gene. *Diabet. Med.* 25, 657–661 (2008).
210. Hogewind, B. F. *et al.* Autosomal dominant optic neuropathy and sensorineural hearing loss associated with a novel mutation of WFS1. *Mol Vis* 16, 26–35 (2010).
211. Rendtorff, N. D. *et al.* Identification of p.A684V missense mutation in the WFS1 gene as a frequent cause of autosomal dominant optic atrophy and hearing impairment. *Am. J. Med. Genet. Part A* 155, 1298–1313 (2011).
212. Liew, C. W. *et al.* The pseudokinase tribbles homolog 3 interacts with ATF4 to negatively regulate insulin exocytosis in human and mouse β cells. *J. Clin. Invest.* 120, 2876–2888 (2010).
213. Seo, J. *et al.* Atf4 regulates obesity, glucose homeostasis, and energy expenditure. *Diabetes* 58, 2565–2573 (2009).
214. Yoshizawa, T. *et al.* The transcription factor ATF4 regulates glucose metabolism in mice through its expression in osteoblasts. *J. Clin. Invest.* 119, 2807–2817 (2009).
215. Zhang, Q. *et al.* Central activating transcription factor 4 (ATF4) regulates hepatic insulin resistance in mice via S6K1 signaling and the vagus nerve. *Diabetes* 62, 2230–9 (2013).
216. Travaglini, L. *et al.* Missense mutations of CACNA1A are a frequent cause of autosomal dominant nonprogressive congenital ataxia. *Eur. J. Paediatr. Neurol.*

(2016). doi:10.1016/j.ejpn.2016.11.005

217. Edlund, H. *et al.* Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400, 877–881 (1999).
218. Dror, V. *et al.* Notch signalling suppresses apoptosis in adult human and mouse pancreatic islet cells. *Diabetologia* 50, 2504–2515 (2007).
219. Zhu, X. R., Netzer, R., Bohlke, K., Liu, Q. & Pongs, O. Structural and functional characterization of Kv6.2 a new *_g_* subunit of voltage-gated potassium channel. *Recept. Channels* 6, 337–350 (1999).
220. Haapaniemi, E. M. *et al.* Autoimmunity, hypogammaglobulinemia, lymphoproliferation, and mycobacterial disease in patients with activating mutations in STAT3. *Blood* 125, 639–48 (2015).
221. Solimena, M. *et al.* ICA 512, an autoantigen of type I diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules. *EMBO J.* 15, 2102–14 (1996).
222. Cai, T. *et al.* Deletion of Ia-2 and/or Ia-2 β in mice decreases insulin secretion by reducing the number of dense core vesicles. *Diabetologia* 54, 2347–57 (2011).
223. Caromile, L. A., Oganessian, A., Coats, S. A., Seifert, R. A. & Bowen-Pope, D. F. The neurosecretory vesicle protein phogrin functions as a phosphatidylinositol phosphatase to regulate insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 285, 10487–96 (2010).
224. Kubosaki, A. *et al.* Targeted Disruption of the IA-2 β Gene Causes Glucose Intolerance and Impairs Insulin Secretion but Does Not Prevent the Development of Diabetes in NOD Mice. *Diabetes* 53, (2004).
225. Lu, J. *et al.* Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase, IA-2beta, as an autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus: precursor of the 37-kDa tryptic fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2307–11 (1996).
226. Bonnefond, A. *et al.* Whole-exome sequencing and high throughput genotyping identified KCNJ11 as the thirteenth MODY gene. *PLoS One* 7, e37423 (2012).

227. Gershoni, M. *et al.* A familial study of azoospermic men identifies three novel causative mutations in three new human azoospermia genes. *Genet. Med.* (2017). doi:10.1038/gim.2016.225
228. Bekheirnia, M. R. *et al.* Whole-exome sequencing in the molecular diagnosis of individuals with congenital anomalies of the kidney and urinary tract and identification of a new causative gene. *Genet. Med.* 19, 412–420 (2017).
229. Kastner, S. *et al.* Exome Sequencing Reveals AGBL5 as Novel Candidate Gene and Additional Variants for Retinitis Pigmentosa in Five Turkish Families. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 8045–53 (2015).
230. De Franco, E. & Ellard, S. Genome, Exome, and Targeted Next-Generation Sequencing in Neonatal Diabetes. *Pediatric Clinics of North America* 62, 1037–1053 (2015).
231. Murray, P. J. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J. Immunol.* 178, 2623–9 (2007).
232. Vogel, T. P., Milner, J. D. & Cooper, M. A. The Ying and Yang of STAT3 in Human Disease. *J. Clin. Immunol.* 35, 615–623 (2015).
233. Holland, S. M. *et al.* STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome. *N. Engl. J. Med.* 357, 1608–19 (2007).
234. Kane, A. *et al.* STAT3 is a central regulator of lymphocyte differentiation and function. *Curr. Opin. Immunol.* 28, 49–57 (2014).
235. Al Zaid Siddiquee, K. & Turkson, J. STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors. *Cell Res.* 18, 254–267 (2008).
236. Pan, Y. *et al.* RIG-I inhibits pancreatic beta cell proliferation through competitive binding of activated Src. *Sci. Rep.* 6, 28914 (2016).
237. Gorogawa, S. I. *et al.* Insulin secretory defects and impaired islet architecture in pancreatic β -cell-specific STAT3 knockout mice. *Biochem. Biophys. Res.*

Commun. 319, 1159–1170 (2004).

238. Wienke, J. *et al.* A novel human STAT3 mutation presents with autoimmunity involving Th17 hyperactivation. *Oncotarget* 6, 20037–42 (2015).

ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 1. Estudio de los genes *KCNJ11*, *ABCC8* e *INS*. Secuencia de los cebadores utilizados, las condiciones para el termociclador, el tamaño del fragmento amplificado y las condiciones específicas para la amplificación. Cada cebador lleva en el extremo 5' una cola M13 (no mostrada en la tabla). La cola M13 para el cebador *Forward* sería TGTAACGACGGCCAGT y para el *Reverse* CAGGAAACAGCTATGACC.

<i>KCNJ11</i>					
NOMBRE	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA CEBADOR 5'-3'	CONDICIONES TERMOCICLADOR	TAMAÑO (pb)	OTROS
Región promotora	FPro-KCNJ11	GTCTCGAACTCCTGACCTAGT	94°5';35x(94°30",62.8°30",72°30");72°7';4°∞	342	DMSO (10%)
	RPro-KCNJ11	CAGGCGTGTGTCAGCACGTATT			
Amplicón 1	F1-KCNJ11	CCGAGAGGACTCTGCAGTGA	94°5';35x(94°30",62.8°30",72°30");72°7';4°∞	422	DMSO (10%)
	R1-KCNJ11	GGTGACACAGGGCTCAGCA			
Amplicón 2	F2-KCNJ11	CCTTCCTGTGCAGCTGGCT	94°5';35x(94°30",62.8°30",72°30");72°7';4°∞	258	DMSO (10%)
	R2-KCNJ11	GCATGATGGCGTTGATCA			
Amplicón 3	F3-KCNJ11	GACTGAGGAGTGCCCACTGG	94°5';35x(94°30",62.8°30",72°30");72°7';4°∞	302	DMSO (10%)
	R3-KCNJ11	GGATGTCCACCTGGTGGA			
Amplicón 4	F4-KCNJ11	GCGCCACCATCCACATGCA	94°5';35x(94°30",62.8°30",72°30");72°7';4°∞	428	DMSO (10%)
	R4-KCNJ11	GCTGTGGTCCTCATCAAGCT			
Amplicón 5	F5-KCNJ11	CGGACGTTACTCTGTGGACT	94°5';35x(94°30",62.8°30",72°30");72°7';4°∞	340	DMSO (10%)
	R5-KCNJ11	CCTTGTAACACCCTGGATGA			

ABCC8					
NOMBRE	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5'-3'	CONDICIONES TERMOCICLADOR	TAMAÑO (pb)	OTROS
Región promotora	FPro-SUR1	CGCCTCCACATCTGGAAGGTG	95°C5';35x(95°30";63.9°30";72°30");72°7';4°∞	215	DMSO (10%)
	RPro-SUR1	CTGGCTCCGCTGGCTCCGC			
Exón 1	F1-SUR1	GCGGAGCCAGCGGAGCCAG	95°C5';35x(95°30";63.9°30";72°30");72°7';4°∞	232	DMSO (10%)
	R1-SUR1	CCCCTCCTCCGCGGCTCG			
Exón 2	F2-SUR1	CATGCACCCTCTTCTCCTC	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	248	DMSO (10%)
	R2-SUR1	CCTGGAGCAGATTCACTTTC			
Exón 3	F3-SUR1	CTCTATTGCAGTACTTAGCA	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	249	
	R3-SUR1	ATGAGTCCTCAGTAAACATT			
Exón 4	F4-SUR1	GTACACACATGATGCACACACG	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	277	DMSO (10%)
	R4-SUR1	AGGACAGAGGCCAGAGCCTCT			
Exón 5	F5-SUR1	GAGAAGTTGGACTTACCCATCC	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	361	
	R5-SUR1	CCCTTTGAGGTCCCTCTCT			
Exón 6	F6-SUR1	GTGAATTAGCCCTCAGGCAC	95°C5';35x(95°30";52.9°30";72°30");72°7';4°∞	279	DMSO (10%)
	R6-SUR1	GTAAGGCACCCTCTAGATGG			
Exón 7	F7-SUR1	TCATTTTGCTGGTCAATGAC	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	253	
	R7-SUR1	TTCATTTTGCCATAAGAACC			
Exón 8	F8-SUR1	TGGTGATGATGATGAGAATG	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	264	
	R8-SUR1	TTCTGGTTGTGTGCCTGCTG			
Exón 9	F9-SUR1	AACAGGGATTTTGCCAGCAC	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	321	
	R9-SUR1	TCAAAGTCAAAGTCAAAGTCAATGAC			
Exón 10	F10-SUR1	GGCATGGCAGTGACAGTATT	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	310	
	R10-SUR1	CTCCTTGCATGTACGCAG			

