

DEPARTAMENT DE MEDICINA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

***BASES MOLECULARS DE LA DIABETIS TIPUS 2:
DETERMINANTS GENÈTICS DE L'AMILINA***

***Memòria presentada per Isabel Rojas i Fernandez per
optar al grau de Doctor en Medicina i Cirurgia***

Barcelona, 2001

Vist i plau del Director de la Tesi:

Dr Ramon Gomis de Barberà

Cap de Servei

Departament d'Endocrinologia i Nutrició

Hospital Clínic de Barcelona

Vist i plau del Codirector de la Tesi:

Dra Anna Novials Sardà

Cap de Servei

Centre de Diabetologia

Fundació Sardà Farriol

La doctorand:

Isabel Rojas i Fernandez

Agraïments
Abreviatures vii

Introducció teòrica 1

1.- Bases genètiques de la DM tipus 2. Estudi de gens candidats
en el desenvolupament de la DM tipus 2 3

1.1- Gen de la insulina 3

1.2- Gen del receptor de la insulina 4

1.3- Gen del substrat del receptor insulínic-1 (IRS-1) 5

1.4- Gens dels transportadors de glucosa: Glut-1, Glut-2, Glut-4 6

1.5- Síndromes MODY 6

1.5.1- MODY-1: HNF-4 α 9

1.5.2- MODY-2: Glucocinasa 10

1.5.3- MODY-3: HNF-1 α 14

1.5.4- MODY-4: IPF-1 (PDX-1) 16

1.5.5- MODY-5: HNF-1 β 17

1.5.6- Altres gens MODY 18

1.6- Gen del receptor de GLP-1 19

1.7- Gen del receptor del glucagó 20

1.8- Gen de la prohormona convertasa 2 (PC2) 20

1.9- Gen de la sintasa del glicogen 21

1.10- Gen Isl-1 21

1.11- Gen de la GDHm 22

1.12- ADN mitocondrial 23

1.13- Gen del receptor adrenèrgic β_3 29

1.14- Gen MAPK8IP1 30

1.15- Gen PPAR- γ 30

1.16- Gen RAD (Ras associat a diabetis)	31
1.17- Gen del receptor 1 de sulfanilurees (SUR.1)	32
1.18- Gen CAPN10	32
1.19- Gen de l'amilina	33

2.- Amiloide i diabetis tipus 2

2.1- Història i terminologia	34
2.2- Amiloide i amiloïdosis	34
2.3- Amiloide i diabetis tipus 2	37
2.4- Amiloide i amilina	39
2.4.1- Estructura de l'amilina humana	39
2.4.2- Estructura del gen de l'amilina	41
2.4.3- Estructura de la regió promotora del gen de l'amilina	43
2.4.4- Localització i expressió de l'amilina	45
2.4.4.1- Expressió en el pàncrees endocrí	45
2.4.4.2- Expressió en tumors neuroendocrins i en línies cel·lulars	47
2.4.4.3- Expressió en teixits no pancreàtics	48
2.4.5- Secreció de l'amilina	49
2.5- Altres components de l'amiloide pancreàtic	52
2.6- Mecanisme de formació d'amiloide en els illots pancreàtics	55
2.6.1- Capacitat amiloidogènica de l'amilina	55
2.6.2- Defectes genètics i hipersecreció de l'amilina	57
2.6.3- Localització dels dipòsits d'amiloide en el pàncrees	58
2.6.4- És l'amiloide pancreàtic un component precoç o tardà de la DM tipus 2?	59
2.6.5- Alteracions del processament i secreció de l'amilina	63
2.6.6- Implicació d'una dieta rica en greixos	65

2.7-	Citotoxicitat de l'amilina humana	66
2.8-	Accions biològiques de l'amilina	68
2.8.1-	Efecte en el metabolisme de la glucosa	69
2.8.2-	Efecte en la secreció d'insulina	70
2.8.3-	Efecte en la secreció de glucagó	71
2.8.4-	Efecte en el tracte gastrointestinal	72
2.8.4.1-	Retardament del buidament gàstric	72
2.8.4.2-	Efecte en la secreció àcida gàstrica	72
2.8.5-	Efecte en el control de la ingesta	73
2.8.6-	Efectes renals	73
2.8.7-	Efectes en el metabolisme del calci	74
2.8.8-	Efectes en el sistema cardiovascular	74
2.9-	Potencials perspectives terapèutiques	75
2.9.1-	Tractament amb anàlegs de l'amilina	75
2.9.2-	Inhibició del procés d'amiloidogènesi	75
2.9.2.1-	Inhibició de la producció d'amilina	76
2.9.2.2-	Inhibició de la formació de fibres d'amiloides	77
	Hipòtesi de treball	78
	Objectius	81
	Pacients i mètodes	83
1.-	Pacients	84
1.1-	Estudi de pacients amb DM tipus 2 i controls sans	84
1.2-	Estudi de pacients amb diabetis gestacional i controls gestants	85
1.3-	Estudi familiar	87

2.- Determinacions bioquímiques i hormonals	87
3.- Estudi de l'ADN	89
3.1- Extracció de l'ADN genòmic	89
3.2- Amplificació per PCR	91
3.2.1- Amplificació de la regió promotora	92
3.2.2- Amplificació dels exons 1, 2 i 3	94
3.2.3- Electroforesi de l'ADN en gel d'agarosa	95
3.3- Anàlisi de polimorfismes	98
3.4- Purificació de fragments d'ADN a partir de gels d'agarosa	101
3.5- PCR de seqüenciació	103
4.- Estudi de l'activitat del promotor	104
4.1- Construccions plasmídiques	104
4.2- Cultius cel·lulars	107
4.3- Transfeccions cel·lulars	107
4.4- Estudi d'activadors i inhibidors de l'activitat del promotor	108
5.- Anàlisi estadística	108
Resultats	110
1.-Estudi dels exons 1, 2 i 3 del gen de l'amilina	111
1.1- Identificació de polimorfismes en el gen de l'amilina	111
1.1.1- Exó 1	111
1.1.2- Exó 2	112
1.1.3- Exó 3	114
1.2- Caracterització clínica dels pacients amb el polimorfisme C79A	116
2.-Estudi de la regió promotora del gen de l'amilina	120
2.1- Anàlisi conformacional de cadena senzilla i seqüenciació de l'ADN	120

2.2-	Estudi de les concentracions plasmàtiques d'amilina, ALP i insulina....	127
2.3-	Increment de les concentracions d'amilina, ALP i IRI en la PTOG	130
3.-	Estudi de l'activitat del promotor de l'amilina	134
3.1-	Estudi de l'efecte de la mutació G→A	134
3.2-	Efecte de la glucosa en l'activitat del promotor	135
3.3-	Efecte del calci en l'activitat del promotor	137
3.4-	Efecte de l'AMP cíclic en l'activitat del promotor	138
3.5-	Efecte dels corticoides en l'activitat del promotor	140
Discussió	141
1-	Discussió dels resultats de l'estudi de mutacions en els exons 1, 2 i 3	142
2-	Discussió dels resultats de l'estudi de la regió promotora	148
Conclusions	160
Bibliografia	163
Producció científica	230

La realització del treball presentat no hauria estat possible sense la implicació i l'ajut d'algunes persones a les quals voldria expressar els meus agraïments:

Al Dr Ramon Gomis, Cap de Servei d'Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital Clínic de Barcelona i director d'aquesta tesi, per haver dipositat la seva confiança en mi en el desenvolupament d'aquest treball. Per ajudar-me en la seva realització i discussió, per la seva increïble capacitat de treball i el seu esperit perfeccionista i crític.

A la Dra Anna Novials, Cap de Servei del Departament de Diabetis de la Fundació Sardà Farriol i codirectora d'aquesta tesi, per donar-me a conèixer el món de l'amilina i per les seves ensenyances en el camp de la diabetis tipus 2. Pel seu recolzament, els seus encertats consells i per tot el seu ajut en la realització d'aquest treball.

Al Professor Enric Vilardell, per la seva decisiva contribució en la meva formació com a metge especialista en Endocrinologia i Nutrició.

A la Dra Roser Casamitjana, pel seu inestimable ajut en les determinacions hormonals i en la realització de les proves de tolerància oral a la glucosa (i també per consentir participar com a voluntària).

A la Carmen Franco, tècnic de laboratori del Laboratori Experimental de Diabetis durant el desenvolupament del present treball. Per la seva capacitat i professionalitat, per la seva valuosa ajuda en l'assoliment d'una bona part dels resultats d'aquesta memòria i, també per la seva amistat.

A tots els metges adjunts del Servei d'Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital Clínic, per totes les seves ensenyances en el camp de l'Endocrinologia i per la seva contribució en la meva formació, així com per haver-me fet arribar les persones estudiades en

aquesta tesi : Dra Irene Halperin, Dr Isaac Levy, Dr Ignacio Conget, Dr Enric Esmatjes, Dra Marina Angel, Dr Jordi Ferrer i Dr Joan Cabrer (actualment metge endocrinòleg adjunt de l'Hospital de Manacor).

A tots els membres que treballen al Laboratori Experimental de Diabetis de l'IDIBAPS, pel seu suport i el seu acolliment durant la meva estada en aquest laboratori: a la Dra Marta Fabregat, per la seva disponibilitat a l'hora d'ensenyar-me tot allò que no entengués del metabolisme de la glucosa i per la seva amistat; a la Betlem, per la seva tranquil·litat transmesa i per les bones estones compartides; a la Dra Carmen Benito, Dra Helena Corominola, al Marc i a la Imma. A la Mònica i a la Dra Helena Fernández-Usac, la presència de les quals enyoro i que sempre estaran en els meus pensaments.

A tots els companys de residència, així com als residents que han arribat després i a tots els becaris del Servei d'Endocrinologia. Especialment al Dr Josep Vidal, a la Dra Àngels Costa, a la Dra Carmen dell'Anna, Dra Camino Rodríguez i a la Dra Pilar Cristobal pel seu ajut en l'assoliment d'un número important de persones estudiades.

A Llorenç Quintó, de la Unitat d'Epidemiologia i Bioestadística de l'Hospital Clínic, per la seva ajuda inestimable en la realització de l'anàlisi estadística dels resultats del present treball.

A la Dra Elena Casals, metge del Departament de Bioquímica Clínica de L'Hospital Clínic, per la seva ajuda inestimable en la determinació en plasma de les concentracions d'apolipoproteína E.

Al Dr Ramon Oliva, metge del Servei de Genètica Mèdica de l'Hospital Clínic, pels seus valuosos consells en la discussió dels resultats d'aquesta memòria.

Al Dr M. Solé, Cap de Secció del Servei d'Anatomia Patològica, per l'obtenció de les imatges histològiques amb tinció amb vermell Congo dels dipòsits de substància amiloide en pàncrees de pacients amb diabetis tipus 2.

A les secretàries del Servei, Rosa M^a i Berta. A tot el personal d'infermeria i auxiliars del Servei d'Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital Clínic, per les moltes hores compartides durant la meva residència i per haver-me ensenyat a realitzar puncions venoses.

A la Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica, a la Fundació Universitària Agustí Pedro i Pons, a la Universitat de Barcelona i a la Fundació Marató TV3 per confiar en aquest projecte i per l'ajut concedit pel seu desenvolupament.

A tots els membres de la Fundació Sardà i Farriol, antics companys de treball, especialment a la Carolina, a la Teresa, a la Montse, a la Mireia i a la Dra Ana Chico, per la seva simpatia i pel bon ambient de treball creat.

A tots els pacients i als seus familiars que han acceptat participar voluntàriament en aquest estudi.

Dedicat al David,
per tot el recolzament i la seva estimació,
per estar sempre al meu costat

Dedicat als meus pares,

per haver-me encoratjat a dedicar-me a la Medicina

*Dedicat al Manel i a la Pilar,
per tot l'ajut que m'han donat*

ADN	Àcid desoxirribonucleic
ADNmt	ADN mitocondrial
ADP	Adenosina difosfat
ALP	<i>Amylin-like peptide</i>
AMPc	Adenosina monofosfat cíclic
ARN	Àcid ribonucleic
ARNm	ARN missatger
ARNt	ARN de transferència
ARNt^{LEU (UUR)}	ARN de transferència de la leucina
ATP	Adenosina trifosfat
CGRP	Pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina
CRE	Element de resposta a l'AMPc (<i>cAMP-responsive element</i>)
CV	Coeficient de variació
DE	Desviació estàndard
GDHm	Glicerol-3-fosfat deshidrogenasa mitocondrial
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide</i>
GRE	Element de resposta als corticoides (<i>glucocorticoid-responsive element</i>)
HNF	Factor nuclear dels hepatòcits
IRS-1	Substrat del receptor insulínic-1
IRS-2	Substrat del receptor insulínic-2
MIDD	<i>Maternally inherited diabetes and deafness</i>
MODY	<i>Maturity onset diabetes of the young</i>
PC-2	Prohormona convertasa 2
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PDX-1	<i>Pancreatic duodenal homeobox-1 protein</i>
PPAR-γ	<i>Peroxisome proliferator activated receptor γ</i>
PTOG	Prova de tolerància oral a la glucosa
SSCP	<i>Single-stranded conformational polymorphism analysis</i>
5'UTR	Regió 5' no traduïda de l'ARNm (<i>5' untranslated region</i>)

La diabetis mellitus (DM) tipus 2 és una malaltia d'elevada incidència i prevalença en el nostre medi (1) i que condiciona una elevada despesa econòmica en el sistema sanitari (2). Es tracta d'un trastorn extremadament heterogeni caracteritzat per múltiples defectes en l'acció i secreció de la insulina, que presenta un component de susceptibilitat genètica i un factor ambiental desencadenant (3). Malgrat l'optimisme inicial considerant que podria ser identificat un trastorn genètic que explicaria la majoria de formes de diabetis, només en una minoria de casos de diabetis tipus 2 ha pogut ser perfectament definit un defecte genètic simple, com són les formes monogèniques de diabetis tipus MODY (4) o les infreqüents formes de diabetis secundària a síndromes genètiques (5) o a alteracions de l'ADN mitocondrial (6). El component genètic de les formes més comunes de diabetis tipus 2 és probablement complex i involucra les interaccions de múltiples gens i factors ambientals.