Exón 11	F11-SUR1	ACGCTCCTCCCACTAAAC	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	159	
	R11-SUR1	AAATCTGGGCAGCCTGTC			
Exón 12	F12-SUR1	CAGTGCTGAGCGTTTCCAGT	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	295	
	R12-SUR1	CATCACTCGAGCAAGCCTTG			
Exón 13	F13-SUR1	TCAGAGCTCTCTATCAGGCTGCG	95°C5';35x(95°30";63.9°30";72°30");72°7';4°∞	267	DMSO (10%)
	R13-SUR1	AAGTCCGACACAGCAGGCC			
Exón 14	F14-SUR1	TCCCTTCCCTACACAGCTCC	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	256	
	R14-SUR1	CATGCAGCTTTCTGGCTTTC			
Exón 15	F15-SUR1	GGGAACTGGCTGCCTTTCTG	95°C5';35x(95°30";63.9°30";72°30");72°7';4°∞	227	
	R15-SUR1	GAGTAGGTGCTCAATAAATGC			
Exón 16	F16-SUR1	GGTAATGGTTGTTCACTCC	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	223	
	R16-SUR1	GGAGGATGGTTAAAAGGAGATT			
Exón 17	F17-SUR1	GGGGTGGGAACTAAGTGGTG	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	173	DMSO (10%)
	R17-SUR1	ATACTCAGCATTACCCACCCAC			
Exón 18	F18-SUR1	GATCTTCTGGAGGATATGGTTCA	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	179	
	R18-SUR1	GGTGATGTGGCTCCCTTGG			
Exón 19	F19-SUR1	CCACCAGAGGCCACACTAAG	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	291	
	R19-SUR1	AGTTCCTCCCCTCCACATCC			
Exón 20	F20-SUR1	GCATAGCTACCCAGAGACTAAT	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	260	
	R20-SUR1	CCATTGCTCTGAGTAGTGTCTCA			
Exón 21	F21-SUR1	ACAGGACAGTGTCTCCTGAATGGCT	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	184	DMSO (10%)
	R21-SUR1	GGGAGGCAGCCAGAGACCAG			
Exón 22	F22-SUR1	CCTACCCTCTACTCTCTTCC	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	236	
	R22-SUR1	AAGATGCCTGACAGCCTCC			
Exón 23	F23-SUR1	ATTTGTAGTGAGGAAAGGGATGT	95°C5';35x(95°30";63.9°30";72°30");72°7';4°∞	302	
	R23-SUR1	AGTTCTAGCAGAACCTTTGCA			

Exón 24	F24-SUR1	CCATATATCCTGAAGACATTGCC	95°C5';35x(95°30";52.9°30";72°30");72°7';4°∞	296
	R24-SUR1	CCCACCTACTGAGGGGACAA		
Exón 25	F25-SUR1	TGATTCACCCTCAGAGGG	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	383
	R25-SUR1	ATTTGGAGTTCCAGGGTGC		
Exón 26	F26-SUR1	ATGGCAGAGGTTGGGAGTG	95°C5';35x(95°30";63.9°30";72°30");72°7';4°∞	300
	R26-SUR1	GAGAACAGTGACTTGCTCAC		
Exón 27	F27-SUR1	TGAATGACTCCAGAGACACTTA	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	235
	R27-SUR1	GCCCCAGGGGTCCGAGG		
Exón 28	F28-SUR1	AGTAGCACTCTAAACACAGTCAATA	95°C5';35x(95°30";63.9°30";72°30");72°7';4°∞	286
	R28-SUR1	CTAGCAAGTACACCAAACCTGC		
Exón 29	F29-SUR1	ATTCACCCACACAGCGGTA	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	308
	R29-SUR1	GAGAGAGAACGTGTCCTTG		
Exón 30	F30-SUR1	CTATGTGGACCAACACTGTTC	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	246
	R30-SUR1	ATCCTATCCTCTCTTATCC		
Exón 31	F31-SUR1	GTAGAACAGGGGCCTGTGGC	95°C5';35x(95°30";63.9°30";72°30");72°7';4°∞	250
	R31-SUR1	TGTCTCCAGTGACGAAGGT		
Exón 32	F32-SUR1	ATGGCAGCAAAAGGAATCTG	95°C5';35x(95°30";63.9°30";72°30");72°7';4°∞	278
	R32-SUR1	CTTGGACTCTTCCCCACC		
Exón 33	F33-SUR1	AGTCCAAGGAGGAGTGTGTC	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	298
	R33-SUR1	ATCCCCTGCTCACGCCTG		
Exón 34	F34-SUR1	CCCTGTGACCTCCCACACCT	95°C5';35x(95°30";63.9°30";72°30");72°7';4°∞	276
	R34-SUR1	ACTGCTGGGCCTCCTGTCAT		
Exón 35	F35-SUR1	GGTCAGACATGACAGGAGG	95°C5';35x(95°30";63.9°30";72°30");72°7';4°∞	235
	R35-SUR1	AGATCTGATGGAAGTGAAC		
Exón 36	F36-SUR1	ACCCTGCTCCCTCCCTACTG	95°C5';35x(95°30";59.3°30";72°30");72°7';4°∞	193
	R36-SUR1	GTCCCTTGAGTGCCCAACC		

Exón 37	F37-SUR1	ATCCCATCTGCTCCACTCAC	95°C5';35x(95°30";63.9°30";72°30");72°7';4°∞	250
	R37-SUR1	CTAAACCCTTTCCAAGACCAT		
Exón 38	F38-SUR1	CCAGGCCAGACCCCATCCAC	95°C5';35x(95°30";63.9°30";72°30");72°7';4°∞	193
	R38-SUR1	ACTGATGACGGCCACAACAGGC		
Exón 39	F39-SUR1	CCACAGTGACAGGACATTCT	95°C5';35x(95°30";63.9°30";72°30");72°7';4°∞	231
	R39-SUR1	CCAGGCTGGTTCTACTGAA		

<i>INS</i>					
NOMBRE	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5'-3'	CONDICIONES TERMOCICLADOR	TAMAÑO (pb)	OTROS
Amplicón 1	F1-INS	TAATGACCCGCTGGTCCTGAG	95°7';35x(95°30",64°30",72°30");72°7';4°∞	720	
	R1-INS	CTTCTGCCCATGCTGGGTGGGA			
Amplicón 2	F2-INS	GCACTGTGTCTCCCTGACT	95°7';35x(95°30",64°30",72°30");72°7';4°∞	382	
	R2-INS	GCTGGGAGGGGCTCACAACA			

Tabla 2. Estudio de la región 6q24. Microsatélites analizados para la detección de la isodisomía paterna. Se detalla además del nombre la región donde se localiza cada microsatélite a lo largo del cromosoma 6.

Nombre	Región
D6S262	6q21-22.1
D6S276	6p21.3-22.3
D6S279	6q23-24
D6S286	6q14.3-15
D6S292	6q21-23.3
D6S310	6q22.33
D6S314	6q23-24
D6S355	6q23-24
D6S1704	6q23-24
D6STNFa	6q21.3

Tabla 3. Estudio de la región 6q24. Secuencia de los cebadores utilizados, las condiciones para el termociclador, el tamaño del fragmento amplificado y las condiciones específicas para la amplificación. Los cebadores *Forward* del estudio de dosis génica y el análisis de microsatélites llevan todos un fluoróforo en el extremo 5´.

6q24					
DOSIS GÉNICA					
NOMBRE	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5´-3´	CONDICIONES TERMOCICLADOR	TAMAÑO (pb)	OTROS
99515	FF99515	AAAAAGCCAATGACAATCAATT	95°15';20x(95°45',52°45',72°60");72°7';4°∞	144	
	NR99515	AGAACAGCACTGGGAGACCA			
9563	FF9563	CTAAAAACATAAGACAATGGAG		147	
	NR9563	GTAATTCATCAGTCATTATTAGC			
7136	FF7136	TTGATCTATTTAGTCAAGTCC		103	
	NR7136	TTATTGGCATTCTCTACCTATTT			
2051beta	FF2051b	GAACTTGTAGAGACTCTTATC		183	
	NR2051b	CATTGAGACATGACAACCTGG			
254 (control)	FF254	ATAGGTCATTGCTTCTTGCTGAT		192	
	NR254	TGAATTTAATGGATTACCTAGGT			

ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES

NOMBRE	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5'-3'	CONDICIONES TERMOCICLADOR
D6S262	HFD6S262	ATTCTTACTGCTGGAAAACCAT	95°5';32x(95°15",55°15",72°30");72°7';60°60'4°∞
	NRD6S262	GGAGCATAGTTACCCTTAAAATC	
D6S276	FFD6S276	TCAATCAAATCATCCCCAGAAG	
	NRD6S276	GGGTGCAACTTGTTCTCCT	
D6S279	FFD6S279	AGCTTCAAGTGTAGGGCAAG	
	NRD6S279	CCTAGACTGGACCTGGGATT	
D6S286	HFD6S286	CCCAGCATCACCCCTAATAC	
	NRD6S286	TGCATATGTTGAACCAATCG	
D6S292	FFD6S292	GAATTCACAAGACACAATCTCAG	
	NRD6S292	AGAACTAAAGTTGCCTGTTTCATGTA	
D6S310	TFD6S310	GATCCAGATTGCAGAAGG	
	NRD6S310	GAAACAGGACCAGTAGGATATG	
D6S314	FFD6S314	AAAATGACTTCTTTGGGTGGGC	
	NRD6S314	GTGGGTAGCAACTGTGGC	
D6S355	FFD6S355	GGTTGATAGGTGCAGCAAACCATG	
	NRD6S355	TGAAAAGGTGCTGGCTTAATGCAT	
D6S1704	FFD6S1704	TTGAGGTGTGTGGGGC	
	NRD6S1704	AACTCTGGGGGATTGG	
D6STNFa	HFD6STNFA	GCCTCTAGATTCATCCAGCCACC	
	NRD6STNFA	CCTCTCTCCCCTGCAACACACA	

ESTUDIO DE METILACIÓN					
NOMBRE	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5'-3'	CONDICIONES TERMOCICLADOR	TAMAÑO (pb)	OTROS
DMR PLAGL1/HYMAI	NFH1F2	GCGGAGACTTCGGCTAGCAG	95°15';36x(95°15",58°15",72°20");72°7';4°∞	150	Betaina (1M)
	NRH1F2	GGAGCTGAGCGGCACCCACA			
	NFH11G	GGCGTGCTCTGGCCTCACTC		200	
	NRH11G	CACCCAAACACCTACCCTGC			

Tabla 4. Estudio de los genes *FOXP3*, *GCK* y *GATA6*. Secuencia de los cebadores utilizados, las condiciones para el termociclador, el tamaño del fragmento amplificado y las condiciones específicas para la amplificación. Cada cebador lleva en el extremo 5' una cola M13 (no mostrada en la tabla). La cola M13 para el cebador *Forward* sería TGAAAACGACGGCCAGT y para el *Reverse* CAGGAAACAGCTATGACC.

<i>FOXP3</i>					
NOMBRE	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5'-3'	CONDICIONES TERMOCICLADOR	TAMAÑO (pb)	OTROS
Región promotora	FPro-FOXP3	TTCATGAGCCCTATTATCTCA	94°5';35x(94°30",59.3°30",72°30");72°7';4°∞	480	
	RPro-FOXP3	TGGGTACATCCCCTGTACC			
Exón 1	F1-FOXP3	TTCATACCGCCCTAGCACACG	94°5';35x(94°30",59.3°30",72°30");72°7';4°∞	425	
	R1-FOXP3	CATAAGTCACAGACTTGCCTGG			
Exón 2	F2-FOXP3	AGCATCTACCATGTGGGCTTG	94°5';35x(94°30",59.3°30",72°30");72°7';4°∞	324	
	R2-FOXP3	GGCGTGGGCATCCACCGTTGAG			
Exón 3	F3-FOXP3	TCATGCACCAGGTATGGACG	94°5';35x(94°30",59.3°30",72°30");72°7';4°∞	329	
	R3-FOXP3	GAATAGCCTACACTGCTCACA			
Exón 4	F4-FOXP3	GCCAGAAGCCTGGGACTTTG	94°5';35x(94°30",59.3°30",72°30");72°7';4°∞	366	
	R4-FOXP3	TGCAGACACCATTTGCCAGCA			
Exón 5	F5-FOXP3	CTCTGCACCTTCCCAAATCC	94°5';35x(94°30",59.3°30",72°30");72°7';4°∞	486	
	R5-FOXP3	GCCTCAGTCTCCTTGTCTGT			
Exón 6	F6-FOXP3	TCAGAGGAGAGAACTCCCAG	94°5';35x(94°30",59.3°30",72°30");72°7';4°∞	264	
	R6-FOXP3	GTTTCTGGCAGATGGTGGAC			
Exón 7	F7-FOXP3	GCAAAGATGTGGCAGAGAA	94°5';35x(94°30",59.3°30",72°30");72°7';4°∞	245	
	R7-FOXP3	CTAGCTCTCAGGACCTGAAT			
Exón 8	F8-FOXP3	GTGGGAAGTTTAAGCCTCTGG	94°5';35x(94°30",59.3°30",72°30");72°7';4°∞	253	
	R8-FOXP3	GCCTGTCAGGATTAGGAGC			

Exón 9	F9-FOXP3	CTCAGGCCTGTAGACTCACC	94°5';35x(94°30",59.3°30",72°30");72°7';4°∞	383	DMSO (10%)
	R9-FOXP3	GGATGGTGGTTTAGGTTTGG			
Exón 10	F10-FOXP3	ACATCTAGTCCTGTCCCTGA	94°5';35x(94°30",59.3°30",72°30");72°7';4°∞	444	
	R10-FOXP3	TTGTGCAGACTCAGGTTGTG			
Exón 11	F11-FOXP3	TGCTGGCCTCAGAGTTGAC	94°5';35x(94°30",59.3°30",72°30");72°7';4°∞	261	
	R11-FOXP3	CTCTGCCTCCCACCAGTTTG			
Región 3' UTR	F3UTR-FOXP3	CCGCAAGAAACGGAGCCAGA	94°5';35x(94°30",59.3°30",72°30");72°7';4°∞	520	
	R3UTR-FOXP3	GTGATTGTGTGATGATGCAGCT			
PoliA	FPoliA-FOXP3	TTCACCTGTGTATCTCACGCA	94°5';35x(94°30",59.3°30",72°30");72°7';4°∞	352	
	RPoliA-FOXP3	CCCTAGCTACTTCTCCGCTGTC			

GCK					
NOMBRE	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5'-3'	CONDICIONES TERMOCICLADOR	TAMAÑO (pb)	OTROS
Región promotora	FPro-GCK	GGGGGTTAGGGATGTGAGAT	94°10';35x(94°30",65°30",72°30");72°7';4°∞	577	
	RPro-GCK	TGTGGGGCTTAGTGTCCCTTC			
Exón 1	F1-GCK	TCCAATTCAGAAGCCTACTG	94°10';35x(94°30",60°30",72°30");72°7';4°∞	231	
	R1-GCK	TCAGATTCTGAGGCTCAAAC			
Exón 2	F2-GCK	TGCAGATGCCTGGTGACAGC	94°10';35x(94°1',65°1',72°1');72°7';4°∞	326	
	R2-GCK	CACAGCTGCTTCTGGATGAG			
Exón 3	F3-GCK	TAATATCCGGCTCAGTCACC	94°10';35x(94°30",60°30",72°30");72°7';4°∞	333	
	R3-GCK	CTGAGATCCTGCATGGCCTTG			
Exón 4	F4-GCK	TAGCTTGGCTTGAGGCCGTG	94°10';35x(94°30",65°30",72°30");72°7';4°∞	308	
	R4-GCK	TGAAGGCAGAGTTCCTCTGG			
Exón 5	F5-GCK	GCACCCTGCCTCCAGTATATGT	94°10';35x(94°30",63°30",72°30");72°7';4°∞	257	DMSO (10%)
	R5-GCK	AGGAGAAAGGCAGGCAGTGCTG			

Exón 6	F6-GCK	GCCTGCCTTTCTCCTTGGCT	94°10';35x(94°30',65°30',72°30');72°7';4°∞	256	DMSO (10%)
	R6-GCK	CCTTGAAGCCTGTTGTACACA			
Exón 7	F7-GCK	GTTCCAGACAAAGCAGAGACA	94°10';35x(94°30',65°30',72°30');72°7';4°∞	349	DMSO (10%)
	R7-GCK	GCAGAAGGGATGGAGCTTAC			
Exón 8	F8-GCK	CGTGACCTCAGTGGGGAGCA	94°10';35x(94°30',65°30',72°30');72°7';4°∞	372	
	R8-GCK	CGTCGCCCTGAGACCAAGTCT			
Exón 9	F9-GCK	ACTGTCGGAGCGCACTCAG	94°10';35x(94°1',65°1',72°1');72°7';4°∞	403	
	R9-GCK	CTTGGAGCTTGGGAACCGCA			
Exón 10	F10-GCK	GTCGACTGCGTGAGGGCGC	94°10';35x(94°30',65°30',72°30');72°7';4°∞	299	DMSO (10%)
	R10-GCK	TGTGGCATCCTCCCTGCGCT			

GATA6					
NOMBRE	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5'-3'	CONDICIONES TERMOCICLADOR	TAMAÑO (pb)	OTROS
Exón 1	F1-GATA6	CGGCTCTCATTGTCTGCCTG	94°10';35x(94°30',65°30',72°30');72°7';4°∞	542	DMSO (10%)
	R1-GATA6	AGGAGGGAAACACCGTCGG			
Exón 2	F2A-GATA6	GAGAAGTCAGATCCCATTGGA	94°10';35x(94°30',65°30',72°30');72°7';4°∞	520	DMSO (10%)
	R2A-GATA6	CCTCCAGCTCGACAGGTT			
	F2B-GATA6	GCTCAGTTCCTACGCTTCGCA	94°10';35x(94°30',65°30',72°30');72°7';4°∞	480	DMSO (10%)
	R2B-GATA6	GCTGCCGTATGGAGGGCTGT			
	F2C-GATA6	CGCACCCCGGCTGGCCTCA	94°10';35x(94°30',65°30',72°30');72°7';4°∞	605	DMSO (10%)
	R2C-GATA6	CCTGAAAACAGGGCCCGAGT			
Exón 3	F3-GATA6	CGGCCAAGGAGAAAAGCTCA	94°10';35x(94°30',65°30',72°30');72°7';4°∞	509	DMSO (10%)
	R3-GATA6	GGACAGGATGGTACCGCTG			
Exón 4	F4-GATA6	CATACTTGTTGATGACAGGGA	94°10';35x(94°30',55°30',72°30');72°7';4°∞	357	DMSO (10%)

	R4-GATA6	CTTGAGTATCTTTCATTTGCT			
Exones 5+6	F5/6-GATA6	TGCCAATGTTGGGTCTTTGG	94°10';35x(94°30',55°30',72°30');72°7';4°∞	484	DMSO (10%)
	R5/6-GATA6	GATTATTGTA CTACCAGATA			
Exón 7	F7-GATA6	CCTGGGTCTGCCCAGGAGCA	94°10';35x(94°30',65°30',72°30');72°7';4°∞	520	DMSO (10%)
	R7-GATA6	CTCCCTTCCATCTTCTCTCAC			

Tabla 5. Validación de variantes detectadas por WES: estudio de las variantes en *WFS1*, *ATF4*, *STAT3*, *PTPRN2* y *KCNG2*. Secuencia de los cebadores utilizados, las condiciones para el termociclador, el tamaño del fragmento amplificado y las condiciones específicas para la amplificación. Cada cebador lleva en el extremo 5' una cola M13 (no mostrada en la tabla). La cola M13 para el cebador *Forward* sería TGTAACGACGGCCAGT y para el *Reverse* CAGGAAACAGCTATGACC.

NOMBRE	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA CEBADOR 5'-3'	CONDICIONES TERMOCICLADOR	TAMAÑO (pb)	OTROS
Exón 8	F8-WFS1	GCGGGTTCCTTTGCCCCA	94°5';35x(94°30",63°30",72°30");72°7';4°∞	490	
	R8-WFS1	GGCTCCAGGTGGTTCCA			
Exón 9+10	F9-STAT3	CCTTCTCCATCTCACCTG	94°5';35x(94°30",60.6°30",72°30");72°7';4°∞	553	
	R10-STAT3	GGCCACCAACTCTACCCT			
Exón 2	F2-ATF4	GCAAAACAAGACAGCAGC	94°5';35x(94°30",58°30",72°30");72°7';4°∞	306	
	R2-ATF4	GGAAAGGAATTCAAACGCA			
Exón 9	F9-PTPRN2	GCTGACCCAGGCCAGGA	94°5';35x(94°30",63°30",72°30");72°7';4°∞	340	
	R9-PTPRN2	CCATGGGCTCGCAGCTCCT			
Exón 2	F2-KCNG2	CCTGGGAAAGGAAGGGCA	94°5';35x(94°30",63°30",72°30");72°7';4°	490	DMSO (10%)
	R2-KCNG2	CCATGGCCACGCAGAGGA			

Tabla 7. Listado de los *Taqman Gene expression Assays* utilizados en todos los experimentos de análisis de expresión.

GEN	ESPECIE	FLUORÓFORO	REFERENCIA
<i>GAPDH</i>	Rata	VIC	Rn01775763_m1
<i>ACTB (β-Actina)</i>	Humano	VIC	Hs01060665_g1
<i>Isl1</i>	Rata	FAM	Rn00569203_m1
<i>ISL1</i>	Humano	FAM	Hs00158126_m1
<i>Stat3</i>	Rata	FAM	Rn00562562_m1
<i>STAT3</i>	Humano	FAM	Hs1047580_m1
<i>INS</i>	Humano	FAM	Hs02741908_m1
<i>Ins1</i>	Rata	FAM	Rn02121433_g1
<i>Ins2</i>	Rata	FAM	Rn01774648_g1
<i>Pax6</i>	Rata	FAM	Rn00689608_m1
<i>PAX6</i>	Humano	FAM	Hs00240871_m1
<i>Lmx1a</i>	Rata	FAM	Rn01759119_m1
<i>LMX1A</i>	Humano	FAM	Hs00892663_m1

ANEXO 2

Tabla 1. Resultados del análisis estructural de los genes asociados a diabetes neonatal. Mutaciones detectadas en 30 de las 42 familias estudiadas, portadores de dicha alteración en la familia de cada caso y el tipo de herencia.