Malgrat la gran controvèrsia existent en relació a la patogènia de la diabetis tipus 2, està acceptat de forma generalitzada que: 1) la malaltia presenta un important component genètic i ambiental (adquirit) (7-10); 2) la seva herència és poligènica, la qual cosa significa que és necessària la presència simultània de diversos defectes genètics o polimorfismes pel desenvolupament de la malaltia (11); 3) la disrupció de la relació normal entre la funció de la cèl·lula β i la sensibilitat a la insulina, ambdues genèticament regulades, constitueix un punt central en la patogènia de la diabetis tipus 2 (3); 4) la majoria de pacients són obesos; i 5) l'obesitat, especialment l'obesitat intraabdominal, causa resistència a la insulina (12) i està genèticament determinada (13).

El component genètic de la diabetis tipus 2 està avalat per estudis realitzats en germans bessons, on s'observa una major concordança en monozigòtics (70-80%) que en dizigòtics (14, 15). També s'ha observat una major incidència de diabetis tipus

2 en determinats grups ètnics que comparteixen ambients similars (16, 17). Però, pot ser l'argument més important a favor d'aquest component genètic sigui la modificació de la incidència de la diabetis tipus 2 en parelles mixtes de races diferents (18). Malgrat les diverses evidències que apunten a una clara predisposició genètica, les bases moleculars de l'herència de la diabetis tipus 2 no han pogut ser completament dilucidades (19).

En una primera part d'aquest apartat introductori es fa una revisió somera dels possibles gens candidats pel desenvolupament de la diabetis tipus 2. La definició de les bases genètiques de la DM tipus 2 permetrà un millor coneixement de la seva fisiopatologia i el desenvolupament de noves estratègies terapèutiques. En la segona part, ens centrarem en la importància de la presència d'amiloide en els illots pancreàtics en la patogènia i tractament de la diabetis tipus 2.

1.- Bases genètiques de la DM tipus 2. Estudi de gens candidats en el desenvolupament de la DM tipus 2.

1.1- Gen de la insulina

El gen de la insulina, localitzat en el cromosoma 11p, fou un dels primers gens candidats considerats en la base genètica de la diabetis tipus 2. Les mutacions en la regió codificant del gen constituïrien menys d'un 1% de casos, presenten un patró de herència autosòmica dominant, i donarien lloc a la producció d'insulines anormals amb activitat biològica notablement reduïda (20, 21). En aquesta regió s'han descrit dos tipus de mutacions puntuals. Les primeres condicionarien una alteració en la seqüència primària de les cadenes A i B de la insulina, afectant el domini d'unió de l'hormona al seu receptor. El fenotipus associat seria hiperglucèmia, hiperinsulinèmia,

nivells normals de pèptid C i una resposta normal a l'administració exògena d'insulina (22). Les segones alterarien el processament de la molècula de la insulina, donant lloc a hiperproinsulinèmia (23, 24). D'altra banda, també s'han detectat polimorfismes localitzats en la regió promotora del gen afectant a un 5% d'individus d'origen afroamericà (25).

No obstant, l'associació entre defectes del gen de la insulina i diabetis tipus 2 ha resultat negativa o poc freqüent en la majoria de poblacions estudiades, indicant que aquest gen no estaria involucrat en la patogènia de la diabetis tipus 2 en la majoria de pacients (21, 26, 27).

1.2- Gen del receptor de la insulina

El receptor de la insulina és una proteïna transmembrana consistent en dos subunitats α de 719 o 731 aminoàcids i 2 subunitats β de 620 aminoàcids (28). La cadena α és extracel·lular i s'uneix a la insulina, mentre que la cadena β travessa la membrana presentant el domini tirosin-cinasa en la regió citoplasmàtica (29). El gen del receptor de la insulina, clonat per Seino en 1989 (30), està ubicat en el cromosoma 19p i consisteix en 22 exons (31). S'han identificat un total de 35 mutacions en aquest gen, majorment en famílies amb síndromes caracteritzades per una severa resistència a la insulina (32-35), incloent-hi leprechaunisme, la síndrome de Rabson-Mendenhall (resistència a la insulina, acantosis nigricans, alteracions dentals i ungueals, i hiperplàsia pineal), diabetis lipoatròfica, i resistència a la insulina de tipus A (resistència a la insulina, acantosis nigricans i hiperandrogenisme). En conjunt, les mutacions en el receptor insulínic només representen un 0.1% del total de casos de diabetis tipus 2, per la qual cosa el gen del receptor de la insulina tampoc constituiria un candidat major en la susceptibilitat a desenvolupar diabetis en la població general.

1.3- Gen del substrat del receptor insulínic-1 (IRS-1)

El substrat del receptor insulínic-1 o IRS-1 constitueix el principal substrat del receptor de la insulina, formant part de la via de senyalització de la insulina. IRS-1 conté 21 llocs tirosina en la regió carboxiterminal susceptibles de ser fosforilats com a conseqüència de l'activació del receptor de la insulina o d'IGF1. L'activitat tirosin-cinasa del receptor de la insulina donarà lloc a la fosforilació dels residus tirosina, fonamentalment ubicats en posició 460, 608, 939 i 987. Les fosfotirosines d'aquesta proteïna s'uniran als dominis SH2 de la subunitat p85 α (de 85 KDa) de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI 3-cinasa), conduint a l'activació de la PI 3-cinasa i ulterior estimulació del transport de la glucosa i de la síntesi de glicogen (36, 37).

El gen codificant per IRS-1 està ubicat en humans en el cromosoma 2q (38). Donat que IRS-1 és un element central en la regulació de PI 3-cinasa per insulina i IGF1, podria presentar un paper important en la translocació de GLUT4 estimulada per la insulina, així com en la regulació del creixement cel·lular (39, 40). En aquest sentit, ratolins homozigots deficients en IRS-1 presenten resistència a la insulina i retràs de creixement (41), per tant, constituiria un excel·lent gen candidat per la diabetis tipus 2. No obstant, si bé l'estudi molecular del gen d'IRS-1 ha demostrat l'existència de mutacions en alguns pacients amb diabetis tipus 2, la seva prevalència és baixa i no explicarien la major part de casos (42-46).

D'altra banda, un substrat alternatiu pel receptor de la insulina és IRS-2, que presenta una homologia del 43% amb IRS-1. El gen codificant per IRS-2 en humans està ubicat en el cromosoma 13q (47). S'ha demostrat que ratolins deficients amb IRS-2 desenvolupen retràs de creixement i diabetis (48), indicant que la disfunció d'IRS-2

podria contribuir en la predisposició genètica a la diabetis tipus 2. Això no obstant, la majoria d'estudis han descartat que es tracti d'un locus major de susceptibilitat (49-51).

1.4- Gens del transportadors de la glucosa: Glut-1, Glut-2 i Glut-4

Les diferents isoformes dels transportadors de la glucosa Glut-1, Glut-2 i Glut-4 també van ser considerades inicialment com potencials gens candidats en la diabetis. Els nivells d'expressió més importants d'ARNm per Glut-1 es trobarien en placenta, cervell i ronyó, l'ARNm de Glut-2 s'expressaria en la cèl·lula β i fetge, així com en ronyó i budell prim; l'ARNm de Glut-4 es trobaria en teixit muscular i adipós, sent responsable de la utilització de glucosa estimulada per insulina. S'han identificat les localitzacions cromosòmiques dels gens codificants. El gen de Glut-1, que va ser el primer en ser caracteritzat, està ubicat en el cromosoma 1p i consta de 10 exons. Els gens de Glut-2 i Glut-4 estan ubicats en els cromosomes 3q i 17p, respectivament, i ambdós contenen 11 exons (52). Malgrat que alteracions dels transportadors de la glucosa podrien potencialment causar disfunció de la cèl·lula β i resistència a la insulina, les expectatives inicials no s'han complert, i l'estudi de Glut-1 ha resultat negatiu, mentre que en el cas de Glut-2 i Glut-4 només s'han detectat variants poc freqüents o sense repercussió funcional clara (53-57).

1.5- Síndromes MODY

Les síndromes MODY (*"Maturity Onset Diabetes of the Young"*) constitueixen un subtipus genètic i clínicament heterogeni de diabetis, sent les formes monogèniques de diabetis més extensament estudiades. Actualment aquesta forma de diabetis està classificada dins del grup de defectes genètics de la cèl·lula β (58). La síndrome MODY es caracteritza per: 1) inici de la diabetis en edats joves (infantesa, adolescència, o adults joves d'edat inferior als 25 anys); 2) herència autosòmica

dominant; 3) defectes en la secreció d'insulina (59). El caràcter ben definit de la seva herència, amb una elevada penetrança i l'inici precoç de la malaltia, facilita el reclutament d'amplis pedigris familiars, fent que sigui un model atractiu per estudis genètics en la diabetis.

La taula 1 mostra un estudi comparatiu entre les característiques generals de les 3 formes més freqüents de diabetis d'inici juvenil: diabetis tipus 1, tipus 2 i MODY.

	DM tipus 1	MODY	DM tipus 2
Edat d'inici	pics als 5 i 15 anys	< 25 anys	adolescents, adults joves
Ètnia predominant	caucàsica	caucàsica	llatins, afroamericans, americans nadius
Ratio Home:Dona	1.1 : 1	1 : 1	1 : 1.5
Severitat a l'inici	aguda	subtil	subtil
	requereix insulina	no requereix insulina	no requereix insulina
HLA DR3, DR4	molt comú	absent	absent
Autoimmunitat antiillot	present	absent	absent
Cetosi, CAD	comunes	rars	infreqüents
Prevalença obesitat	infreqüent	infreqüent	≥ 90%
% casos inici juvenil de diabetis	causa més freqüent	≤ 5% de casos en caucàsics joves	freqüència en augment
Familiar 1 ^{er} grau afecte	≤ 15 %	100 %	Variable, però comú
Herència	no mendeliana freqüentment esporàdica	autosòmica dominant	no mendeliana ++ familiar
Gens en l'herència	poligènica	Monogènica	poligènica
Patogènia	destrucció autoimmune cèl·lula β, insulinopènia	disfunció cèl·lula β, insulinopènia	resistència a la insulina + relativa insulinopènia

Taula 1. Comparació de les formes juvenils més comunes de diabetis. CAD, cetoacidosi.

La variabilitat fenotípica del subjectes amb MODY va suggerir que la seva base genètica era heterogènia, la qual cosa va ser confirmada pels estudis genètics. S'han descrit fins al moment actual 5 subtipus diferents de MODY (veure Taula 2) : 1) diabetis causada per mutacions en el gen del factor nuclear-4 α dels hepatòcits (HNF-4 α), en el cromosoma 20q, designada MODY 1 (60); 2) diabetis associada a mutacions en el gen de la glucocinasa, en el cromosoma 7p, designada MODY 2 (61); 3) diabetis associada a mutacions en el gen del factor nuclear-1 α dels hepatòcits (HNF-1 α), en el cromosoma 12q, designada MODY 3 (62); 4) diabetis associada a mutacions en el factor promotor de la insulina 1 (IPF1, també anomenat PDX 1 per "*pancreatic duodenal homeobox-1 protein*", IDX-1 per "*islet duodenum homeobox-1*"), en el cromosoma 13q (63), designada MODY 4; 5) diabetis associada a mutacions del factor nuclear-1 β (HNF-1 β), en el cromosoma 17, designada MODY 5 (64).

	MODY 1	MODY 2	MODY 3	MODY 4	MODY 5
Proteïna mutada	HNF-4 α	Glucocinasa	HNF-1 α	IPF1	HNF-1 β
Gen	20q12-q13.1	7p15-p13	12q24.2	13q12.1	17cen-q21.3
Distribució (% Famílies MODY)	0-9%	8-63 %	21-73 %	rara (<1%)	rara
% de DM tipus 2	infreqüent	< 0.2 %	1-2 %	infreqüent	infreqüent
Inici hiperglucèmia	postpuberal	Infantesa	postpuberal	adults joves	NR
Severitat de la DM	severa	moderada	severa	moderada ?	NR
Complicacions	freqüents	rars	freqüents	NR	++renals

Taula 2. Comparació de les diferents formes més comunes de MODY. NR, no reportat.

La distribució de les formes MODY és universal, i encara que es pensava que constituïa una forma rara de diabetis tipus 2, la seva prevalència pot haver estat subestimada per un diagnòstic tardà de la hiperglucèmia. Així, estudis recents suggereixen que aproximadament un 2-5% de pacients amb diabetis tipus 2 podrien presentar de fet MODY (65). Les prevalences relatives dels diferents subtipus de MODY varien notablement en les diferents poblacions estudiades (66-72). MODY 2 representa el 8-63% de casos, sent la forma més prevalent en França (66, 67), mentre que MODY 3 representa el 21-73% de casos, sent la més prevalent en Anglaterra (69). MODY 1, MODY 4 i MODY 5 constitueixen formes poc freqüents, havent sent descrits només en algunes famílies. Un estudi recent en població espanyola amb 20 pedigrís familiars amb el diagnòstic clínic de MODY, ha mostrat que el subtipus més freqüent era MODY 3, amb una prevalença relativa del 35% (72).

1.5.1- MODY- 1: HNF- 4 α

Es una forma poc prevalent de MODY. L'extensa família RW va ser en 1991 la primera (i la única, fins recentment) en la que es va demostrar la presència de lligament pel braç llarg del cromosoma 20 (73). No obstant, la raresa d'aquest subtipus genètic va enrederir la identificació del gen corresponent, que actualment se sap que està ubicat en la regió 20q12-q13.1 (60). L'estudi per seqüenciació d'aquesta família va detectar la presència d'una mutació antisentit a l'exó 7 del gen, a conseqüència de la qual la glutamina en posició 268 va seguida d'un codó stop (Q268X), donant lloc a una proteïna truncada. Posteriorment, van ser descrites mutacions diferents en altres famílies : E276G (74), R154X (75), T130I i V255M (76), R127W (77), V393I (78), G115S, I454V (79).

El gen responsable de MODY 1 codifica el factor de transcripció HNF-4 α , un membre de la superfamília de receptors nuclears i que actua regulant positivament l'expressió de HNF-1 α (80).

Fenotípicament, pacients amb mutacions en HNF-4 α presenten un deteriorament progressiu de la secreció d'insulina com a conseqüència de la disfunció de la cèl·lula β (78, 81), i una prevalença de complicacions microvasculars semblant a la diabetis tipus 1 (82).