GEN MUTADO	FAMILIA	TIPO DN	ALTERACION DETECTADA		PORTADORES DE LA MUTACION	HERENCIA
6q24	DM1665	DNT	Isodisomía paterna		Índice	?
	DM1721	DNT	Isodisomía paterna		Índice	?
	DM2579	DNT	Isodisomía paterna		Índice	?
	DM3074		Isodisomía paterna		Índice	?
	DM2509	DNT	Duplicación del alelo paterno		Índice	De novo
	DM2921		Duplicación del alelo paterno		Índice +Padre	Paterna
	DM2941		Duplicación del alelo paterno		Índice +Padre	Paterna
	DM3034		Duplicación del alelo paterno		Índice	De novo
	DM3097		Perdida metilación del alelo materno		Índice	De novo
KCNJ11	DM1822	DNP	c.602G>A	p.Arg201His	Índice	De novo
	DM1978	DNP	c.175G>A	p.Val59Met	Índice	?
	DM1986	DMP	c.679G>A	p.Glu227Lys	Índice +Madre+Abuela Materna	Materna
	DM2112	DNP	c.175G>A	p.Val59Met	Índice	De novo
	DM2504	DNT	c.602G>A	p.Arg201His	Índice +Madre	Materna
	DM2517		c.481G>A	p.Ala161Thr,	Índice +Hija	?
	DM2658		c.481G>A	p.Ala161Thr	Índice	De novo
	DM3272		c.553A>C	p.Lys185Gln	Índice	De novo
	DM3344		c.601C>T	p.Arg201Cys	Índice	De novo
ABCC8	DM2175	DNT	c.3547C>T	p.Arg1183Trp	Índice +Padre+Hermano	Paterna
	DM2598	DNP	c.627C>A	p.Asp209Glu	Índice	De novo
	DM2854		c.2498G>C	p.Gly833Ala	Índice +Madre+Abuela Materna	Materna
	DM3176		c.3536A>C	p.Gln1179Pro	Índice +Padre	Paterna

FOXP3	DM1889	IPEX	c.282dupA	p.Leu95ThrfsX111	Índice +Madre+Abuela+Bisabuela+Tia abuela	Materna (Herencia ligada al cromosoma X)
	DM2349	DNT	c.265C>T	p.Arg89Cys	Índice	<i>De novo</i>
	DM2496	DNT	c.314T>C	p.Leu105Pro	Índice +Padre	Paterna
	DM2622	DNT	c.128G>A	p.Cys43Tyr	Índice	<i>De novo</i>
INS	DM2770		c.188-31G>A		Índice	<i>De novo</i>
	DM2798	DNP	c.115C>G	p.Leu39Val,	Índice	?
	DM3027	DNP	c.324_328delCTGCA	p.Tyr108*	Índice +Padre	Paterna
	DM2489	DNT	c.64G>C	p.Ala22Pro??	Índice	<i>De novo</i>

Tabla 2. Resumen de las mutaciones detectadas en las 30 de las 42 familias estudiadas. Referencias bibliográficas de los estudios en los que se demuestra la asociación de la alteración con la enfermedad.

GEN MUTADO	FAMILIA	ALTERACION DETECTADA		REFERENCIA	ESTUDIO FUNCIONAL
6q24	DM1665	Isodisomía paterna			
	DM1721	Isodisomía paterna			
	DM2579	Isodisomía paterna			
	DM3074	Isodisomía paterna			
	DM2509	Duplicación del alelo paterno			
	DM2921	Duplicación del alelo paterno			
	DM2941	Duplicación del alelo paterno			
	DM3034	Duplicación del alelo paterno			
	DM3097	Perdida metilación del alelo materno			
KCNJ11	DM1822	c.602G>A	p.Arg201His	(Gloyn, et al., 2004b; Sagen, et al., 2004; Vaxillaire, et al., 2004; Zung, et al., 2004; Colombo, et al., 2005; Klupa, et al., 2005; Feigerlova, et al., 2006; Flanagan, et al., 2006; Gloyn, et al., 2006; Skupien, et al., 2006; Tonini, et al., 2006; Chan and Laffel, 2007; Codner, et al., 2007; Edghill, et al., 2007)	(Gloyn, et al., 2004b; Proks, et al., 2004; Proks, et al., 2005a; Lin, et al., 2006a; Tarasov, et al., 2006)
	DM2504	c.602G>A	p.Arg201His		
	DM1978	c.175G>A	p.Val59Met	(Gloyn, et al., 2004b; Sagen, et al., 2004; Vaxillaire, et al., 2004; Massa, et al., 2005; Flanagan, et al., 2006;	(Koster, et al., 2005; Proks, et al., 2005a; Lin, et al., 2006a)
	DM2112	c.175G>A	p.Val59Met		
	DM1986	c.679G>A	p.Glu227Lys	(Edghill, et al., 2007; Landau, et al., 2007; Rica, et al., 2007)	(Girard, et al., 2006)
	DM2517	c.481G>A	p.Ala161Thr	NO	
	DM2658	c.481G>A	p.Ala161Thr		
	DM3272	c.553A>C	p.Lys185Gln	Shimomura (2010) Diabet Med 27, 225	Koster (1999) J Physiol 515 (: 19
DM3344	c.601C>T	p.Arg201Cys	Gloyn (2004) N Engl J Med 350, 1838		
DM3194	?	?			

Tabla 2. Continuación.

GEN MUTADO	FAMILIA	ALTERACION DETECTADA		REFERENCIA	ESTUDIO FUNCIONAL
ABCC8	DM2175	c.3547C>T	p.Arg1183Trp	(Flanagan, et al., 2007) (Patch, et al., 2007)	
	DM2598	c.627C>A	p.Asp209Glu	(Ellard, et al., 2007; Flanagan, et al., 2007)	
	DM2854	c.2498G>C	p.Gly833Ala	NO	
	DM3176	c.3536A>C	p.Gln1179Pro	NO	
FOXP3	DM1889	c.282dupA	p.Leu95ThrfsX111		
INS	DM2349	c.265C>T	p.Arg89Cys	Stoy (2007) Proc Natl Acad Sci U S A 104, 15040	Park (2010) Biochem Biophys Res Commun 391: 1449
	DM2496	c.314T>C	p.Leu105Pro	Flanagan (2014) Cell Metab 19, 146	
	DM2622	c.128G>A	p.Cys43Tyr	NO pero si otros cambios en el mismo aa	
	DM2770	c.188-31G>A		Garin (2012) PLoS One 7, e29205	
	DM2798	c.115C>G	p.Leu39Val	Zhang (2015) J Pediatr Endocrinol Metab 28, 877	
	DM3027	c.324_328delCTGCA	p.Tyr108*	Colombo (2008) J Clin Invest 118, 2148	
	DM2489	c.64G>C	p.Ala22Pro??	NO	

ANEXO 3

Tabla 1. Resumen de la calidad de los datos obtenidos del análisis bioinformático de WES.

CASOS ÍNDICE								
	I01	I02	I03	I04	I05	I06	I07	I08
Número de lecturas totales	27056140	40756324	31842245	33014663	38615310	37178450	31672119	37377150
Número de lecturas mapeadas	26865685	40557771	31695529	32841454	38412860	36943759	31435533	37142203
Covertura (10x) (% de las posiciones diana)	60,5889007	73,8431908	69,2889536	68,8491	76,3928797	73,9821418	66,1938888	70,9661073
Covertura (20x) (% de las posiciones diana)	30,6936176	44,6539332	38,4923942	38,4838178	48,9063991	47,9658364	38,6121075	43,0453495
Mean read depth (X de las posiciones diana)	16,0884318	22,209429	19,7614014	19,7636976	24,0493075	23,4936433	19,1205127	21,2763674
FAMILIARES								
	M01	P01	M02	P02	M03	P03	M04	P04
Número de lecturas totales	35602806	31027945	28043257	33494235	27677588	36620294	24156535	38161623
Número de lecturas mapeadas	35427967	30820689	27878853	33302992	27478080	36405841	23907709	37961819
Covertura (10x) (% de las posiciones diana)	71,8081525	64,0379122	60,6237376	67,979483	64,6172115	73,2530684	59,9862116	75,2364104
Covertura (20x) (% de las posiciones diana)	40,6032861	35,3430645	29,8466363	37,9217514	36,4432537	45,9207961	34,0647312	47,0721835
Mean read depth (X de las posiciones diana)	20,3822822	18,2417691	16,3194872	19,0727957	18,2370749	22,7916944	16,9537136	23,4020679
	M05	P05	M06	P06	M07	P07	M08	P08
Número de lecturas totales	35533500	33433908	30892138	31799375	31857950	37766316	30403601	36574823
Número de lecturas mapeadas	35320428	33231011	30646257	31569029	31655451	37497371	30209692	36390746
Covertura (10x) (% de las posiciones diana)	73,8687549	70,3109603	67,9059395	68,8020533	67,3703024	71,3252078	65,972217	71,6305549
Covertura (20x) (% de las posiciones diana)	47,4776363	42,8252549	41,7254068	42,127606	38,0334296	45,2295088	37,0472484	42,0488103
Mean read depth (X de las posiciones diana)	23,2957947	21,7330537	20,5462512	20,8344856	19,0210151	22,4145063	18,7158936	21,3402843

Tabla 2. Resumen sobre las variantes exónicas obtenidas mediante el análisis bioinformático del WES.

CASOS ÍNDICE								
	I01	I02	I03	I04	I05	I06	I07	I08
Número total de variantes exónicas	28243	29773	29359	29221	29688	29527	29011	30704
Filtrado técnico	13151	16205	15413	15266	16413	15906	14519	16069
Variantes <i>Missense</i> y <i>Nonsense</i>	9187	9657	9516	9476	9630	9561	9434	9986
<i>Indels</i> exónicos	89	126	113	116	139	111	94	126
Variantes que no constan en dbSNP	1279	1147	1282	1196	1286	1328	1268	1486
Variantes que no constan en 1000g o con un MAF<0.05	1985	1998	2068	1964	2050	2144	2096	2274
FAMILIARES								
	M01	P01	M02	P02	M03	P03	M04	P04
Número total de variantes exónicas	29890	28850	28557	28965	28803	29687	28018	30395
Filtrado técnico	15852	14170	13643	14971	13946	15946	12741	16644
Variantes <i>Missense</i> y <i>Nonsense</i>	9655	9374	9227	9364	9402	9658	9154	9861
<i>Indels</i> exónicos	123	101	104	111	110	128	68	139
Variantes que no constan en dbSNP	1268	1325	1202	1218	1412	1317	1604	1359
Variantes que no constan en 1000g y/o con un MAF<0.05	2026	2043	1921	1976	2213	2085	2260	2244
	M05	P05	M06	P06	M07	P07	M08	P08
Número total de variantes exónicas	29781	29549	29247	28996	29342	29305	29136	30873
Filtrado técnico	16120	15621	14769	14835	14721	15390	14506	16514
Variantes <i>Missense</i> y <i>Nonsense</i>	9657	9585	9481	9408	9537	9517	9446	10007
<i>Indels</i> exónicos	143	138	106	121	115	107	118	132
Variantes que no constan en dbSNP	1298	1412	1431	1420	1250	1212	1311	1553
Variantes que no constan en 1000g y/o con un MAF<0.05	2068	2227	2197	2136	2110	2000	2013	2409

Tabla 3. Listado de los genes en los que identificamos variantes en cada uno de los 7 casos en los que empleamos una priorización de filtrado *de novo*.

P01	P02	P03	P05	P06	P07	P08
CROCC	L1TD1	PIK3CD	LOC440563	NBPF14	MUC4	MUC4
MUC4	POLR3C	IGFN1	FAM63A	RNF103	HERC2	FLG
WFS1	LOC440563	ELTD1	GKN1	POLQ	HERC2	PDE4DIP
ATXN1	CCDC108	ARHGEF4	ATP6V1A	SLC9B1	OR1J1	SLC36A3
COL21A1	DAPL1	MUC4	PABPC1	UGT2B4	LILRB3	FOXD4L1
LYZL2	SNRNP200	CRIPAK	LGR4	FRAS1	ZFPM2	ALS2CR8
MUC6	ANKRD36	SLC22A5	MUC5B	FBXL17	TUBB8	DSPP
BEGAIN	PRR21	FAM120B	RPH3A	HGC6.3	FOXD4	UGT2B11
METTL17	DNAH12	BCLAF1	PABPC3	MUC12	PABPC3	MLKL
FAM108A1	GOLGA4	MLL3	AHNAK2	PTPRN2	SFTPA1	ATR
ZNF114	PRSS48	MUC12	PTPN21	PABPC1	KRTAP9-1	KNDC1
SBSN	EGFLAM	RP1L1	GOLGA6L10	RP1L1	GNB1L	PHC1
VCX2	SLC22A5	NOTCH1	ADAMTS7	AKR1C1	FAM84A	SRA1
	MUC12	DGKZ	MEX3B	UBTFL1	MUC16	RAB3A
	PABPC1	MUC6	CDH13	NAT10	DSPP	POTEH
	SLC7A2	APBA2	INO80E	ZNF140	CAP1	TUBGCP5
	FAM75A3	FBN1	DNAH2	PRDM4	TCHH	TRIOBP
	ARHGAP12	VWA3A	EVI2A	UNKL	KCNJ5	CMKLR1
	TCP11L1	C16orf7	STAT3	TNRC6A		MAB21L3
	MUC6	IL34	ZNF554	WWOX		ALPK1
	TDG	CDC27	NLRP2	ZNF878		EEF2
	PPFIBP1	SPECC1		ZNF585A		
	C14orf80	ZNF100		AKAP8L		
	CATSPER2	KIR3DL3		MRPS6		
	MVD	GNAS		SYNJ1		
	KIAA0556			MAGEC1		
	KIAA1609					
	TSR1					
	SOGA2					
	ZNF585B					
	ZBTB32					
	CACNA1A					
	ATF4					
	RBMX					

Tabla 4. Listado de los genes en los que identificamos variantes en la familia 04, en la que priorizamos para el filtrado las variantes heredadas por vía materna.

P04					
HEATR1	ACTL6A	DLK2	MICAL2	LRRC16B	CPAMD8
LYST	HLTF	RNF217	TRIM48	RBM23	C19orf21
TAF1A	MST1	MUC12	OR10G4	ACTN1	CYP2A6
C1orf228	ZDHHC3	ZNF713	PRDX5	AMN	DKKL1
HYI	LAMB2	MUC17	TRIM48	NID2	ANGPTL6
FAM110D	SLC26A1	ZCWPW1	ZNF215	LRRK1	DUS3L
POGZ	PDGFRA	TRIM56	SIK3	TLN2	SLC13A3
IGFN1	CPZ	PKHD1L1	EXT2	PSTPIP1	C20orf85
HMCN1	UGT2B11	CDCA2	EIF2B1	C16orf88	SLCO4A1
NBPF14	PRSS12	PXDNL	GNPTAB	TCF25	NKX2-2
CD1C	BANK1	ZHX2	IFLTD1	MGRN1	CPXM1
PHACTR4	FRAS1	ZNF7	KLRB1	LOC100132247	FAM65C
KLHL17	ZNF721	LRRCC1	GXYLT1	PLEKHG4	ZNF831
SPTA1	CDC20B	RRAGA	GPR162	DNASE1L2	C20orf160
ETV3L	LCP2	C9orf172	FAM90A1	PDIA2	TMPRSS15
CCDC30	NNT	TRAF1	ULK1	C17orf101	KRTAP10-2
SLC45A3	ERAP1	GPR144	APOBEC1	SLC46A1	CYP2D6
FBXO41	ARHGEF28	ERMP1	HS6ST3	QRICH2	C22orf29
ANKRD36	CRISP1	RABEPK	DIAPH3	NPLOC4	KIAA1210
TTN	PHACTR2	SURF2	COL4A2	DNAH2	
SEPT10	ARID1B	PKN3	AHNAK2	KCNG2	
XIRP2	PAK1IP1	PAPSS2	ZBTB1	CYP2B6	
PROM2	PRDM13	USP35	RGS6	SH2D3A	
FARP2	UBR2	SLC3A2	C14orf101	PEPD	
CNTNAP5	RPS6KA2	NUP160	IRF2BPL	LONP1	
MLH1	ZNF76	AP5B1	IPO4	TRPM4	

ANEXO 4

Artículo derivado del presente trabajo.

Teresa Velayos,¹ Rosa Martínez,¹ Milagros Alonso,² Koldo Garcia-Etxebarria,³
Anibal Aguayo,¹ Cristina Camarero,² Inés Urrutia,¹ Idoia Martínez de LaPiscina,¹
Raquel Barrio,² Izortze Santin,¹ and Luis Castaño¹



An Activating Mutation in *STAT3* Results in Neonatal Diabetes Through Reduced Insulin Synthesis



Diabetes 2017;66:1022–1029 | DOI: 10.2337/db16-0867

Neonatal diabetes mellitus (NDM) is a rare form of diabetes diagnosed within the first 6 months of life. Genetic studies have allowed the identification of several genes linked to the development of NDM; however, genetic causes for ~20% of the cases remain to be clarified. Most cases of NDM involve isolated diabetes, but sometimes NDM appears in association with other pathological conditions, including autoimmune diseases. Recent reports have linked activating mutations in *STAT3* with early-onset autoimmune disorders that include diabetes of autoimmune origin, but the functional impact of *STAT3*-activating mutations have not been characterized at the pancreatic β -cell level. By using whole-exome sequencing, we identified a novel missense mutation in the binding domain of the *STAT3* protein in a patient with NDM. The functional analyses showed that the mutation results in an aberrant activation of *STAT3*, leading to deleterious downstream effects in pancreatic β -cells. The identified mutation leads to hyperinhibition of the transcription factor *Isl-1* and, consequently, to a decrease in insulin expression. These findings represent the first functional indication of a direct link between an NDM-linked activating mutation in *STAT3* and pancreatic β -cell dysfunction.

Neonatal diabetes mellitus (NDM) is a rare monogenic form of diabetes characterized by the onset of hyperglycemia within the first 6 months of life (1–3). Although one-half of the cases are transient and can eventually relapse, permanent cases of NDM require lifelong treatment

(1–3). Genetic studies have allowed the identification of several causal point mutations and chromosomal aberrations in ~20 genes implicated in β -cell development, glucose sensing and metabolism, membrane depolarization, and apoptosis (2). The most frequent cases of NDM are caused by aberrations in chromosome 6q24 and missense mutations in the K_{ATP} channel genes (e.g., *KCNJ11*, *ABCC8*) and the insulin gene, but still, genetic causes of at least 20% of NDM cases remain to be clarified (3).

Most cases of NDM involve isolated diabetes, but sometimes NDM appears in association with other pathological conditions, including early-onset autoimmune diseases (4). The most common of these conditions is immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome, which is caused by mutations in the *FOXP3* gene (5,6). More recently, activating mutations in the transcription factor *STAT3* have been linked to the development of early-onset autoimmune disorder and to isolated permanent NDM with autoimmune etiology (7). *STAT3* is a latent transcription factor activated by extracellular signaling ligands, such as cytokines, growth factors, and hormones (8,9). This transducer becomes activated in the cytoplasm by Janus kinases to regulate diverse biological functions, including cell differentiation, proliferation, apoptosis, and inflammation (8,9). *STAT3* can act as a transcriptional activator or inhibitor by interacting with other transcription factors and/or coactivators/corepressors, depending on the target promoter (10). In the pancreas, *STAT3* signaling is required for the correct development and maintenance of endocrine pancreas

¹Endocrinology and Diabetes Research Group, Hospital Universitario Cruces, BioCruces Health Research Institute, CIBERDEM, CIBERER, UPV-EHU, Barakaldo, Spain

²Pediatrics Endocrinology, Ramon y Cajal University Hospital, Madrid, Spain

³Immunogenetics Research Laboratory, Department of Genetics, Physical Anthropology and Animal Physiology, BioCruces Health Research Institute, UPV-EHU, Leioa, Spain

Corresponding author: Luis Castaño, luisantonio.castanogonzalez@osakidetza.eus, and Izortze Santin, izortze.santingomez@osakidetza.eus.

Received 15 July 2016 and accepted 5 January 2017.

This article contains Supplementary Data online at <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/db16-0867/-/DC1>.

© 2017 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. More information is available at <http://www.diabetesjournals.org/content/license>.

(11). In addition, leptin-induced activation of STAT3 plays a crucial role in inhibiting insulin secretion in mice (12).

We identified by whole-exome sequencing (WES) a novel activating mutation in the *STAT3* gene linked to NDM among other autoimmune pathologies. The functional data reveal that the identified mutation in *STAT3* dysregulates insulin synthesis through inhibition of the transcriptional regulator insulin gene enhancer binding protein, factor 1 (*Isl-1*). Although activating mutations in *STAT3* have been described to lead to early autoimmunity by impairing T-cell development (13), this functional indication is the first of a direct link between an NDM-linked activating mutation in *STAT3* and pancreatic β -cell dysfunction.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Study Participants and Ethics Statement

For WES, we selected a female patient with NDM with detectable islet autoantibodies at the age of 3 months. This patient, whose clinical case has been previously described (14), presented neonatal hypothyroidism with positive thyroid autoantibodies at birth. Watery diarrhea developed in the patient at the age of 13 months, and she was given a diagnosis of celiac disease (positive gliadin autoantibodies and partial duodenal atrophy). Her subsequent course was frequently marked by episodes of watery diarrhea without blood or mucous. The celiac disease diagnosis was corrected to collagenous gastritis and colitis at the age of 15 years. The patient had an appropriate growth rate until age 4 years that remarkably decreased over time, with a final height SD score of -3 . Initial genetic testing by Sanger sequencing excluded potential damaging mutations in the *KCNJ11*, *ABCC8*, and *INS* genes. Genomic DNA of the patient was extracted from whole blood by using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). The study was approved by the local ethics committee (Cruces University Hospital, Barakaldo, Spain), and written informed consent was obtained from the patient's parents.

WES

Exome enrichment was carried out by using the Nextera Rapid Capture Expanded Exome Enrichment kit followed by high-throughput next-generation sequencing in a HiScanSQ (Illumina, San Diego, CA) to generate WES in 75-base pair (bp) paired-end reads. Sequence reads were mapped to the reference human genome (UCSC GRCh37/hg19) by using the WES pipeline Web tool (15). The same Web tool was used for duplicate removal, base quality recalibrations, single nucleotide polymorphism (SNP) and deletion/insertion polymorphism calling, and annotation. Variants were filtered by the following quality criteria: coverage ≥ 10 , ambiguously mapped reads ≥ 5 , quality ≥ 50 , variant confidence ≥ 1.5 , and strand bias ≤ 60 . To find potential etiological variants, we filtered out all variants located outside exonic regions, synonymous variants, and variants with a minor allele frequency > 0.05 . In addition, we followed a de novo

prioritization strategy and excluded all inherited variants on the basis of WES of both parents. Evaluation of the possible functional significance of the identified mutations was performed with prediction software, including SIFT, PolyPhen-2, and MutationTaster. The candidate variant (p.P330S) identified by WES in the *STAT3* gene (NM_139276) was confirmed by Sanger sequencing.