1.5.2- MODY- 2: Glucocinasa

Froguel *i col.* van ser els primers en relacionar la presència de mutacions en el gen de la glucocinasa amb l'herència del MODY (61). En 1992 van estudiar 16 famílies franceses, detectant lligament positiu en 14 famílies entre el locus de la glucocinasa en el cromosoma 7p i diabetis. Estudis posteriors han confirmat l'existència de mutacions en el gen de la glucocinasa en famílies de diferents orígens ètnics, havent-se detectat fins al moment actual més de 80 mutacions en el gen (67, 70-72, 83-87). En la immensa majoria dels casos es tracta de mutacions puntuals afectant a la regió codificant del gen (veure Figura 1). Les mutacions descrites donen lloc a la substitució d'un aminoàcid, o bé a la síntesi d'una proteïna truncada per la creació d'un codó d'acabament prematur (codó stop), afectant en ocasions nucleòtids ubicats en les regions d'unió exó-intró i produint com a conseqüència l'expressió d'un ARN missatger anormal. D'altra banda, també s'han detectat mutacions del gen en dones amb diabetis gestacional, suggerint que la gestació en aquestes pacients podria desemmascarar una síndrome MODY subclínica (88, 89).

Cal remarcar que individus MODY 2 són universalment heterozigots, amb un al·lel mutat i un normal de la glucocinasa. No s'han descrits casos d'homozigosi per a mutacions del gen de la glucocinasa en humans, ja que és una situació incompatible amb la vida. Així, s'ha demostrat que ratolins homozigots deficientes en glucocinasa

desenvolupen una diabetis severa després del naixement i moren durant la primera setmana de vida si no son tractats (90).

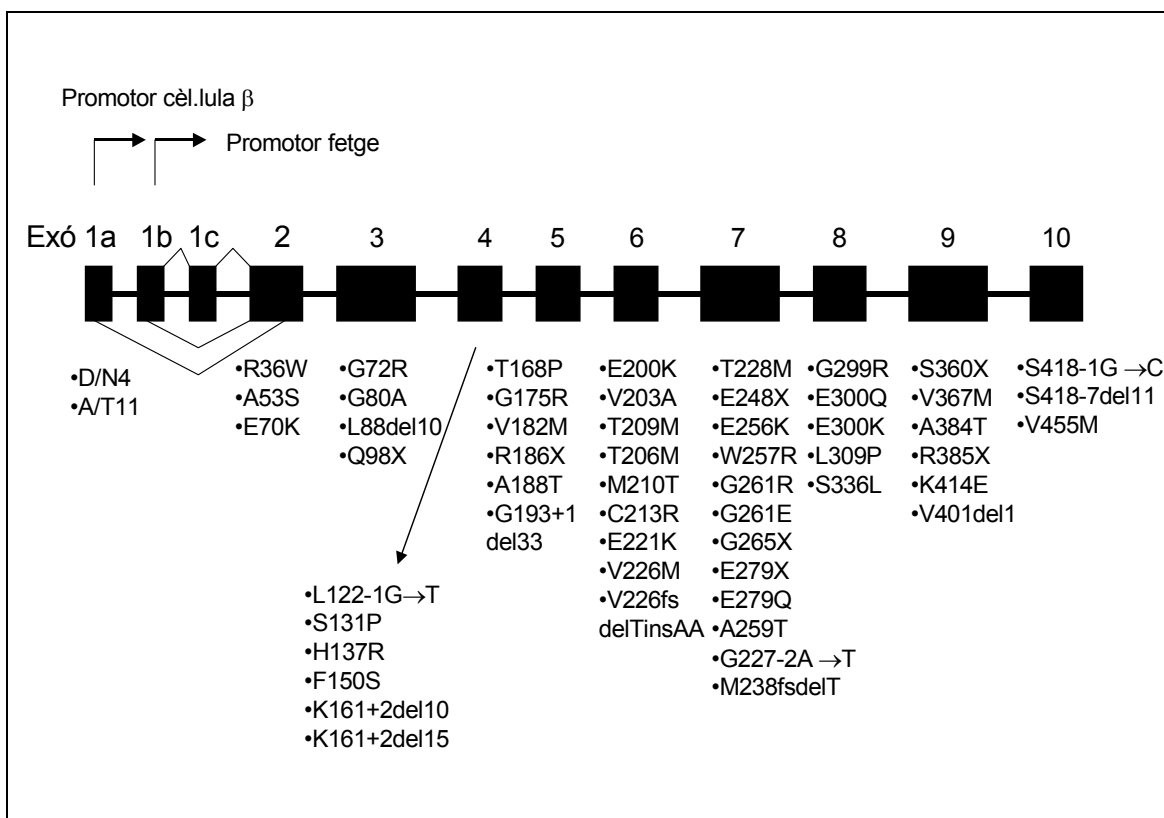


Figura 1. Representació esquemàtica del gen de la glucocinasa en el locus 7p15-p13.1 i distribució de les mutacions descrites (de les referències 67, 70-72, 83-87).

La glucocinasa s'expressa majoritàriament en cèl·lules β pancreàtiques i en fetge, on fosforila la glucosa a glucosa-6 fosfat, exercint una paper rellevant en la regulació del metabolisme de la glucosa en aquests teixits (91). Aquest enzim es diferencia dels altres membres de la família d'hexocinases en mamífers per la seva baixa afinitat per la glucosa ($K_m = 8$ vs. $0.02-0.2$ mmol/l per hexocinases). Estudis cinètics han mostrat un deteriorament de l'activitat enzimàtica de diverses proteïnes mutants, les quals presenten una disminució en la V_{max} o afinitat de la glucocinasa per la glucosa (92, 93). Aquesta disminució de l'activitat glucocinasa en les cèl·lules β es

tradueix *in vivo* en una alteració del sistema sensor de la glucosa i, en conseqüència, en un augment del dintell de la secreció d'insulina induïda per la glucosa en aquestes cèl·lules, i en un desplaçament cap a la dreta de la corba dosi-resposta relacionant concentracions de glucosa i taxa de secreció d'insulina (veure Figura 2). Així, la comparació de la secreció d'insulina en front diferents concentracions de glucosa ha demostrat que individus portadors de mutacions en el gen de la glucocinasa presenten en relació als controls una reducció superior al 50% en la secreció d'insulina per una determinada concentració de glucosa (94). D'altra banda, la secreció d'insulina en resposta a l'arginina està preservada habitualment (95), la qual cosa recolza el fet que en el MODY 2 està afectat el sistema sensor de la glucosa.

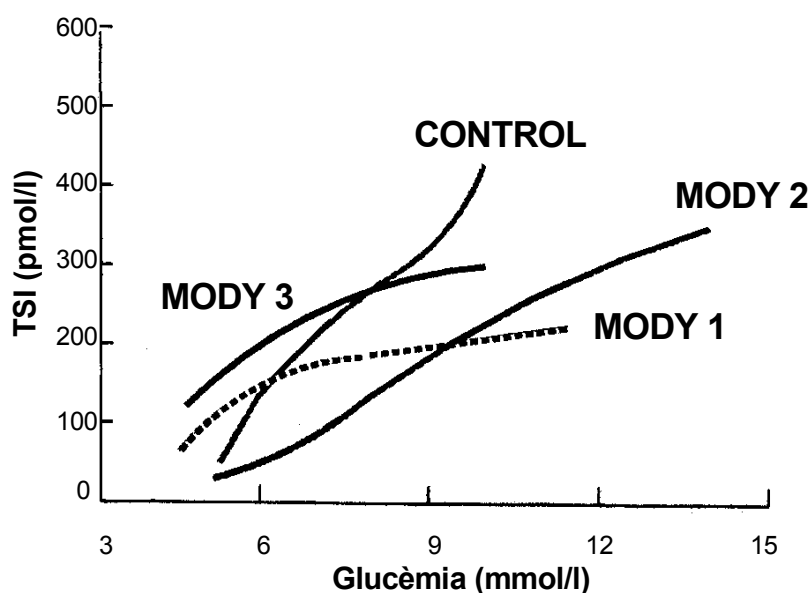


Figura 2. Taxa de secreció d'insulina (TSI) en funció de les concentracions de glucosa en plasma durant la infusió endovenosa de glucosa en 4 grups: controls no diabètics, pacients amb MODY 1, MODY 2, i MODY 3. Inicialment, la taxa de secreció d'insulina en pacients amb MODY1 i MODY 3 és normal, però quan les concentracions plasmàtiques de glucosa són superiors a 100-150 mg/dl (5.5-8 mmol/l) és clarament patològica en relació a controls. La TSI en pacients amb MODY 2 inicialment és baixa, però augmenta gradualment amb l'increment de la glucèmia. Per tant, la corba dosi-resposta està desplaçada cap a la dreta.

D'altra banda, donat que la glucocinasa s'expressa en teixit pancreàtic i en fetge, i donat que les mutacions afecten simultàniament les dues isoformes, també estarà disminuïda l'activitat glucocinasa en els hepatòcits. Això conduirà a una disminució de la síntesi de glicogen (96), així com a una reducció de la supressió de la gluconeogènesi que es produeix fisiològicament durant la ingesta (97). Ambdós mecanismes (disminució de la glicogenosíntesi i augment de la gluconeogènesi) contribueixen de forma important en la hiperglucèmia postprandial que presenten pacients amb MODY 2. Per tant, es evident que en la patogènia de la diabetis en aquests pacients no només estaria involucrada l'alteració de la funció de la cèl·lula β , sinó que també l'alteració del metabolisme de la glucosa en el fetge exerciria un paper rellevant.

No obstant les nombroses mutacions de la glucocinasa descrites al llarg de la literatura, pacients amb MODY 2 comparteixen un fenotipus comú:

- 1) L'hiperglucèmia associada és freqüentment moderada, malgrat la presència de múltiples defectes tant en pàncrees com en fetge. En el curs evolutiu es produeix un cert deteriorament de la funció de la cèl·lula β , però que no arriba a ser tan sever com en pacients amb MODY 3 (82).
- 2) La penetrança en les famílies afectes és ràpidament completa, de forma que pràcticament tots els individus portadors de mutacions es troben afectes abans de la pubertat, sent 12 mesos l'edat de diagnòstic més precoç reportada (67).
- 3) Malgrat la llarga duració de la hiperglucèmia, el dèficit de glucocinasa no s'associa a un risc incrementat de complicacions cròniques de diabetis. En aquest sentit, s'ha documentat un baixa prevalença de retinopatia proliferativa, proteinúria i neuropatia perifèrica en pacients amb MODY 2 en relació a altres subtipus de MODY o a les formes clàssiques de diabetis

tipus 2 (67, 98). Això pot ser degut a la hiperglucèmia relativament moderada o a la baixa prevalença d'hipertensió arterial que presenten aquests pacients.

1.5.3- MODY- 3: HNF-1 α

El gen de MODY 3 ha estat recentment identificat com el gen codificant per HNF-1 α , ubicat en la regió cromosòmica 12q24.2 (62). HNF-1 α és un factor de transcripció involucrat en la regulació tissular específica de gens hepàtics, incloent-hi albúmina, α 1-antitripsina, fibrinògen α i β , factors de coagulació i apolipoproteïnes (99). S'expressa en fetge, illots pancreàtics, tracte digestiu i ronyó. Defectes en HNF-1 α s'associen freqüentment a alteracions de la reabsorció tubular de glucosa i fosfat, probablement secundàries a una disminució de l'expressió de les proteïnes transportadores corresponents (100). Així, s'ha demostrat que ratolins amb deficiència completa de HNF-1 α desenvolupaven disfunció hepàtica, fenilcetonúria i síndrome de Fanconi (101). Aquest factor de transcripció presenta 3 dominis funcionals: un domini de dimerització, un domini d'unió a l'ADN i un domini transactivador o d'activació transcripcional (102).

Estudis genètics en famílies de diferents orígens ètnics, han confirmat que mutacions en HNF-1 α constitueixen la causa més freqüent de MODY (a excepció de França on, tal com s'ha comentat prèviament, la forma més prevalent és el MODY 2), havent-se detectat fins a l'actualitat més de 80 mutacions diferents, localitzades en les regions codificants i en la regió promotora (68-72, 103-107), (veure Figura 3).

Mutacions en HNF-1 α donen lloc a un deteriorament progressiu de la funció de la cèl·lula β , en absència de resistència a la insulina (59). Inicialment, la producció

basal d'insulina en condicions de normoglicèmia està preservada, però la capacitat d'augmentar la secreció d'insulina en front d'una situació d'hiperglicèmia està disminuïda. A mida que la funció cel·lular β es deteriora, també resulta afectada la producció basal, amb la conseqüent hiperglicèmia progressiva que freqüentment requereix tractament amb insulina. En general les mutacions presenten elevada penetrança, i la majoria d'individus portadors presenten diabetis a l'edat de 25 anys (69). Les complicacions microvasculars són freqüents en el MODY 3 com a resultat del deficient control metabòlic (98, 108), i és un tret fenotípic característic de la malaltia l'elevada sensibilitat a l'efecte hipoglicèmic de les sulfanilurees (109), les quals constitueixen una important eina terapèutica.