Culture of INS-1E and EndoC- β H Cells and Cytokine Treatment

The rat INS-1E cell line was cultured in RPMI medium as previously described (16). The same medium but without antibiotics was used for transfection experiments. The EndoC- β H1 cell line (provided by R. Scharfmann, University of Paris) was cultured in DMEM as previously described (17). The same medium but with 1% FBS and without BSA and antibiotics was used for transfection experiments. INS-1E cells were treated with rat IL-6 (R&D Systems, Abingdon, U.K.) at a concentration of 20 ng/mL for 12 h.

Expression Plasmids

Expression plasmid with the identified mutation (P330S) was generated by using an overexpression plasmid containing the wild-type (WT) *STAT3* cDNA (OriGene Technologies, Rockville, MD), and mutation was introduced by using the QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

Transfection Experiments and Luciferase Reporter Assay

Empty, WT, or mutant *STAT3* plasmids were transfected into INS-1E or EndoC- β H1 cells by using Lipofectamine 2000 lipid reagent (Thermo Fisher Scientific, Chicago, IL) (18). For *STAT3* luciferase studies, INS-1E cells were cotransfected with 200 ng *STAT3*-responsive dual firefly/*Renilla* luciferase Signal Reporter (QIAGEN). After 24 h, cells were left untreated or treated with IL-6 (20 ng/mL) for 12 h, and luciferase activities were assayed by using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI).

Western Blot and Real-Time PCR

Protein expression was evaluated by Western blot by using antibodies that target total *STAT3* (sc-482; Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX), phospho-*STAT3* (#9507; Cell Signaling, Danvers, MA), *Isl-1* (sc-390793; Santa Cruz Biotechnologies), insulin (#8138; Cell Signaling), and α -tubulin (T9026; Sigma-Aldrich) (used as loading control). Immunoreactive bands were revealed by using the SuperSignal West Femto chemiluminescent substrate (Thermo Fisher Scientific) and detected by using a Molecular Imager ChemiDoc XRS+ System with ImageLab Software (Bio-Rad, Hercules, CA).

RNA extraction was performed by using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN), and cDNA was synthesized with the QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN). Expression of *Isl-1*, *PAX6*, *LMX1A*, rat *INS-1* and *INS-2*, and human *INS* was assayed by real-time PCR by using

TaqManGene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific) in an Eco Real Time PCR machine (Illumina). Expression values were corrected for the housekeeping genes GAPDH (rat) or β -actin (human) and for *STAT3* expression to control for differences in transfection efficiency.

Chromatin Immunoprecipitation Assay

WT and mutant *STAT3*-transfected cell extracts were precleared by a 1-h incubation with protein A/herring sperm DNA at 4°C. Samples were incubated overnight at 4°C with BSA-blocked protein A and anti-*STAT3* antibody (Santa Cruz Biotechnologies) or rabbit anti-IgG antibody (Abcam, Cambridge, U.K.) as negative control. Samples were then eluted, proteinase K treated, and incubated for 3 h at 62°C in high-salt solution to reverse the cross-link reaction. DNA fragments were analyzed by quantitative PCR, and input DNA was analyzed simultaneously for normalization. Quantitative PCR was performed by using SYBR Green (Bio-Rad) with the following primer pair for the *STAT3* binding site –1262 to –1143 bp of the rat *Isl-1* promoter: 5'-CTCAGAAAGACGGTAGATTT-3' and 5'-AGCTTTCTAATTTGTTCC-3'.

Insulin Release Assay

For determination of insulin release, INS-1E cells and EndoC- β H1 were incubated for 1 h in glucose-free RPMI GlutaMAX-I medium and HEPES-buffered Krebs-Ringer solution, respectively. INS-1E cells were then incubated for 30 min in Krebs-Ringer solution supplemented with 1.67 mmol/L glucose, 16.7 mmol/L glucose, or 16.7 mmol/L glucose + 10 μ mol/L forskolin, and EndoC- β H1 cells were incubated for 1 h in Krebs-Ringer solution with 0 mmol/L glucose, 20 mmol/L glucose, or 20 mmol/L glucose + 45 μ mol/L isobutylmethylxanthine (IBMX). Results were normalized by the insulin content measured in lysed cells and by *STAT3* expression to control for differences in transfection efficiency. Insulin accumulation in the medium of INS-1E cells and EndoC- β H1 cells was measured by rat and human insulin ELISA kit (Merckodia, Uppsala, Sweden), respectively. Total protein was measured in cell lysates with a BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions.

RESULTS AND DISCUSSION

WES Identifies a Missense Mutation in *STAT3* Linked to NDM

After filtering for quality control parameters, 64,951 targeted DNA variants from the reference human genome sequence UCSC GRCh37/hg19 were identified by WES in a patient with NDM (Table 1). Comparison with the public database Single Nucleotide Polymorphism database (dbSNP135) and the 1000 Genomes Project revealed that of 7,473 nonsynonymous exonic variants, 1,286 were novel (i.e., not previously annotated). By following a de novo strategy, we identified 21 noninherited variants present in the affected proband and absent in both parents. We next performed

Table 1—Number and characteristics of identified variants through the WES analysis of a patient with NDM

	Index	Mother	Father
All identified variants (raw data)	316,186	284,847	274,380
Variants fulfilling quality parameters	64,951	60,496	56,722
Located in exonic regions	16,413	16,120	15,621
Nonsynonymous variants	7,473	7,332	7,101
Nonannotated variants (based on 1000 Genomes Project and dbSNP135) and MAF <0.05	1,286	1,298	1,412
Noninherited variants	21	—	—
Predicted to be deleterious	4	—	—

MAF, minor allele frequency.

an in silico prediction analysis and observed that 4 of the 21 mutations had a potential deleterious effect. The potentially deleterious mutations were located in *STAT3*, *LGR4* (leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 4), *PTPN21* (protein tyrosine phosphatase, nonreceptor type 21), and *MEX3B* (Mex-3 RNA binding family member B) genes. Finally, to identify potential etiological variants, a bibliographic search in PubMed was performed to assess whether the identified genes were related to an interesting function for the pathogenesis of the disease (i.e., β -cell function, pancreas development, β -cell differentiation).

We finally ended up with a candidate mutation in *STAT3*, a heterozygous C to T transition in exon 10 of the *STAT3* gene at position 988 of the coding DNA sequence predicted to replace a proline with a serine residue at position 330 (c.988C>T; p.Pro330Ser). The mutation was validated by Sanger sequencing in the proband and excluded in both parents. The identified variant is located at the DNA binding domain of the *STAT3* protein (Fig. 1A), where genetic variants have been reported in patients with early-onset multiorgan autoimmune disease and lymphoproliferation (13,19,20). A comparison across species showed that Pro330 and the surrounding region is highly conserved and suggested potential pathogenicity of the identified mutation (Fig. 1B). Genetic alterations in the DNA binding domain of *STAT3* have been shown to provoke anomalous activation of the transcription factor, resulting in downstream effects in the expression of its target genes. Thus, gain-of-function mutations in *STAT3* lead to increased *SOCS3* expression, a major downstream target of *STAT3* (13).

The Identified *STAT3* Mutation Leads to Increased *STAT3* Activity but Does Not Affect *STAT3* Phosphorylation

The transcription factor *STAT3* is activated by phosphorylation at tyrosine 705, which induces dimerization, nuclear translocation, and DNA binding (21). Phosphorylation changes in some serine residues of the *STAT3*

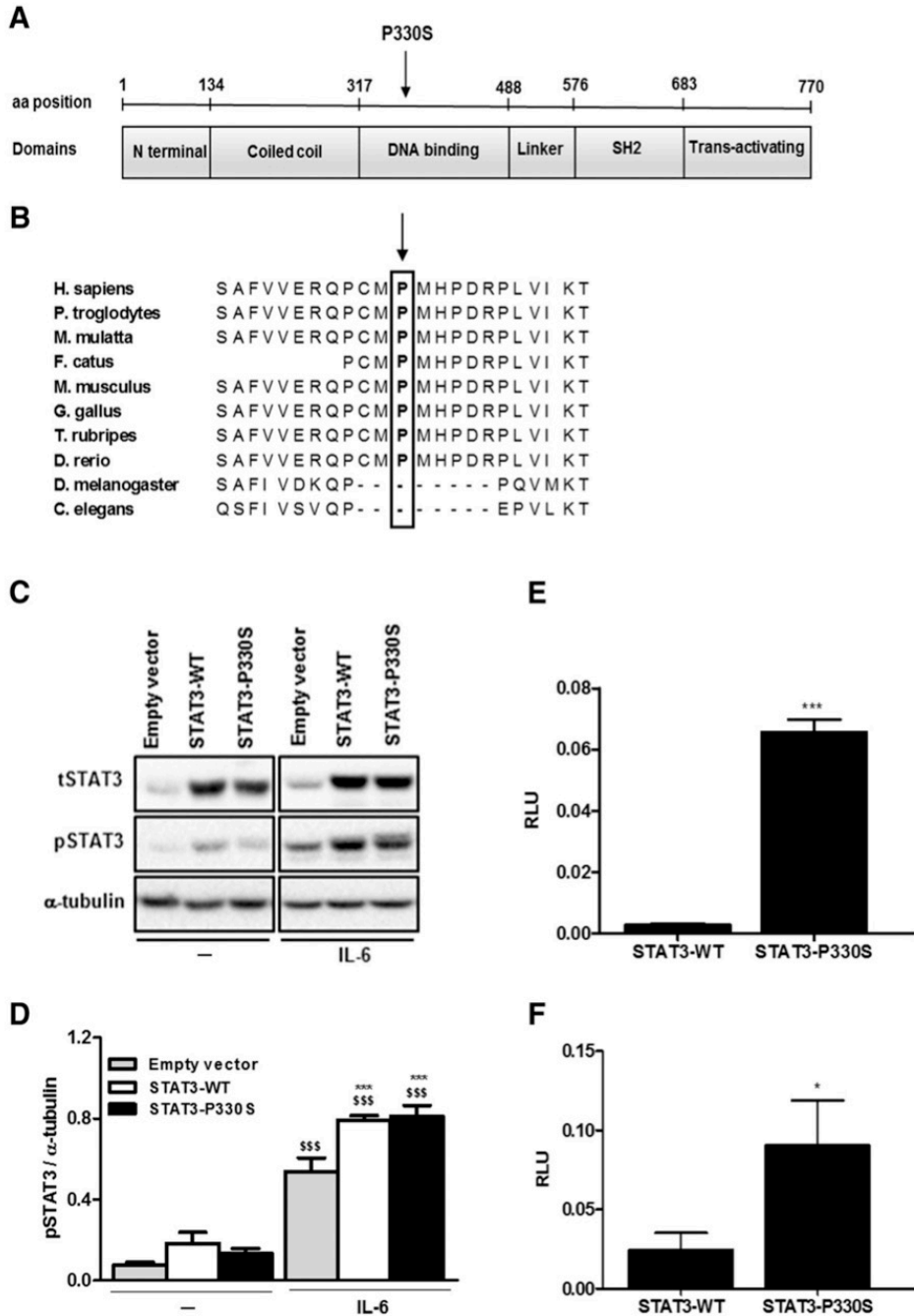


Figure 1—A missense mutation in the STAT3 DNA binding domain is linked to NDM and leads to increased STAT3 transcriptional activity without affecting its phosphorylation. *A*: Schematic representation of the human STAT3 protein structure. A de novo mutation (P330S) identified in one individual with NDM is located in the DNA binding domain. *B*: Alignment of the multiple STAT3 protein sequences across species. The altered amino acid (P330) is highly evolutionarily conserved among species. *C* and *D*: INS-1E cells were transfected with an empty plasmid (empty vector) or transfected with a plasmid encoding the human STAT3-WT or the mutant STAT3 (STAT3-P330S). Cells were left untreated (–) or treated with recombinant IL-6 (20 ng/mL) for 12 h. Total and phosphorylated STAT3 expression was analyzed by Western blot, and α -tubulin was used as the loading control. The results are representative of three independent experiments (*C*), and

protein have been shown to affect the phosphorylation state of tyrosine 705, eventually affecting its activation (22). The newly identified mutation in STAT3 led to a change from a nonphosphorylatable amino acid (proline) to a phosphorylatable amino acid (serine), creating a potential phosphorylation site that might affect the phosphorylation state and activation of STAT3.

Under basal and IL-6 treatment conditions, endogenous levels of total STAT3 protein were very low compared with cells transfected with plasmids overexpressing WT and mutant STAT3 (Fig. 1C). Under the nontreated condition, phosphorylation of STAT3 was insignificant in all conditions and did not differ between WT and mutant STAT3-transfected cells (Fig. 1C and D). Treatment with IL-6 (20 ng/mL) led to an increase in STAT3 phosphorylation in all experimental conditions, but phosphorylation levels did not differ between WT and mutant STAT3-transfected cells (Fig. 1C and D). These results show that P330S mutation does not affect the phosphorylation status of STAT3 either in the basal condition or under IL-6 treatment.

In nontreated cells, STAT3 mutation resulted in an increase in reporter activity by ~23-fold compared with WT STAT3 (Fig. 1E). Overexpression of the mutant STAT3 in INS-1E cells also resulted in increased reporter activity relative to WT after stimulation with IL-6 for 12 h; however, the increase was less pronounced than in the basal condition (~3.8-fold) (Fig. 1F).

These results demonstrate that the P330S mutation induces a constitutive hyperactivation of STAT3 and suggest that independently of its phosphorylation status, the mutant STAT3 has an increased DNA binding capacity that leads to enhanced transcriptional activity. These results are in line with previous studies in which polyautoimmune syndrome-related missense mutations in the DNA binding domain of STAT3 have been shown to significantly increase STAT3 activity (7). Other missense mutations located in the SH2 domain or in the transactivation domain of STAT3 also lead to a less marked increased STAT3 activity (7). Of note, inactivating mutations in the DNA binding domain of STAT3 have been identified in patients with hyper-IgE syndrome (23). Although molecular modeling of mutations located in the SH2 domain of the STAT3 protein suggest that alterations in this domain are likely to result in enhanced DNA binding affinity because of increased electrostatic interaction with the DNA backbone (7), the exact mechanism by which activating mutations in the binding domain lead to enhanced transcriptional activity remains to be clarified.

The Activating STAT3 Mutation Results in Decreased Insulin Synthesis Through Inhibition of Isl-1 Expression

The STAT molecules participate in the regulation of T-cell differentiation and play a crucial role in cytokine signaling (24). Consequently, mutations in STAT genes lead to various but overlapping phenotypes, ranging from susceptibility to infections to multiorgan autoimmunity (7,13,19,20,23).

By taking into account that STAT3 plays a crucial role in basal β -cell functions, such as regulation of insulin secretion (11,12), we evaluated the possible impact of the identified mutation at the pancreatic β -cell level. Insulin secretion is regulated by several transcription factors, such as Pax4, Nkx6.1, Maf, Foxa, Pdx1, and Isl-1, most of which are required for pancreatic development and basal β -cell functions (25). Bioinformatic prediction of potential transcription factor binding sites revealed that three transcription factors known to regulate insulin expression harbor transcription factor binding sites for STAT3 in their promoters (Isl-1, PAX6, and LMX1A). We examined the effect of the identified STAT3-activating mutation in the endogenous expression of Isl-1, PAX6, and LMX1A in rat and human pancreatic β -cells. To this aim, Isl-1, PAX6, and LMX1A mRNA expression was analyzed in WT and mutant STAT3-transfected rat and human β -cells. Although expression of PAX6 and LMX1A did not differ between WT and mutant STAT3-transfected β -cells (Supplementary Fig. 1), Isl-1 mRNA expression was decreased by 75% and 32% in mutant STAT3 rat and human β -cells, respectively (Fig. 2A and D). As shown in Fig. 2F, reduced Isl-1 expression was confirmed at the protein level in both mutant STAT3 rat and human β -cells.

The transcription factor Isl-1 is expressed in all four principal cell types of the endocrine pancreas and has been shown to regulate expression of insulin in pancreatic β -cells. In French Caucasian morbidly obese individuals, one SNP in the Isl-1 gene might modulate the risk for type 2 diabetes and increase body weight (26). Of note, STAT3 is implicated in the transcriptional regulation of Isl-1, and in rodent pancreatic β -cells, leptin-induced STAT3 phosphorylation has been shown to lead to decreased Isl-1 activity and reduced insulin expression (12). To assess whether STAT3 mutant-triggered Isl-1 inhibition leads to a decrease in insulin expression, we examined insulin mRNA expression in WT and mutant STAT3-transfected pancreatic β -cells. Expression of INS-1 and INS-2 was decreased in STAT3 mutant rat cells by ~70% (Fig. 2B and C), whereas human INS was decreased

densitometry data (D) are mean \pm SEM. \$\$\$P < 0.001 vs. nontreated (-) and transfected with the same plasmid; ***P < 0.001 vs. empty vector treated with IL-6; Student *t* test followed by Bonferroni correction. E and F: Cells were transfected as in C and cotransfected with a STAT3-responsive luciferase plus a constitutively expressing *Renilla* construct (used as internal control). After 24 h of recovery, cells were left untreated (E) or treated (F) with IL-6 (20 ng/mL) for 12 h, and luciferase activity was measured. Data are mean \pm SEM of six independent experiments shown as relative luciferase units (RLUs). ***P < 0.001; *P < 0.05 vs. STAT3-WT-transfected cells; Student *t* test. aa, amino acid.

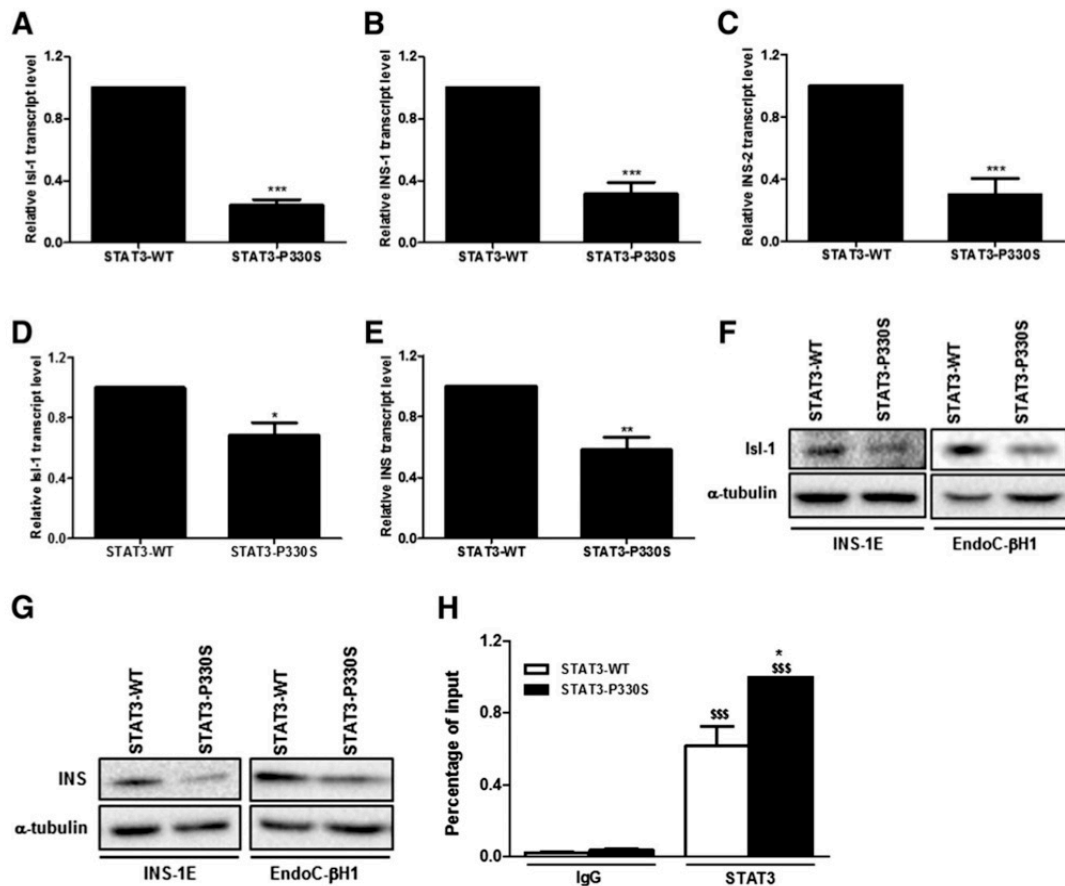


Figure 2—Activating mutation in STAT3 decreases Isl-1 and insulin expression in rat and human pancreatic β -cells by increasing STAT3 ability to bind to the Isl-1 promoter. INS-1E and EndoC- β H1 cells were transfected with a plasmid encoding the human STAT3-WT or the mutant STAT3 (STAT3-P330S). After 36 h of recovery, mRNA expression of rat Isl-1 (A), INS-1 (B), INS-2 (C), or human Isl-1 (D) and INS (E) was assayed by real-time PCR and normalized for the housekeeping gene GAPDH (A–C) or β -actin (D and E) and for STAT3 expression to control for differences in transfection efficiency. Data are mean \pm SEM of four (A–C) and six (D and E) independent experiments. *** P < 0.001, ** P < 0.005, * P < 0.05 vs. STAT3-WT; Student t test. F and G: Isl-1 and INS protein expression in STAT3-WT- and STAT3-P330S-transfected INS-1E and EndoC- β H1 cells was analyzed by Western blot, and α -tubulin was used as the loading control. H: ChIP analysis revealed an increased ability of mutant STAT3 to bind to the Isl-1 promoter region in positions $-1,262$ to $-1,143$ bp (previously shown to be a transcription factor binding site for STAT3 in mouse [12]). IgG antibody was used as a negative control. Data are mean \pm SEM of four independent experiments shown as percentage of input. * P < 0.05 vs. STAT3-WT-transfected cells; \$\$\$ P < 0.001 vs. IgG and transfected with the same plasmid; ANOVA followed by Student t test with Bonferroni correction.

by 42% in mutant STAT3-transfected human β -cells compared with WT cells (Fig. 2E). Decreased insulin mRNA expression in mutant STAT3 rat and human β -cells was confirmed at the protein level by Western blot (Fig. 2G). To determine whether mutant STAT3 had an increased ability to bind the Isl-1 promoter, we performed a quantitative chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis. INS-1E cells were transfected with WT- or mutant STAT3-overexpressing plasmids, and by using DNA fragments precipitated with anti-STAT3 as templates, the Isl-1 promoter region in positions $-1,262$ to $-1,143$ bp (previously shown to be a transcription factor binding site for STAT3 in mouse

[12]) was amplified with quantitative PCR. As shown in Fig. 2H, mutant STAT3 showed an increased ability to bind to the Isl-1 promoter region compared with the WT STAT3 protein.