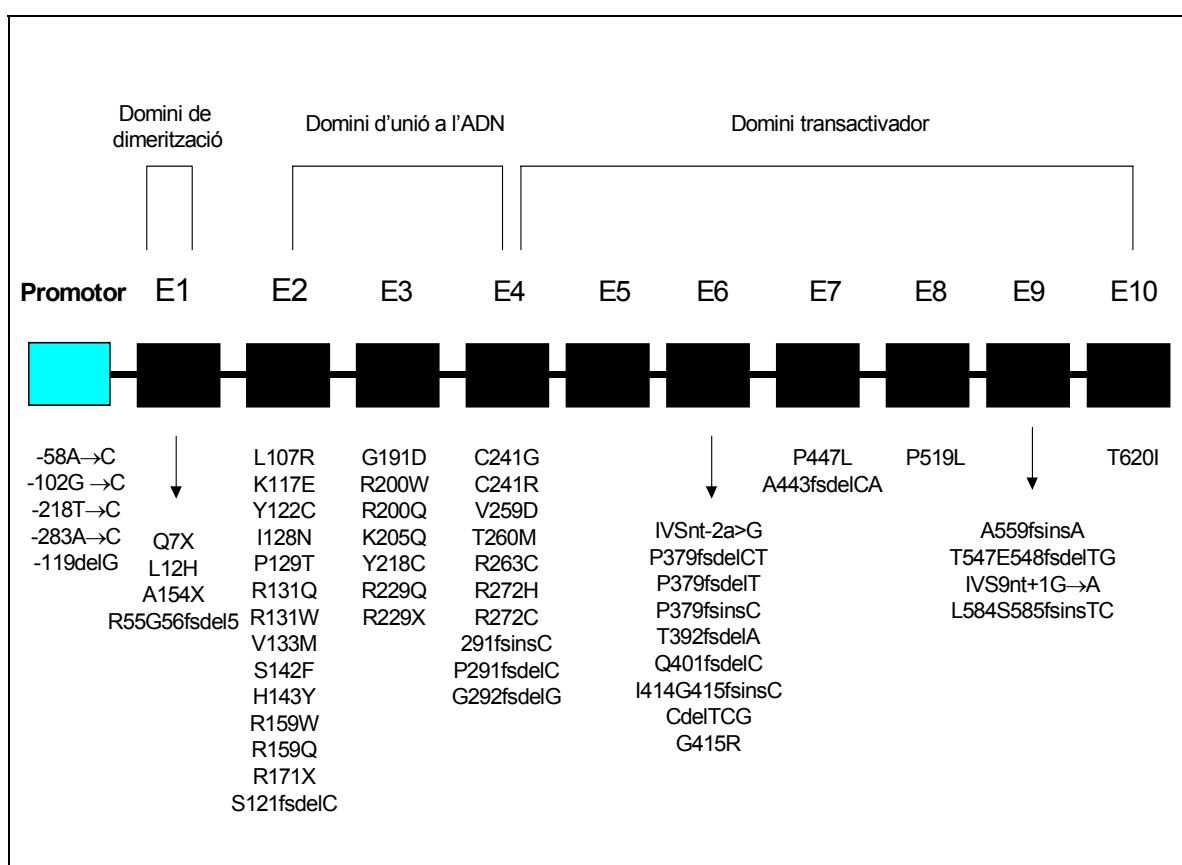


Figura 3. Representació esquemàtica del gen HNF-1 α en la regió cromosòmica 12q24.2, amb els 3 dominis funcionals de HNF-1 α , i distribució de les mutacions descrites en la literatura (de les referències 68-72, 103-107).

Els mecanismes pels quals mutacions en HNF-1 α s'associen a defectes de la cèl·lula β i causen diabetis en el MODY 3 són, en gran part, desconeguts. Estudis recents indiquen que HNF-1 α és un factor essencial per la transcripció del gen de la insulina així com per l'expressió de gens involucrats en el transport i metabolisme de la glucosa, tals com el GLUT 2 i la L-piruvat-cinasa (110, 111). Cal remarcar que ratolins heterozigots amb un al·lel normal i un al·lel inactivat de HNF-1 α presenten una tolerància oral a la glucosa i una funció secretora d'insulina estrictament normals, i només desenvolupen diabetis quan són homozigots (112), mentre que subjectes MODY3 són heterozigots i expressen de forma completa el fenotipus de diabetis. Aquest fet suggereix que mutacions en humans podrien tenir un efecte dominant negatiu en la secreció d'insulina (111). Això no obstant, les dades experimentals indiquen que només mutacions localitzades en el domini transactivador de HNF-1 α exerceixen aquest efecte dominant negatiu, mentre que mutacions en altres dominis de la proteïna no interfereixen en l'activitat de l'al·lel normal (113).

1.5.4- MODY- 4: IPF1 (PDX1)

El factor de transcripció PDX1 ("*pancreatic and duodenal homeobox factor 1*"), també anomenat IPF1 ("*insulin promoter factor 1*") o IUF1 ("*insulin upstream factor 1*") és un factor essencial pel desenvolupament embrionari dels illots pancreàtics i per la regulació de la transcripció dels gens específics del teixit pancreàtic endocrí en adults, tals com els gens de la insulina, GLUT2, glucocinasa i amilina en cèl·lules β , i el gen de la somatostatina en cèl·lules δ (114).

Stoffers *i col.* van identificar una mutació en el gen de PDX1 en una extensa família que causa MODY (MODY 4) en situació d'heterozigosi, i agenèsia pancreàtica quan el gen mutat està present en homozigosi (63). Aquesta mutació consisteix en la

deleció de citosina en el codó 63 (P63fsdelC) en el domini transactivador o d'activitat transcripcional del gen, donant lloc a la creació d'un codó d'acabament prematur i a una proteïna truncada. La família estudiada presentava una elevada incidència de diabetis, sent l'edat mitja de diagnòstic de 35 anys amb un rang de 17 a 67 anys. Un infant homozigot per la mutació va néixer amb agenèsia pancreàtica i presenta diabetis i insuficiència pancreàtica exocrina (115).

1.5.5- MODY 5: HNF- 1 β

El factor de transcripció HNF-1 β s'expressa fonamentalment en ronyó, fetge, budell, pulmó i pàncrees i forma heterodímers amb la proteïna estructuralment relacionada HNF-1 α (116), exercint un paper crític en el desenvolupament renal (117).

Mutacions en el gen HNF-1 β van ser inicialment descrites en dos famílies japoneses. Horikawa *i col.* van identificar la mutació R177X en el gen de HNF-1 β en una família japonesa amb MODY (64), associant-se la presència d'aquesta mutació a diabetis i nefropatia. En aquesta primera família documentada, es van detectar tres subjectes amb la mutació R177X: la mare de 67 anys, amb antecedent de diabetis diagnosticada als 40 anys i tractada amb insulina, presentant com a complicacions cròniques retinopatia diabètica proliferativa i insuficiència renal crònica; la filla, de 36 anys, amb diabetis diagnosticada als 10 anys, també amb retinopatia proliferativa i insuficiència renal crònica; el fill, de 31 anys, amb diabetis diagnosticada als 15 anys, tractada amb insulina, i proteinúria demostrada. En una segona família japonesa, es va descriure la mutació A263fsinsGG en el gen de HNF-1 β , associant-se aquesta mutació a la presència de quists renals (118). L'edat de diagnòstic de diabetis oscil·lava entre 14 i 61 anys, i el membres afectes presentaven insuficiència renal crònica i hipertensió arterial crònica o història d'hipertensió induïda per la gestació.

En població caucàsica també s'ha descrit la presència de mutacions en HNF-1 β associades a MODY i disfunció renal: A241T i G492S (119). A més a més, recentment s'ha documentat la presència d'una deleció de 75 pb a l'exó 2 de HNF-1 β , que donaria lloc a una proteïna sense l'arginina en posició 137 i sense la lisina en posició 161 (R137-K161del), en dos dones amb aplàsia vaginal i úter rudimentari (aplàsia Mulleriana), indicant que HNF-1 β també podria ser un factor essencial en el desenvolupament dels genitals interns femenins (120).

Els mecanisme pel qual la pèrdua de funció de HNF-1 β conduiria a un deteriorament de la funció de la cèl·lula β és en gran part desconegut, però se sap que HNF-1 β regula la transcripció del gen de HNF-4 α , i experiments *in vitro* han demostrat que mutacions en HNF-1 β produeixen un deteriorament de la transcripció del gen de la insulina (121).

1.5.6- Altres gens MODY

La presència de famílies amb criteris clínics de MODY però que no presenten cosegregació per cap d'aquests 5 locus MODY ben definits, implica que existeixen altres gens MODY desconeguts, constituint l'anomenat MODY X (71, 72, 122,123). En aquest sentit, recentment s'ha detectat la presència de mutacions en el gen NeuroD1/Beta2 en dos famílies, que podrien constituir el subtipus MODY 6 (124). El gen NeuroD1 està ubicat en el cromosoma 2q32 i consta de dos exons, dels quals el primer no és codificant (125). L'exó 2 codifica un factor de transcripció que s'expressa en les cèl·lules β , budell, hipòfisi i en neurones del sistema nerviós central, i que exerceix una funció reguladora del desenvolupament del pàncrees i de la transcripció del gen de la insulina en la cèl·lula β . Aquest factor s'uneix a la caixa E del promotor de la insulina, sent potenciada la seva activació per la proteïna coactivadora p300

(126). Ratolins homozigots deficients en NeuroD1/B2 presenten una alteració de la morfologia dels illots amb una reducció de la massa cel·lular β , desenvolupant una diabetis severa amb mort perinatal (127). De les dos mutacions detectades en l'exó 2, la primera consisteix en el canvi G→T en posició 111, causant la substitució d'una arginina per leucina (R111L). Aquesta mutació està localitzada en el domini d'unió a la caixa E, abolint la seva capacitat d'unió al promotor de la insulina, i el fenotipus associat és inespecífic. La segona mutació consisteix en la inserció d'un residu de citosina en posició 206 (206+C), donant lloc a una proteïna truncada que manca del domini d'unió al coactivador p300, així com a un fenotipus semblant al del MODY 3.

D'altra banda, la proximitat d'aquest gen al locus IDDM7, ha fet que també sigui considerat com a potencial gen candidat en la diabetis tipus 1 (128).

1.6- Gen del receptor de GLP-1

El *glucagon-like peptide* (GLP-1) és un polipèptid sintetitzat i secretat a l'ili en resposta a la ingesta de nutrients, sent la seva funció potenciar la secreció d'insulina estimulada per la glucosa, a més d'inhibir la secreció àcida gàstrica (129). Les accions de GLP-1 són mitjançades per un receptor específic localitzat en la membrana de la cèl·lula β . La unió de GLP-1 al seu receptor comportarà l'activació de l'adenil ciclasa, formació d'AMPc, i activació de la proteïna-cinasa A, que ulteriorment fosforilarà diversos elements relacionats amb la maquinària secretora d'insulina (130). El gen codificant del receptor de GLP-1 està localitzat en el cromosoma 6p (131). Els estudis genètics de lligament realitzats han descartat que aquest gen tingui un paper important en la patogènia de la diabetis tipus 2 (131, 132).

1.7- Gen del receptor del glucagó

Donat que el glucagó és un regulador crític de l'homeostasi de la glucosa, el seu receptor va ser considerat un gen candidat en la patogènia de la diabetis tipus 2. El receptor del glucagó s'expressa en fetge, cèl·lula β pancreàtica, ronyó, teixit adipós, aparell cardiovascular, així com en algunes regions de cervell, estómac i glàndula adrenal (133). S'ha descrit la presència d'una mutació en l'exó 2 del gen del receptor del glucagó involucrant la substitució d'una glicina per serina en posició 40 (mutació G40S) associada a diabetis tipus 2 a França i Sardenya, amb una freqüència del 4.6% i 8.3%, respectivament (134, 135). Aquesta mutació donaria lloc a una disminució marcada de l'afinitat del receptor pel glucagó.

1.8- Gen de la prohormona convertasa 2 (PC2)

La proinsulina és processada i transformada en insulina per l'acció combinada de dos endoproteases, la prohormona convertasa 2 (PC2) i la prohormona convertasa 3 (PC3). PC2 processa la molècula de proinsulina en la regió carboxiterminal del senyal dibàsic lisina 64-arginina 65, que uneix els dominis del pèptid C i la cadena A. Donat que la diabetis tipus 2 està associada a un augment de les concentracions plasmàtiques de proinsulina, el gen de PC2 constituiria un gen candidat en aquesta malaltia. El gen de PC2 està ubicat en el cromosoma 20p i estudis practicats en població japonesa han detectat la presència d'un polimorfisme a l'intró 2 associat de forma significativa a DM tipus 2 (136). Això no obstant, la rellevància d'aquest canvi queda pendent de determinar en altres poblacions.

1.9- Gen de la sintasa del glicogen

La sintasa del glicogen és un enzim crític en el metabolisme de la glucosa, representant més del 90% del metabolisme no oxidatiu de la glucosa en el múscul esquelètic. Un defecte metabòlic característic en pacients amb diabetis tipus 2 i resistència a la insulina, així com en familiars de primer grau, és la incapacitat de la insulina per estimular aquest enzim (137). L'estudi del gen de la glicogen sintetasa, ubicat en el cromosoma 19q13.3, ha detectat la presència de polimorfismes en la regió promotora sense repercussió en els nivells d'expressió de l'ARNm de l'enzim en múscul, així com un marcador STR ("*short tandem repeats*") consistent en la repetició d'un dinucleòtid (TG) freqüentment associat a diabetis tipus 2 (138).

1.10- Gen Isl-1

Isl-1 (Islet-1) és un factor de transcripció, de la família de les proteïnes "LIM/homeodomain", amb un paper crític en la diferenciació de les cèl·lules endocrines dels illots pancreàtics (139). El gen codificant per Isl-1 va ser identificat en el cromosoma 5q, entre els marcadors D5S395 i D5S407, i consta de 6 exons (140). S'ha descrit recentment la mutació Q310X a l'exó 5 del gen Isl-1 en una família d'origen japonès amb diabetis tipus 2 (141). Aquesta mutació està localitzada en el domini d'activació transcripcional de Isl-1 comportant la deleció de 40 aminoàcids de la regió carboxiterminal. Experiments *in vitro* en cèl·lules β TC3 utilitzant el *sistema reporter de la luciferasa* han demostrat que la mutació Q310X dona lloc a una disminució severa de l'activitat transcripcional del gen, suggerint un potencial paper d'aquesta mutació en la patogènia de la diabetis tipus 2.

1.11- Gen de la glicerol-3-fosfat deshidrogenasa mitocondrial (GDHm)

La glicerol-3-fosfat deshidrogenasa mitocondrial (GDHm) es troba situada a la superfície externa de la membrana mitocondrial interna i catalitza la conversió de glicerol-3-fosfat a dihidroxiacetona fosfat, formant FADH_2 a partir de FAD. Transfereix els equivalents reductors citosòlics generats durant la glucòlisi a la cadena de transport d'electrons mitocondrial, juntament amb la glicerol-3-fosfat deshidrogenasa citosòlica, exercint un important paper en el control del flux de la llançadora del glicerolfosfat als illots pancreàtics. Defectes en aquest enzim podrien contribuir a un deteriorament de la secreció d'insulina induïda per glucosa (142). D'altra banda, s'ha detectat una disminució de l'activitat de la GDHm en illots pancreàtics de diferents models animals diabètics (143-145), així com en illots pancreàtics i en limfòcits de pacients amb diabetis tipus 2 (146, 147), la qual cosa fa que aquest enzim sigui un bon candidat per explicar la disfunció de la cèl·lula β en la diabetis tipus 2.

El gen humà de la GDHm es localitza al cromosoma 2, banda q24.1, i consta de 17 exons i 16 introns. Els exons 3 i 4 codificarien el domini funcional d'unió al FAD; els exons 15 i 16, el domini d'unió al calci; els exons 10 i 11, el domini d'unió al glicerol-3 fosfat (148, 149). Estudis genètics en pacients amb diabetis tipus 2, tant en població japonesa com d'origen caucàsic, han detectat la presència de variacions en la seqüència de la GDHm que no afecten els seus dominis funcionals (150, 151). Recentment, Novials *et al.* han descrit mutacions en els dominis d'unió al calci i al FAD en un pacient amb diabetis tipus 2, associades a una activitat disminuïda de la GDHm en els limfòcits (152).

1.12- ADN mitocondrial

Una forma específica de presentació de diabetis és la que fou inicialment anomenada MIDD (*“maternally inherited diabetes and deafness”*), que característicament presenta una via de transmissió materna i s’associa a sordesa neurosensorial, constituint la seva base molecular mutacions específiques de l’ADN mitocondrial (ADNmt). La proposta de classificació de l’ADA de 1997 l’anomena diabetis lligada a mutacions de l’ADN mitocondrial (58).

L’estructura de l’ADNmt humà consisteix en una doble cadena circular de 16.5 kb, que conté 37 gens que codifiquen els 2 ARN ribosòmics (12S i 16S), 22 ARN de transferència (ARNt) i 13 proteïnes estructurals de la cadena respiratòria mitocondrial: 7 subunitats del complex I (NADH deshidrogenasa-ubiquinona òxid-reductasa: ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 i ND6); 1 subunitat del complex III (ubiquinona-citocrom c òxid-reductasa); 3 subunitats del complex IV (citocrom c oxidasa: COXI, COX II, i COIII), i 2 subunitats del complex V (ATP sintetasa: A6 i A8) (153) (Figura 4).

L’ADNmt en mamífers s’hereta quasi exclusivament via materna, ja que durant la fecundació l’òvul és el que aporta el citoplasma i, per tant, els mitocondris amb el seu ADN al zigot, mentre que l’espermatozoide contribueix exclusivament amb genoma nuclear. Com a resultat, l’ADNmt té una transmissió exclusivament materna (154). D’altra banda, dins d’una mateixa cèl·lula poden coexistir molècules d’ADNmt normals i molècules mutades, situació anomenada heteroplàsmia (en contraposició a la situació d’homoplàsmia, en la qual totes les molècules són iguals, normals o bé mutades) (155).

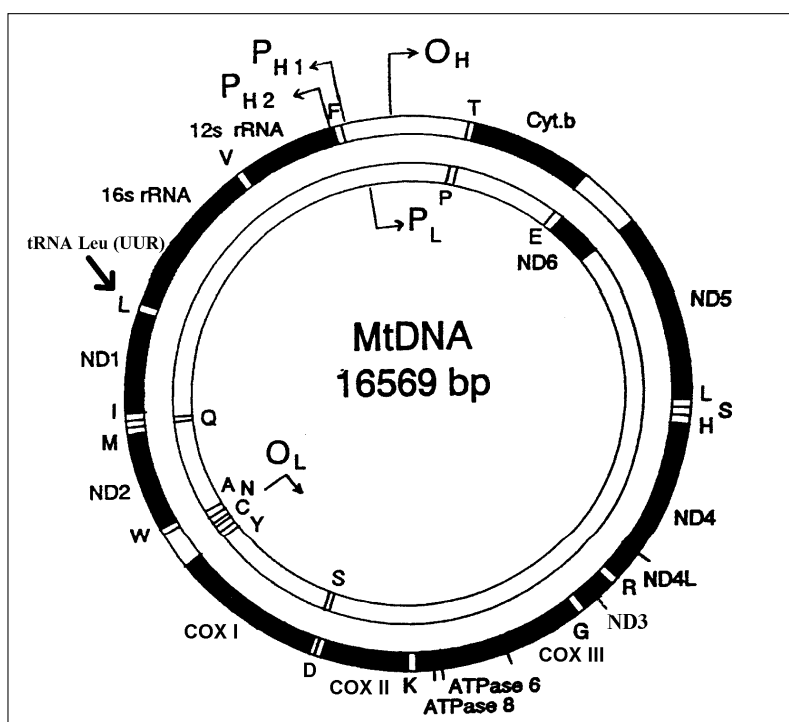


Figura 4. Estructura de l'ADN mitocondrial humà (ADNm_t), presentant les regions codificants pels gens del complex I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5), complex III (Cyt b), complex IV (COX I, COX II, COX III), complex V (ATPasa 6 i 8), els 2 ARN ribosòmics (16S i 12S rARN) i els ARNt específics pels específics aminoàcids (A, alanina; R, arginina; N, asparagina; D, àcid aspàrtic; C, cisteïna; Q, glicina; H, histidina; I, isoleucina; L, leucina; K, lisina; M, metionina; F, fenilalanina; P, prolina; S, serina; T, treonina; W, triptòfan; Y, tirosina; V, valina). O_H i O_L : origen de la replicació de l'ADNm_t per a les cadenes pesada i lleugera, respectivament. P_{H1} i P_{H2}, regions promotores de la cadena pesada; P_L, promotor de la cadena lleugera. La posició de la mutació A3243G (RNAT^{LEU (UUR)}) està indicada en la figura mitjançant una fletxa.

L'evidència de que l'ADNm_t podia exercir un potencial paper patogènic en la diabetis va partir de dos observacions. D'una banda, alguns estudis epidemiològics van demostrar una transmissió predominantment materna de la DM tipus 2 en les famílies afectes (156). D'altra banda, es va constatar que la diabetis es presentava associada amb relativa freqüència a malalties mitocondrials (157). En aquest sentit, la diabetis pot manifestar-se en pacients amb oftalmoplegia externa progressiva (158), la síndrome de Kearns-Sayre complet (forma d'oftalmoplegia externa progressiva que comença abans dels 20 anys, caracteritzada per retinitis pigmentària, atàxia i bloqueig

cardíac, presentant àmplies deleccions i duplicacions de l'ADNmt) (159), la síndrome de Pearson (160), la síndrome MELAS (caracteritzada per acidosi làctica i episodis semblants a accidents vasculars cerebrals) (161), i més rarament la síndrome MERFF (epilèpsia mioclònica amb fibres musculars "ragged red", sent la base molecular la substitució d'una adenina per guanina en el gen codificant de l'ARNt^{LYS} en posició 8344) (162).

El gen codificant per l'ARN de transferència de la leucina (ARNt^{LEU (UUR)}) constitueix un punt clau de localització de mutacions de l'ADNmt (163). S'han detectat diverses mutacions patogèniques en aquest gen, entre les quals s'han relacionat amb diabetis associada a altres símptomes: la mutació A3252G (detectada en un pacient amb encefalomiopatia mitocondrial, retinitis pigmentària, demència i hipotirodisme) (164); la mutació A3260G (en un pacient amb miopatia i cardiomiopatia) (165); la mutació C3256T (en un pacient amb epilèpsia mioclònica i fibres "ragged-red") (166); la mutació A3264G (en un pacient amb sordesa, atàxia cervelletosa, lipoma cervical disfunció olfatória, oftalmoplegia i paràlisi facial) (167); la mutació T3271C (168); i la mutació A3243G, clàssicament associada a la síndrome MELAS (161).

En 1992 Van der Ouweland *i col.* van identificar un canvi d'adenina per guanina en el nucleòtid en posició 3243 del gen codificant per l'ARNt^{LEU (UUR)} en un ampli pedigrí d'una família holandesa amb diabetis transmesa via materna i associada a sordesa neurosensorial (169). Aquesta mutació puntual de l'ADNmt va ser detectada en els membres afectes de la família, mentre que era absent en individus sans, la qual cosa indicava que podia constituir un actor patogènic en la diabetis. Quasi simultàniament Reardon *i col.* van descriure la mateixa mutació en una família anglesa que presentava també diabetis associada a sordesa neurosensorial (170). L'associació de la mutació A3243G de l'ADNmt amb diabetis i sordesa va ser confirmada ràpidament en posteriors publicacions estudiant famílies que presentaven diabetis amb

un patró d'herència de transmissió materna (171-174). El mateix fenotipus clínic va ser descrit per Ballinger *i col.* en una família, però en aquest cas la base molecular estava constituïda per la deleció de 10.4 Kb de l'ADNmt (174, 175).

El mecanisme patogènic pel qual la mutació A3243G en el gen ARNt^{LEU (UUR)} de l'ADNmt és capaç de causar diabetis no és coneix completament. Aquesta mutació es produeix en el lloc d'unió de l'ADNmt amb un factor proteic que promou la terminació de la transcripció, a l'espai limítrof entre el gen que codifica l'ARN ribosòmic 16S i el gen ARNt^{LEU (UUR)}, causant com a conseqüència un defecte en la síntesi proteica mitocondrial (176). L'estructura primària del gen ARNt^{LEU (UUR)} està representada en la Figura 5.

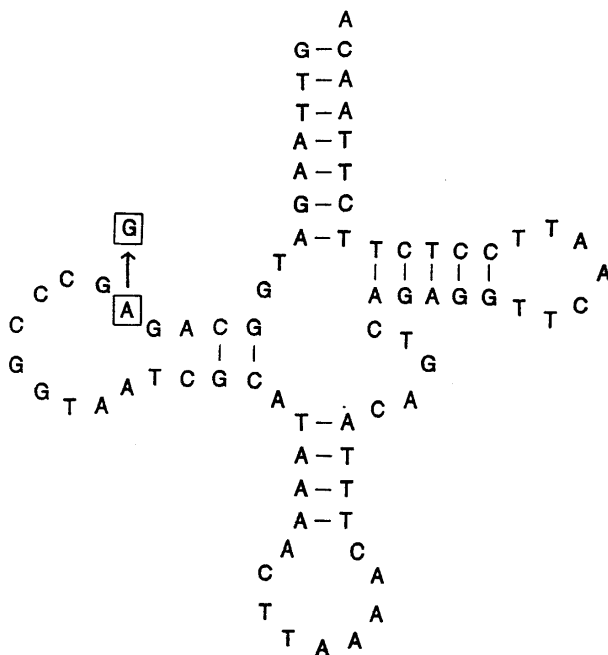


Figura 5. Estructura primària del gen ARNt^{LEU (UUR)}. El canvi G→A en posició 3243 està indicat en la figura mitjançant una fletxa.

Estudis de selecció clonal de línies cel·lulars van mostrar que quan el percentatge de molècules mutades superava el 80%, les cèl·lules perdien la seva capacitat per a consumir oxigen (176). En teixits amb elevats percentatges de molècules mutades, el metabolisme oxidatiu de la glucosa està disminuït, i la relació ADP/ATP augmentada. D'altra banda, teixits postmitòtics, tals com múscul, cervell i cèl·lula β pancreàtica, presentaran una major tendència a acumular mutacions que cèl·lules de divisió ràpida. Per tant, és probable que el grau d'heteroplàsmia detectat en sang perifèrica no sigui el reflex fidel del que presenta la cèl·lula β .

Però, com s'alterarà el mecanisme d'homeostasi de la glucosa com a conseqüència de mutacions patogèniques de l'ADNmt?. D'una banda, una disfunció mitocondrial en el múscul i teixit adipós resultarà en la reducció de la utilització de glucosa i, per tant, donarà lloc a un cert grau de resistència a la insulina. D'altra banda, en la cèl·lula β una disfunció mitocondrial es traduirà en un defecte en la secreció d'insulina induïda per la glucosa, la qual depèn de la relació ADP/ATP (177).

Malgrat haver-se descrit la presència d'un cert grau de resistència a la insulina en alguns pacients amb diabetis mitocondrial (178, 179), la diabetis associada a mutacions de l'ADNmt és fonamentalment causada per un defecte en la secreció d'insulina. Així, estudis realitzats en pacients amb diabetis mitocondrial han demostrat que la capacitat secretora d'insulina (determinada mitjançant una prova de tolerància a la glucosa, l'excreció urinària de pèptid C i/o el test de glucagó) està disminuïda en la majoria de pacients portadors de la mutació A3243G (180). Així mateix, estudis d'autòpsies en aquests individus han mostrat la presència d'atròfia dels illots pancreàtics amb una reducció important en el número de cèl·lules β .

La mutació puntual en el gen ARNt^{LEU (UUR)} en la posició 3243 de l'ADNmt ha estat documentada en aproximadament un 1% de diabètics adults estudiats (181), en situació d'heteroplàsmia, variant la seva prevalència entre un 0.2 i un 2.8 % segons el

grup ètnic estudiat i els mètodes emprats pel seu diagnòstic (182-184). En pacients amb diabetis no tipus 1 diagnosticada abans del 40 anys i/o amb història familiar de diabetis, la prevalència augmenta al 4%.

Fenotípicament aquest tipus de diabetis mitocondrial presenta característiques clíniques diferencials envers la diabetis tipus 2 clàssica:

- Associació a sordesa neurosensorial, present en el 60% de pacients, en ocasions severa, requerint l'ús de pròtesis auditives (169, 180).
- Edat d'inici generalment abans del 40 anys, amb un rang d'edat 25-35 anys (180, 185).
- Absència d'obesitat en la majoria d'individus afectes, sent l'índex de massa corporal en general inferior a 27 Kg/m² (180, 185).
- Deteriorament progressiu de la secreció d'insulina, amb un requeriment més ràpid de tractament amb insulina (186).
- Disfunció de les cèl·lules α pancreàtiques. Així, s'ha descrit en pacients portadors de la mutació A3243G un defecte de la secreció de glucagó mitjançant el test d'infusió amb arginina (187).
- Absència d'associació a processos autoimmunes així com a haplotips HLA específics en la majoria de pacients (180, 188). Això no obstant, en alguns pacients s'han detectat anticossos ICA (antiillot pancreàtic) i/o GAD (antidescarboxilasa de l'àcid glutàmic) (189), i en estudis practicats per Kobayashi *i col.* pacients diabètics portadors de la mutació A3243G amb ICAS positius van presentar una freqüència augmentada del subtipus molecular HLA-DQ β 1*0301 (190).
- Elevada freqüència de retinopatia (185, 188) i trastorns cardíacs (alteracions electrocardiogràfiques i/o ecocardiogràfiques) (191).
- Absència de manifestacions clíniques de la síndrome MELAS, i presència de RRF (*ragged red fibers*: fibres musculars desestructurades amb tinció

amb tricròmic de Gomori), en escassa proporció en les biòpsies de la musculatura esquelètica dels pacients afectes (192).