To determine whether mutant STAT3 cause impaired insulin secretion, we analyzed glucose-stimulated insulin secretion in WT and mutant STAT3-transfected rat and human β -cells. As shown in Fig. 3A, in WT STAT3-transfected INS-1E cells, high-glucose (16.7 mmol/L) and high-glucose + forskolin exposure increased insulin secretion by nearly two- and fivefold, respectively. In mutant STAT3 cells, glucose-stimulated insulin secretion was

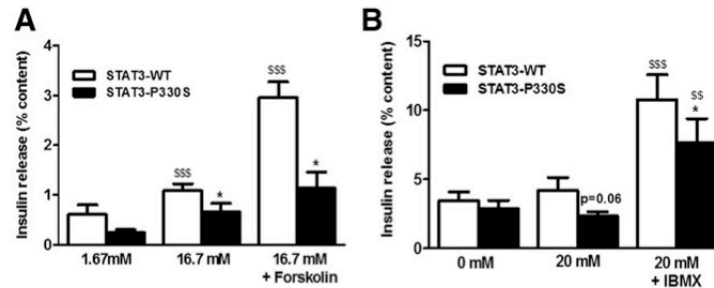


Figure 3—Mutant STAT3 reduces glucose-stimulated insulin secretion in rat and human pancreatic β -cells. INS-1E (A) and EndoC- β H1 (B) cells were transfected with a plasmid encoding the human STAT3-WT or the mutant STAT3 (STAT3-P330S). After 36 h of recovery, glucose-stimulated insulin secretion was measured after stimulation with 1.67 mmol/L glucose, 16.7 mmol/L glucose, or 16.7 mmol/L glucose + 10 μ mol/L forskolin in INS-1E cells (A) or 0 mmol/L glucose, 20 mmol/L glucose, or 20 mmol/L glucose + 45 μ mol/L IBMX in EndoC- β H1 cells (B). Insulin release values were normalized for STAT3 expression to control for differences in transfection efficiency and are represented as percentage of insulin content. Data are mean \pm SEM of five to six independent experiments. * P < 0.05 vs. STAT3-WT-transfected cells under the same stimulation condition; \$\$\$ P < 0.001 and \$\$ P < 0.01 vs. 1.67 mmol/L glucose (A) or 0 mmol/L glucose (B) stimulation and transfected with the same plasmid; ANOVA followed by Student t test with Bonferroni correction.

decreased by \sim 60% in the low-glucose and high-glucose + forskolin conditions and by 40% in the high-glucose condition compared with WT STAT3-transfected cells (Fig. 3A). These results were confirmed in the human pancreatic β -cell line EndoC- β H1 in which overexpression of mutant STAT3 led to a decrease in glucose-stimulated insulin secretion compared with WT cells (Fig. 3B). Total insulin content measured by ELISA in cell lysates showed that mutant STAT3 overexpression decreased intracellular insulin content compared with WT cells (Supplementary Fig. 2), further confirming the results obtained by insulin protein determination by Western blot (Fig. 2G). In line with the results obtained by insulin mRNA expression analysis, the decrease in insulin protein content in mutant STAT3-transfected cells was more pronounced in rat β -cells than in human β -cells.

These results showed that P330S mutation in STAT3 leads to decreased insulin synthesis in pancreatic β -cells through enhanced inhibition of the transcription factor Isl-1. Although we have not observed an effect of mutant STAT3 on β -cell viability (data not shown), we cannot exclude other potential impacts of hyperactive STAT3 at the pancreatic β -cell level. Indeed, constitutive STAT3 activation has been linked to dysregulation of the cell cycle control and apoptosis genes in other cell types (27). At the pancreas level, STAT3 modulates the β -cell cycle and protects β -cells from DNA damage (28), and β -cell-specific STAT3 knockout mice exhibit insulin secretory defects and impaired pancreatic islet architecture (29).

Although STAT3 gain-of-function mutations have been shown to lead to early-onset autoimmunity by affecting regulation of immune-related cells (7,13,19,20), the current findings demonstrate that activating mutations in STAT3 affect insulin secretion and may thus explain pancreatic β -cell dysfunction in some forms of diabetes, including NDM. These results suggest, therefore, that

activating mutations in the STAT3 gene can result in NDM because of two contrasting mechanisms: through dysregulation of immune-related cells or through dysfunction of basal pancreatic β -cell function.

Acknowledgments. The authors thank J.R. Bilbao, from the Immunogenetics Research Laboratory, BioCruces Research Institute, UPV-EHU, for help and advice in the analysis of expression data; A. Castellanos-Rubio, from the Immunogenetics Research Laboratory, BioCruces Research Institute, UPV-EHU, for advice in ChIP experiments; and A.M. Aransay, from the Genome Analysis Platform, CIC bioGUNE, for the use of the sonicator.

Funding. This work was supported by Instituto de Salud Carlos III PI14/01104, integrated into the State Plan for Research and Development 2013–2016 and cofinanced by the European Regional Development Fund. T.V. is the recipient of a predoctoral fellowship from the University of the Basque Country (IF/UPV/12/135).

Duality of Interest. No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

Author Contributions. T.V. and I.S. contributed to the general idea and design of experiments, researched data, contributed to the discussion, and wrote, revised, and edited the manuscript. R.M., K.G.-E., I.U., and I.M.d.L. researched data and revised and edited the manuscript. M.A., A.A., C.C., R.B., and L.C. contributed to the original idea, contributed to the discussion, and revised and edited the manuscript. I.S. and L.C. are the guarantors of this work and, as such, had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

References

- Vaxillaire M, Bonnefond A, Froguel P. Breakthroughs in monogenic diabetes genetics: from pediatric forms to young adulthood diabetes. *Pediatr Endocrinol Rev* 2009;6:405–417
- Murphy R, Eillard S, Hattersley AT. Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic β -cell diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008;4:200–213
- Naylor RN, Greeley SA, Bell GI, Philipson LH. Genetics and pathophysiology of neonatal diabetes mellitus. *J Diabetes Investig* 2011;2:158–169
- Polak M, Cavé H. Neonatal diabetes mellitus: a disease linked to multiple mechanisms. *Orphanet J Rare Dis* 2007;2:12–23

5. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27:20–21
6. Verbsky JW, Chatila TA. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) and IPEX-related disorders: an evolving web of heritable autoimmune diseases. *Curr Opin Pediatr* 2013;25:708–714
7. Flanagan SE, Haapaniemi E, Russell MA, et al. Activating germline mutations in STAT3 cause early-onset multi-organ autoimmune disease. *Nat Genet* 2014;46:812–814
8. Levy DE, Darnell JE Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:651–662
9. Abroun S, Saki N, Ahmadvand M, Asghari F, Salari F, Rahim F. STATs: an old story, yet mesmerizing. *Cell J* 2015;17:395–411
10. Caldenhoven E, van Dijk TB, Solari R, et al. STAT3 β , a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J Biol Chem* 1996;271:13221–13227
11. Kostromina E, Gustavsson N, Wang X, et al. Glucose intolerance and impaired insulin secretion in pancreas-specific signal transducer and activator of transcription-3 knockout mice are associated with microvascular alterations in the pancreas. *Endocrinology* 2010;151:2050–2059
12. Chen J, Fu R, Cui Y, et al. LIM-homeodomain transcription factor Isl-1 mediates the effect of leptin on insulin secretion in mice. *J Biol Chem* 2013;288:12395–12405
13. Milner JD, Vogel TP, Forbes L, et al. Early-onset lymphoproliferation and autoimmunity caused by germline STAT3 gain-of-function mutations. *Blood* 2015;125:591–599
14. Camarero C, Leon F, Colino E, et al. Collagenous colitis in children: clinicopathologic, microbiologic, and immunologic features. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;37:508–513
15. D'Antonio M, D'Onorio De Meo P, Paoletti D, et al. WEP: a high-performance analysis pipeline for whole-exome data. *BMC Bioinformatics* 2013;14(Suppl. 7):S11
16. Ortis F, Cardozo AK, Crispim D, Störling J, Mandrup-Poulsen T, Eizirik DL. Cytokine-induced proapoptotic gene expression in insulin-producing cells is related to rapid, sustained, and nonoscillatory nuclear factor- κ B activation. *Mol Endocrinol* 2006;20:1867–1879
17. Ravassard P, Hazhouz Y, Pechberty S, et al. A genetically engineered human pancreatic β cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *J Clin Invest* 2011;121:3589–3597
18. Marroquí L, Santin I, Dos Santos RS, Marselli L, Marchetti P, Eizirik DL. BACH2, a candidate risk gene for type 1 diabetes, regulates apoptosis in pancreatic β -cells via JNK1 modulation and crosstalk with the candidate gene PTPN2. *Diabetes* 2014;63:2516–2527
19. Haapaniemi EM, Kaustio M, Rajala HL, et al. Autoimmunity, hypogammaglobulinemia, lymphoproliferation, and mycobacterial disease in patients with activating mutations in STAT3. *Blood* 2015;125:639–648
20. Wienke J, Janssen W, Scholman R, et al. A novel human STAT3 mutation presents with autoimmunity involving Th17 hyperactivation. *Oncotarget* 2015;6:20037–20042
21. Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994;264:1415–1421
22. Decker T, Kovarik P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 2000;19:2628–2637
23. Holland SM, DeLeo FR, Elloumi HZ, et al. STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome. *N Engl J Med* 2007;357:1608–1619
24. O'Shea JJ, Plenge R. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity* 2012;36:542–550
25. Oliver-Krasinski JM, Stoffers DA. On the origin of the β cell. *Genes Dev* 2008;22:1998–2021
26. Barat-Houari M, Clément K, Vatin V, et al. Positional candidate gene analysis of Lim domain homeobox gene (Isl-1) on chromosome 5q11-q13 in a French morbidly obese population suggests indication for association with type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:1640–1643
27. Al Zaid Siddiquee K, Turkson J. STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors. *Cell Res* 2008;18:254–267
28. Pan Y, Li G, Zhong H, et al. RIG-I inhibits pancreatic β cell proliferation through competitive binding of activated Src. *Sci Rep* 2016;6:28914
29. Gorogawa S, Fujitani Y, Kaneto H, et al. Insulin secretory defects and impaired islet architecture in pancreatic beta-cell-specific STAT3 knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;319:1159–1170