- Potencial eficàcia terapèutica de la coenzima Q₁₀ en la prevenció del progressiu deteriorament de la secreció d'insulina (193).

Finalment, ha estat reportada recentment en població japonesa una nova mutació de l'ADNmt, la mutació T14577C, que causa la substitució de l'aminoàcid valina per isoleucina al codó 33 del gen de la NAD deshidrogenasa 6, en la qual el probable mecanisme diabetogènic seria la reducció de l'activitat del complex I de la cadena respiratòria mitocondrial (194).

1.13- Gen del receptor adrenèrgic β 3

El receptor adrenèrgic β 3 s'expressa predominantment en teixit adipós visceral, on exerceix un important paper estimulant la lipòlisi i la termogènesi, i s'ha postulat que la disfunció d'aquest receptor estaria implicada en la patogènia de l'obesitat i resistència a la insulina en humans (195). Estudis moleculars han identificat la presència de la mutació W64R en el gen del receptor adrenèrgic β 3, que causa la substitució de triptòfan per arginina en posició 64. Aquesta mutació és freqüent en indis Pima, associant-se a una edat més precoç de presentació de diabetis en aquesta població (196). Estudis en població finlandesa i en americans d'origen japonès han reportat una associació de la mutació a obesitat abdominal i resistència a la insulina (197, 198), mentre que en població francesa s'ha associat a un augment de la predisposició a guanyar pes en pacients amb obesitat mòrbida (199). D'altra banda, estudis en població japonesa han detectat una major freqüència de presentació de retinopatia proliferativa així com de nefropatia en pacients amb diabetis tipus 2 portadors de la mutació W64R (200, 201).

1.14- Gen MAPK8IP1

El gen MAPK8IP1, ubicat en el cromosoma 11p11.2-p12 i que conté 12 exons (202), ha estat recentment proposat com a gen candidat en la diabetis tipus 2. MAPK8IP1 codifica el factor de transcripció IB-1 (“*islet-brain-1*”), que s’expressa fonamentalment en illots pancreàtics i cervell. IB-1 és una proteïna de 714 aminoàcids relacionada amb JIP-1 (inhibidor de la proteïna-1 cinasa aminoterminal c-Jun), per tant actuaria prevenint la via d’activació de c-Jun, que és un repressor de l’expressió del gen de la insulina (203, 204). A més a més, IB-1 actuaria regulant l’activitat transcripcional del gen del transportador de glucosa GLUT-2, mitjançant la unió a l’element GTII del seu promotor (205). Recentment, Waeber *i col.* han identificat una mutació en la regió codificant de MAPK8IP1 en una família francesa amb diabetis tipus 2 (206). Aquesta mutació consisteix en el canvi AGC→AAC a l’exó 2 del gen, resultant en la substitució de serina per asparagina al codó 59 (mutació S59N), i cosegrega amb diabetis, sent heterozigots tots el membres afectes de l’esmentada família. Estudis *in vitro* han mostrat que la mutació provoca l’abolició de l’efecte inhibidor de IB-1 en la via de c-Jun, i indiquen que una alteració de la funció de IB-1 podria fer més susceptible la cèl·lula β a estímuls apoptòtics.

1.15- Gen PPAR- γ

PPAR- γ (“*peroxisome proliferator activated receptor γ* ”) és un membre de la família de receptors nuclears PPAR, i actua com a factor de transcripció regulant la diferenciació dels adipòcits (207), a més de exercir un paper crític en la modulació de la sensibilitat a la insulina, sent les tiazolidindiones activadors selectius i potents d’aquest receptor (208, 209).

El gen de PPAR- γ està ubicat en el cromosoma 3p-25 (210), existint dos isoformes (PPAR- γ 1 i PPAR- γ 2) com a resultat d'un alternatiu "splicing" (procés de formació d'mARN madur, amb separació dels introns dels exons). Les dos isoformes es diferencien en l'extensió aminoterminal de 28 aminoàcids, només present en PPAR- γ 2, que proporciona una capacitat d'activació transcripcional 5-10 vegades superior en relació a PPAR- γ 1. Mentre que PPAR- γ 2 s'expressa quasi exclusivament en teixit adipós, PPAR- γ 1 és expressat en diversos teixits, incloent-hi teixit adipós (211, 212).

La presència de la freqüent mutació P12A en PPAR- γ 2, consistent en el canvi CCA→GCA al codó 12 i que causa la substitució de prolina per alanina, s'ha associat a una sensibilitat augmentada a la insulina i a risc disminuït de diabetis tipus 2 (213, 214).

D'altra banda, un estudi recent ha identificat la presència de dos mutacions en heterozigosi en PPAR γ (215): P467L (consistent en el canvi CCG→CTG al codó 467, que dona lloc a la substitució de prolina per leucina), i V467M (consistent en el canvi GTG→ATG al codó 467, causant la substitució de valina per metionina). Fenotípicament, ambdós mutacions s'associen a una severa resistència a la insulina, diabetis tipus 2 d'aparició precoç, i hipertensió arterial.

1.16- Gen RAD (Ras associat a diabetis)

El gen RAD (Ras associat a diabetis) seria un nou candidat per la susceptibilitat genètica a la diabetis. Es tracta d'un membre de la família Ras, ubicat en el cromosoma 16q, inclòs en la via de senyalització de la insulina, i que característicament està sobreexpressat en múscul de pacients amb diabetis tipus 2 (216). Estudis recents han detectat una possible associació entre determinats al·lels i diabetis tipus 2 (217, 218).

1.17- Gen del receptor 1 de sulfanilurees (SUR.1)

El receptor 1 de sulfanilurees (SUR1) constitueix una de les subunitats que formen els canals de potassi en la cèl·lula β pancreàtica. El gen codificant de SUR1 està ubicat en el cromosoma 11p15.1 i consta de 39 exons (219). SUR1 exerceix un paper fonamental en la secreció regulada d'insulina, havent-se identificat mutacions en el gen de SUR1 en pacients amb hipoglucèmia hiperinsulinèmica persistent de la infantesa (220). La possible implicació de mutacions de SUR1 en l'etiopatogènia de la diabetis tipus 2 és controvertida, ja que s'han publicat associacions tant positives com negatives (221, 222)

1.18- Gen CAPN10

Estudis previs de lligament efectuats en població americana d'origen mexicà havien detectat una nova regió cromosòmica candidata en la susceptibilitat genètica a diabetis tipus 2, designada NIDDM1 i localitzada en el cromosoma 2, banda 2q37.3. Recentment s'ha descrit la ubicació d'aquest nou gen, designat CAPN10, entre els marcadors D2S125 i D2S140, i que consta de 15 exons (223). Com a resultat d'un complex procés de *splicing* alternatiu, es produeixen diferents ARN_m, generant proteïnes de 672, 544, 517, 513, 274, 139 i 138 aminoàcids, sent la isoforma de 672 aminoàcids la més abundant en els diversos teixits examinats. El producte codificat és una proteïna pertanyent a la família de les proteases no lisosomals depenents del calci, de localització ubiqüa en tots els teixits, la calpaïna 10. Les calpaïnes són enzims implicats en processos de proliferació i diferenciació cel·lular, així com en la regulació de senyals intracel·lulars. Concretament, actuen sobre el substrat del receptor insulínic-1 o IRS-1, tal com hem comentat prèviament. S'ha detectat la presència de diversos polimorfismes, localitzats tant en les regions codificants del gen com en les intròniques, associades a diabetis tipus 2 en dos poblacions de diferent origen ètnic:

americans d'origen mexicà i en població caucàsica de la regió finlandesa de Botnia. Això no obstant, encara no ha estat determinat el mecanisme a través del qual variacions genètiques en CAPN10 poden conferir susceptibilitat a la diabetis tipus 2.

1.19- Gen de l'amilina

El gen humà de l'amilina està ubicat en el braç curt del cromosoma 12 i conté 3 exons, dels quals l'exó 1 no és codificant. Estudis en població japonesa han detectat la presència d'una mutació a l'exó 3 del gen en un 4% de pacients amb diabetis tipus 2, consistent en la substitució d'una serina per glicina en posició 20 de la molècula de l'amilina (mutació S20G) (224). Aquesta relació entre la mutació S20G i diabetis tipus 2 no ha estat detectada en altres poblacions estudiades (225-228), suggerint la presència de factors ètnics associats. El gen de l'amilina és objecte de la present tesi doctoral, i a ell em referiré extensament en la segona part d'aquesta introducció.

2.- Amiloide i diabetis tipus 2

2.1- Història i terminologia

La presència de dipòsits d'amiloide reemplaçant les cèl·lules endocrines en els illots pancreàtics ha estat reconeguda des de començaments de segle com una troballa histològica característica en el pàncrees de pacients amb diabetis tipus 2. Aquests dipòsits foren originalment descrits com “degeneració hialina dels illots de Langerhans” per Eugene L. Opie (229). El principal component proteic dels dipòsits descrits per Opie va ser identificat per Westermark *et al.* a partir d'un insulinoma pancreàtic (230, 231). El nou pèptid fou anomenat “insulinoma amyloid peptide”, sent purificat i seqüenciat parcialment. Posteriorment, Cooper *et al.* (232) van aïllar un pèptid idèntic en extractes de teixit pancreàtic ric en amiloide procedents de pacients amb diabetis tipus 2. La terminologia anglosaxona utilitzada per designar el mateix pèptid ha estat molt variada, incloent “Diabetes-Associated Peptide” (DAP), “Insulinoma Amyloid Peptide” (IAP), “Islet Amyloid Polypeptide” (IAPP) i “Amylin”. En aquesta tesi el terme utilitzat per designar el pèptid serà amilina.

2.2- Amiloide i amiloïdosis

En el terme d'amiloïdosis s'engloba un grup d'entitats clíniques caracteritzades pel dipòsit extracel·lular de proteïnes d'estructura fibril·lar en òrgans i teixits. Algunes formes d'amiloïdosis van ser considerades com un fenomen inespecífic associat al procés d'envelliment. No obstant, l'augment de la longevitat i la millor definició clínica de les malalties cròniques ha mostrat que el dipòsit d'amiloide és específic per a determinades malalties, com són les plaques d'amiloide en la malaltia d'Alzheimer o l'amiloide dels illots pancreàtics en la diabetis tipus 2.

El terme amiloide va ser introduït per Virchow en 1853, basant-se en les característiques tintorials dels dipòsits amorfs en les seccions histològiques: els òrgans infiltrats adquirien coloració negrenca al ser tractats amb iode, de forma anàloga al midó (del grec "Amylos", midó).

Malgrat que cada tipus d'amiloïdosi es caracteritza per la deposició d'una proteïna fibril·lar específica, els dipòsits de substància amiloide comparteixen característiques histoquímiques patognòmiques i una morfologia estructural semblant:

- Les molècules proteiques presenten una estructura secundària en conformació β , en la qual les cadenes polipeptídiques estan disposades en làmines plegades (233), que es troben unides transversalment mitjançant enllaços d'hidrogen intercatenaris. Aquesta conformació determina les característiques òptiques i tintorials.
- Presència d'una estructura quaternària amb un aspecte típic al microscopi electrònic (234, 235), en el qual la substància amiloide està constituïda per agregats fibril·lars rígids, lineals, no ramificats, de 7-10 nm de diàmetre i de longitud variable, amb un centre buit.
- Birrefringència de coloració verdosa en l'examen amb microscopi de llum polaritzada després de tinció amb vermell Congo.
- Elevada insolubilitat en medis fisiològics.
- Resistència a digestió proteolítica.
- Presència d'altres components. Tots els dipòsits d'amiloide, independentment de la proteïna específica formadora de fibril·les i responsable de la malaltia, contenen proteïnes comunes, com la glicoproteïna anomenada component P, que també pot ser detectada circulant en plasma (SAP: "*serum amyloid protein*") (236) i proteoglicans del tipus heparan sulfat. El component P humà està relacionat amb la proteïna C reactiva de fase aguda i pot unir-se a

qualsevol tipus de fibra de substància amiloide (237). Estudis *in vitro* han demostrat que la unió d'aquesta glicoproteïna al dipòsits d'amiloide protegeix les fibres de degradació proteolítica, mentre que estudis en ratolins en els que el gen codificant pel component P ha sigut inactivat, han mostrat un retard en l'inici de l'amiloïdosi i una menor severitat del procés (238).

Dos fets han permès establir criteris fermes en el coneixement i classificació de les diferents formes d'amiloïdosis (239). El primer, la definició unitària i estructural de la fibra de substància amiloide que es troba sempre, qualsevol que sigui el seu origen i localització. En segon lloc, el reconeixement del seu origen múltiple associant-se a una gran varietat de processos patològics que, mitjançant diversos mecanismes patogenètics, explicarien les diferències en la seva composició. A part de les amiloïdosis localitzades, les formes familiars i les dels hemodialitzats, les amiloïdosis sistèmiques es classifiquen en dos grans grups (240) : amiloïdosi primària o AL , en la qual les fibril·les estan constituïdes essencialment per fragments mòbils de cadenes lleugeres d'immunoglobulines (com succeeix en el mieloma múltiple), i amiloïdosi secundària o AA, en la qual el component principal està format per fibril·les de proteïna A (com succeeix en l'artritis reumatoide o en infeccions cròniques).

Els dipòsits de substància amiloide que es produeixen formant part d'un procés localitzat estan associats característicament a un òrgan específic, i són el resultat de la deposició d'un producte únic invariablement produït en aquesta localització, mentre que altres òrgans no estan afectats (241). L'amiloïdosi localitzada és el resultat de la producció d'un únic polipèptid, que conté una seqüència amiloidogènica i és capaç de presentar una estructura secundària en làmina β . En el cas de la malaltia d'Alzheimer, aquest pèptid és la proteïna amiloide- β ($A\beta$) (242); en el carcinoma medul·lar de tiroide, és la calcitonina (243); en la diabetis tipus 2, és l'amilina (230-232). En cada cas, però, aquests pèptids no són els únics components dels dipòsits de substància

amiloide. De forma anàloga a les formes sistèmiques, aquest dipòsits localitzats poden contenir altres components, com el component P (236), els components del Complement C1q i C3 (244) , l'apolipoproteïna E (245, 246) i l'heparan sulfat proteoglican perlecan (247). El fet de que algunes d'aquestes molècules poden ser comunes a diferents formes d'amiloïdosis suggereix un potencial paper patogènic en la formació dels dipòsits. No obstant, sempre és condició indispensable la presència del pèptid específic per la formació de fibril·les de substància amiloide, que constitueixen la base dels dipòsits visibles en l'estudi microscòpic.

2.3- Amiloide i diabetis tipus 2

La diabetis tipus 2 és una malaltia heterogènia i multifactorial caracteritzada per alteracions en l'acció de la insulina (resistència a la insulina) i en la secreció de la insulina (fracàs de la cèl·lula β). La contribució relativa de cada un d'aquests defectes és variable entre pacients, i també durant el curs evolutiu de la malaltia (248). Ha estat motiu de gran controvèrsia – i encara actualment es debat- si el deteriorament de la secreció o bé de l'acció de la insulina és el defecte patògenic primari en la diabetis tipus 2. Malgrat aquesta dicotomia, l'opinió més generalitzada és que la disrupció de la normal relació entre la funció de la cèl·lula β i la sensibilitat a la insulina és central en la patogènia de la diabetis tipus 2 (249). A més a més, ambdós factors estan interconnectats fisiològicament a múltiples nivells. Així, una resistència a la insulina en els principals òrgans diana (fetge i múscul esquelètic) pot ser inicialment compensada amb un increment en la secreció de la insulina o hiperinsulinèmia, de tal manera que no es produeix una hiperglucèmia franca fins l'establiment d'una deterioració de la funció de la cèl·lula β (250).

Ha estat llargament qüestionat si la presència de dipòsits de substància amiloide pot estar involucrada en la patogènia de la diabetis tipus 2, o simplement es tracta de la conseqüència de la malaltia. No obstant, el fet que aquests dipòsits en

pacients amb diabetis tipus 2 estiguin associats a una reducció de la població cel·lular β , suggereix que poden constituir un important factor etiopatògenic en el desenvolupament del fracàs de la cèl·lula β (251).

Els dipòsits de substància amiloide apareixen en els illots pancreàtics de la immensa majoria d'individus amb una diabetis tipus 2 clínicament establerta, constituint un fet característic de la malaltia (246). Així, s'ha demostrat la presència de dipòsits de substància amiloide en les autòpsies de més del 90% de pacients amb DM tipus 2 (252, 253). En alguns individus, només es troba afectat un reduït número d'illots, però en molts pacients els dipòsits són difusos afectant nombrosos illots. El fet que la presència d'amiloide hagi estat detectada en mostres d'autòpsies procedents de diferents poblacions, suggereix que es tracta d'un fenomen universal i comú a la malaltia, i no només característic d'un grup d'individus amb la síndrome (252, 253). Així mateix, s'ha observat la presència de dipòsits de substància amiloide en individus no diabètics d'edat avançada (253), però amb una notable reducció en freqüència i severitat. La prevalença dels dipòsits augmenta amb l'edat, la qual cosa no és sorprenent donat que el procés d'envelliment s'associa a un deteriorament de la tolerància a la glucosa i a un increment de la prevalència de la DM tipus 2 (254). Pacients que requereixen tractament amb insulina presenten dipòsits d'amiloide més prominents i difusos, juntament amb una reducció més important de la massa cel·lular β , indicant que el grau d'amiloïdosi en els illots pancreàtics pot estar relacionada amb la severitat de la malaltia (255). D'altra banda, la presència d'amiloide en altres espècies animals que també poden desenvolupar diabetis, com són gats (256) i primats humans (257), recolza la hipòtesi d'una relació causal entre amiloïdosi i diabetis tipus 2.

És important recordar que encara que la formació d'amiloide en els illots pancreàtics constitueix un fet característic de la diabetis tipus 2, no només es produeix

en aquesta malaltia. Així també, s'ha detectat la presència d'amiloide en pacients humans amb insulinomas (258), tumors de cèl·lules β caracteritzats per anomalies en el processament i la secreció de pèptids. Donat que la diabetis tipus 2 de forma anàloga presenta una alteració en el processament i secreció de pèptids, s'ha suggerit que aquest podria constituir un dels possibles mecanismes desencadenants del procés de formació de fibres d'amiloide en ambdós processos (259).

2.4- Amiloide i amilina

2.4.1 Estructura de l'amilina humana

L'amilina és un pèptid de 37 aminoàcids (veure Figura 6) que constitueix el principal component dels dipòsits d'amiloide detectats en els illots pancreàtics de subjectes amb diabetis tipus 2 (230, 231, 256, 260). Es tracta d'un pèptid sintetitzat i cosecretat amb la insulina per la cèl·lula β pancreàtica, en resposta als mateixos estímuls secretagogs (261-264). Presenta una homologia estructural del 43% i 49%, respectivament, amb els neuropèptids CGRP-1 i CGRP-2 (sigles per "*calcitonin gene-related peptide*"), sintetitzats per les cèl·lules C de la glàndula tiroide com a resultat d'un *splicing* alternatiu dels gens CALC, ubicats en el cromosoma 11 (265). Els tres pèptids tenen una longitud idèntica i presenten dos modificacions postraduccionalment homòlogues (amidació del residu carboxiterminal i un pont disulfur intramolecular) (266). Paradoxalment, malgrat estar estretament relacionada amb els pèptids CGRP, la similitud de la seqüència de l'amilina amb la de la calcitonina no és significativa (267).

L'amilina és sintetitzada a partir d'un precursor prepropeptídic de 89 aminoàcids, la preproamilina (268). Mentre que els residus 1-37 presenten un alt grau de conservació entre les diferents espècies, els propèptids amino i carboxiterminal presenten un major grau de variabilitat, la qual cosa indica que probablement manquen d'activitat biològica. L'escissió proteolítica de la seqüència de 22 aminoàcids del pèptid

senyal en el reticle endoplasmàtic rugós allibera la proamilina, de 67 aminoàcids. Les modificacions postraduccionals inclouen l'alliberament de l'amilina madura per l'escissió proteolítica de la molècula en els senyals dibàsics lisina-arginina, amb pèrdua dels propèptids aminoterminal, (11 aminoàcids), i carboxiterminal (19 aminoàcids), i la formació d'un pont disulfur entre els residus 2 i 7 de cisteïna. A l'extrem carboxiterminal, el senyal dibàsic està precedit d'una glicina, fet que permet l'amidació de la tirosina en posició 37 de l'amilina madura. Aquestes modificacions postraduccionals es requereixen per l'activitat biològica del pèptid. Si la proamilina és alliberada a la circulació o si aquest precursor presenta activitat biològica es desconeix en la actualitat.

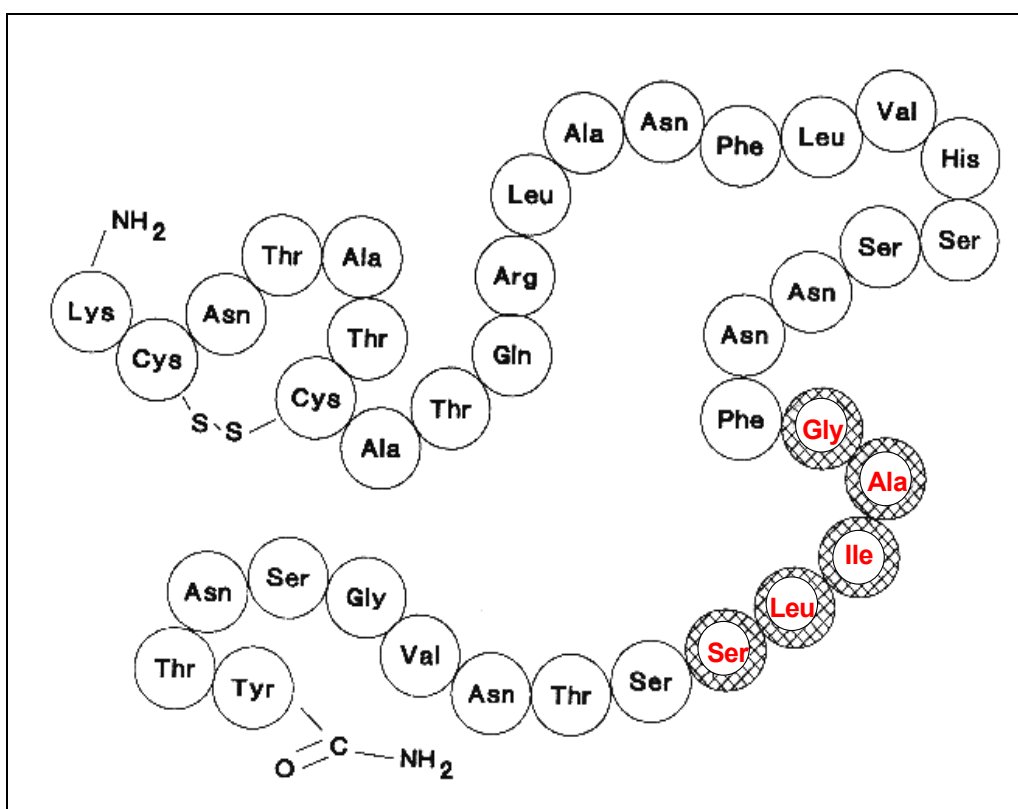


Figura 6. Seqüència d'aminoàcids de l'amilina humana. Els aminoàcids 24-28 (representats amb el cercles ratllats: Gly-Ala-Ile-Leu-Ser) són importants per les propietats amiloidogèniques de la molècula.

No es coneix amb certesa quines són les endoproteases responsables del processament *in vivo* de la proamilina humana. No obstant, el fet que l'amilina estigui

colocalitzada amb la insulina en els grànuls de les cèl·lules β (261, 269) i que la proinsulina humana sigui processada per l'acció combinada de PC2 i PC3 (270), suggereix que aquestes endopeptidases podrien ser responsables també del processament de la proamilina. Estudis *in vitro* efectuats en oòcits de *Xenopus* han mostrat que fonamentalment la convertasa PC2 i no la PC3 o furina estaria implicada en la conversió de proamilina en amilina madura (271). Donat que pacients amb diabetis tipus 2 presenten un increment desproporcionat dels nivells de proinsulina (272, 273), un processament anormal de la proamilina podria constituir un factor patogènic en la formació d'amiloide en la diabetis tipus 2. En aquest sentit, un estudi recent ha demostrat la presència d'una proteòlisi seqüencial i coincident de la proinsulina i proamilina per convertases recombinants PC2 i PC3, suggerint que la secreció augmentada de proinsulina en la diabetis tipus 2 podria cursar també amb una producció incrementada de proamilina (274).

2.4.2 Estructura del gen de l'amilina

Mosselman i col. van identificar la seqüència del gen de l'amilina (275), el qual està ubicat en el braç curt del cromosoma 12, en la regió 12p12.3-12.1 (276). Els estretament relacionats gens CALC (gen CALC-A codificant per la calcitonina i pel neuropèptid CGRP-1, i gen CALB codificant pel neuropèptid CGRP-1) estan ubicats al cromosoma 11. La important homologia entre la seqüència dels gens CALC i del gen de l'amilina i la relació evolutiva entre els cromosomes 11 i 12 ha suggerit l'existència d'un gen ancestral comú (277).

El gen humà de l'amilina és un gen de còpia única, d'aproximadament 6.6 Kb, que està constituït per 3 exons i 2 introns, dels quals l'exó 1 és no codificant mentre que l'exó 3 codifica la major part del propèptid (278). L'exó 1 (103 pb) conté la major part de la regió 5' no traduïda de l'ARN missatger o regió 5'UTR (sigles de "5' *untranslated region*"). L'exó 2 (95 pb) conté el codó ATG d'inici de la traducció i

codifica el pèptid senyal i els primers 9 aminoàcids del propèptid aminoterminal. L'exó 3 (1.2 Kb) codifica la resta del propèptid aminoterminal, el propèptid carboxiterminal, la seqüència completa de l'amilina madura, així com la regió 3'UTR. Els exons estan separats per introns de 330 pb i 4.8 Kb, respectivament, i el punt d'inici de la transcripció es produeix 31 pb en direcció 3' de la caixa TATA. La Figura 7 mostra una representació esquemàtica del gen humà de l'amilina.

Estudis en insulinomas han identificat la presència quatre senyals diferents de poliadenilació en el gen de l'amilina humana (A1, A2, A3 i A4), que donen lloc a ARN missatgers de diferents tamanys: 1.2 Kb (A1), 1.6 Kb (A2) i 2.1 Kb (A3/A4) (279).

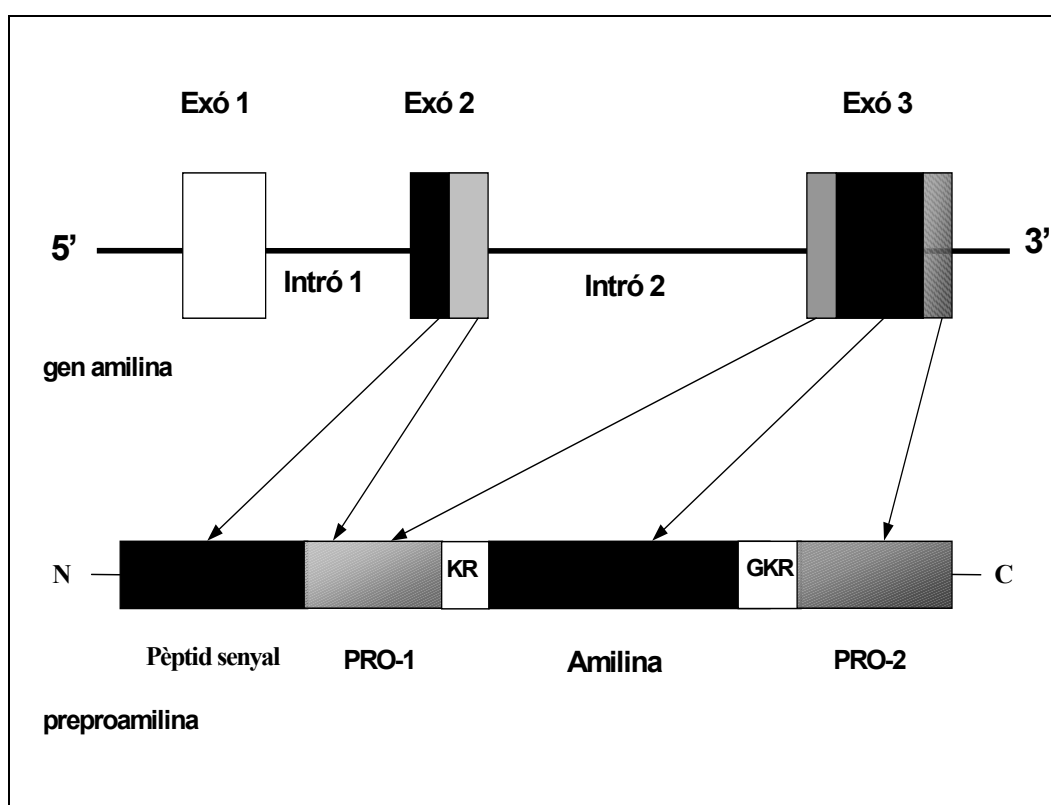


Figura 7. Representació esquemàtica del gen humà de l'amilina i preproamilina. Els exons i introns del gen estan representats en relació a la seqüència del propèptid. KR i GKR: senyals dibàsics, punts d'escissió proteolítica de la molècula per endopeptidases (G: glicina, K: lisina, R: arginina). PRO-1: propèptid aminoterminal. PRO-2: propèptid carboxiterminal.

2.4.3 Estructura de la regió promotora del gen de l'amilina

L'expressió del gen de l'amilina a la cèl·lula β està fonamentalment regulada per seqüències proximals promotores. Aquestes seqüències que controlen l'expressió tissular específica estan localitzades entre els nucleòtids -2798 i +450 del gen humà de l'amilina (280), havent-se detectat que les seqüències entre -222 i +450 bp són necessàries per la transcripció del gen (281). Estudis de mutagènesi i de deleció seqüencial han posat de manifest la presència de diversos elements en la regió promotora del gen de l'amilina (elements cis) que regularien la transcripció gènica mitjançant la unió a factors proteics positius i/o negatius (elements trans) (281, 282). A més a més, s'ha demostrat que aquesta regió promotora conté elements homòlegs al promotor dels gens de la insulina humana i de rata (283, 284).

S'ha detectat un motiu TAAT proximal (-87/-82 pb), i un motiu TAAT distal homòleg a l'element FAR, anomenat caixa IAPP-FAR, que correspondria a la seqüència AAGATGGC (-245/-238 bp). Així mateix, la seqüència de nucleòtids TGATGTCA (-61/-54) s'assembla a la de l'element CRE ("*cAMP-responsive element*" o element de resposta a AMPc) descrit en el promotor del gen de la insulina (CRE amb la substitució d'una citosina per una timina). A diferència d'aquest, estudis efectuats per Mosselman i col. han suggerit que es tracta d'un CRE no funcional (282).

D'altra banda, s'han identificat tres elements positius de regulació, homòlegs a les caixes CT del gen de la insulina: A1 (-91/-84 pb), A2 (-154/-142 pb) i A3 (-172/-163), elements rics en adenina/timina, que constituïrien els llocs d'unió del factor de transcripció PDX 1 al promotor del gen de l'amilina (281, 285). El factor PDX1 (sigles de "*pancreatic and duodenal homeobox factor 1*", també anomenat IPF1, "*insulin promoter factor 1*", o IUF1, "*insulin upstream factor 1*") és una proteïna expressada selectivament en cèl·lules del pàncrees i duodè que és essencial per la diferenciació

del pàncrees i la regulació de la transcripció del gens de la insulina i de l'amilina (286-289). Estudis amb ratolins en els que el gen de PDX1 ha sigut inactivat, han mostrat que aquests desenvolupen diabetis i han demostrat que aquest factor es requereix per mantenir el fenotipus de cèl·lula β , regulant positivament l'expressió de la insulina i de l'amilina i reprimint l'expressió del glucagó (290).

Se sap que l'estimulació de l'activitat transcripcional del gen de la insulina en resposta a la glucosa és mitjançada pel factor PDX1 (291, 292). Recentment, s'ha descrit la via de senyalització intracel·lular que enllaça el metabolisme de la glucosa amb la regulació de la unió del factor PDX1 a l'ADN i amb l'activitat del promotor de la insulina (293). Segons aquest model, la glucosa estimularia l'activitat de la fosfatidilinositol 3-cinasa, la qual a continuació activaria la proteïna cinasa-2 (també anomenada p38 o SAPK2, sigles de "*stress-activated protein Kinase 2*") (294). Això conduiria a la fosforilació i activació de la forma citoplasmàtica de PDX1 (proteïna inactiva de 31 K-Da), amb conversió a una forma activa de la proteïna (de 46 K-Da), que migraria al nucli, on finalment activaria la transcripció del gen de la insulina. En contraposició, es desconeix en gran part la via de senyalització intracel·lular que enllaça PDX1 amb l'activació del promotor de l'amilina. Sembla ser que PDX1 regularia la transcripció del gen de l'amilina interaccionant fonamentalment amb els elements A1 i A2 (281).

Altre element de regulació positiva en el promotor de l'amilina estaria constituït per la seqüència CCATCCGC (-138/-131 pb), que és semblant a l'element d'unió a proteïnes B-HLH (anomenat "*B-HLH-like binding site*", sigles de "*basic helix-loop-helix*") descrit en el promotor de la insulina (283, 295). Les proteïnes de la família B-HLH actuarien regulant la transcripció del gen de la insulina (296), però s'ha demostrat que aquest element en el promotor de l'amilina no seria funcionalment equivalent al del

promotor de la insulina (283), i en l'actualitat es desconeix quin és el factor proteic trans corresponent.

Finalment, s'han identificat elements de regulació negativa, a -111/-102 pb (281, 282), desconeixent-se també el factor trans que interaccionaria amb aquesta seqüència.

2.4.4 Localització i expressió de l'amilina

2.4.4.1 Expressió de l'amilina en el pàncrees endocrí

En pràcticament totes les espècies estudiades fins a l'actualitat, l'amilina s'expressa fonamentalment en les cèl·lules β dels illots pancreàtics (230, 261, 297). No existeixen evidències a favor d'una possible producció d'amilina en teixit pancreàtic exocrí. S'ha identificat immunoreactivitat per amilina en cèl·lules fetals pluripotencials insulars (298), i l'amilina pot estar coexpressada amb glucagó (cèl·lules α) o somatostatina (cèl·lules δ) en línies cel·lulars transformades derivades d'illots neonatals de rata (299). En rosegadors adults, també s'ha identificat immunoreactivitat per amilina en cèl·lules δ (300), però en illots humans només s'ha detectat en cèl·lules β .

Estudis ontogènics han demostrat que l'expressió de l'amilina en els illots apareix en un fase precoç del desenvolupament. Així, en el pàncrees fetal humà, es detecta immunoreactivitat per amilina a partir de la setmana 13, mentre que la immunoreactivitat per insulina està ja present en la 9^a setmana gestacional (301). A l'edat gestacional de 13-16 setmanes, les cèl·lules positives per insulina són vint vegades més freqüents que les positives per amilina, diferència que va desapareixent gradualment fins a igualar-se en el teixit adult. A la cèl·lula β adulta, la relació entre la quantitat de l'ARNm de l'amilina i de la insulina és 1:10.

La immunoreactivitat per amilina ha estat colocalitzada amb insulina en l'aparell de Golgi i en el compartiment granular de la cèl·lula β , tant en individus amb diabetis com en no diabètics (261). Així mateix, s'ha detectat immunoreactivitat pels propèptids amino i carboxiterminal en el compartiment granular de la cèl·lula β en subjectes diabètics i no diabètics (261, 302). D'altra banda, la immunoreactivitat per amilina està disminuïda en cèl·lules humanes β adjacents als dipòsits d'amiloide, en comparació a les que es troben associades a aquests. No obstant, és improbable que aquest fet sigui degut a una producció disminuïda d'amilina, ja que experiments d'hibridació *in situ* han mostrat nivells d'expressió del pèptid similars en illots amb i sense dipòsits d'amiloide (303). Aquests resultats probablement indiquen l'existència d'un emmagatzemament disminuït de l'amilina en les cèl·lules β adjacents als dipòsits. Altrament, estudis practicats en gats han detectat l'associació de diabetis amb una immunoreactivitat disminuïda per amilina, mentre que quan aquests animals presentaven intolerància a la glucosa, la immunoreactivitat estava augmentada (304). No obstant, s'ha de tenir en compte que els nivells d'immunoreactivitat per amilina detectats en la cèl·lula β no es correlacionen amb el nivell de producció/secreció del pèptid.

La major concentració intracel·lular d'immunoreactivitat per amilina ha sigut detectada en els lisosomes de la cèl·lula β , tant en estudis en humans com en simis (261). Així mateix s'ha demostrat acumulació lisosomal en ratolins transgènics que sobreexpressen l'amilina humana però no en aquells que sobreexpressen la de rata (305). D'altre banda, també s'ha detectat immunoreactivitat per insulina en els lisosomes, la qual cosa suggereix una via de degradació intracel·lular comuna per ambdós pèptids (306), i actualment se sap que una quantitat important d'insulina és degradada intracel·lularment a concentracions de glucosa baixes o fisiològiques. Els pèptids entren en el compartiment lisosomal per crinofàgia (fusió dels grànuls de secreció amb lisosomes) o mitjançant una via endosomal (per recaptació del contingut

dels grànuls després de l'exocitosi). Existeixen evidències morfològiques mostrant la crinofàgia dels grànuls de secreció de la cèl·lula β en diferents condicions, i es creu que podria constituir un mecanisme d'adaptació a diferents demandes funcionals (306). La manca d'immunoreactivitat per l'amilina en els lisosomes de rosegadors, suggereix que la molècula és eficientment degradada en aquests orgànuls. En contraposició, la presència d'una important immunoreactivitat per l'amilina humana en els lisosomes, suggereix que aquesta molècula relativament insoluble seria retinguda durant un llarg període en aquest compartiment sense ser degradada pels enzims lisosomals. Donat que l'amilina humana sintètica polimeritza formant fibril·les en solucions concentrades *in vitro*, l'acúmulo de l'amilina en el compartiment lisosomal podria constituir un potencial lloc d'inici de l'amiloidogènesi *in vivo*.

2.4.4.2 Expressió de l'amilina en tumors neuroendocrins i en línies cel·lulars

L'amilina és expressada en insulinomes (259, 307) i en altres tumors neuroendocrins, incloent-hi gastrinomes, VIPomes, glucagonomes, tumors carcinoides i PPomas (308-310). S'ha demostrat en diversos tumors neuroendocrins d'origen caní la presència d'amilina associada tant a les cèl·lules tumorals com a l'amilioide extracel·lular que és freqüentment present en aquests tumors (311). Aquests estudis en tumors neuroendocrins han mostrat generalment coexpressió d'amilina i insulina, però amb diferències significatives en la regulació d'ambdós pèptids (259).

Madsen i col. (299) han demostrat que l'expressió d'amilina està restringida a la cèl·lula β en estudis *in vivo* amb línies cel·lulars tumorals fenotípicament estables MSL-G2-IN (insulinoma) i MSL-G-AN (glucagonoma), així com amb les línies cel·lulars beta-Tc i alfa-Tc, derivades de ratolins transgènics. No obstant, en clons heterogenis inestables, com és la línia cel·lular NHI-6F, l'expressió d'amilina i insulina estan completament dissociades. En aquest clon, l'amilina és sobreexpressada amb el

glucagó en condicions *in vitro*, mentre que l'expressió del gen de la insulina esdevé dominant *in vivo*. Els autors proposen que la coexpressió de l'amilina amb altres hormones diferents a la insulina podria constituir un marcador de cèl·lules tumorals pluripotencials d'origen insular, que serien capaces d'activar la transcripció del gen de la insulina *in vivo*.

2.4.4.3 Expressió de l'amilina en teixits no pancreàtics

S'ha detectat expressió de l'amilina en el tracte gastrointestinal, pulmó i sistema nerviós, encara que a nivells notablement reduïts en relació a pàncrees (312). D'aquestes localitzacions, la millor estudiada ha sigut el tracte gastrointestinal, on s'ha detectat immunoreactivitat per amilina des de l'estómac fins al recte (313). Els nivells més importants d'expressió s'han detectat a l'estómac, concretament a l'antra pilòric, que representa 1-2% de la detectada en teixit pancreàtic, sent colon la segona localització en importància (314).

S'ha descrit la presència en l'antra pilòric d'un cert nombre de cèl·lules que contenen amilina, tant en humans com en rosegadors, així com, en nombre més reduït, en duodè i recte (313). Aquestes cèl·lules presenten prolongacions citoplasmàtiques que permeten l'establiment d'un contacte intercel·lular. Cal destacar que l'amilina en el tracte intestinal no es colocalitza amb altres pèptids, com gastrina, somatostatina, polipèptid vasoactiu intestinal (VIP, sigles de "*vasoactive intestinal polypeptide*"), PP, insulina o glucagó.

Finalment, també s'ha detectat expressió d'amilina en pulmó i arrels nervioses dels ganglis dorsals (312, 315).

2.4.5 Secreció de l'amilina

L'amilina és cosecretada amb la insulina en condicions basals i en resposta als mateixos estímuls secretagogs (262-264). Estudis amb cèl·lules β isolades, illots pancreàtics i en el model de pàncrees perfós han mostrat que, en la majoria de condicions, els canvis en la secreció de l'amilina es produeixen en paral·lel als canvis en la secreció de la insulina, i representen 1-20% de la producció d'insulina en relació molar (316-319). S'ha suggerit que canvis en aquest quocient molar amilina/insulina podrien estar involucrats en el desenvolupament de la diabetis tipus 2. D'altra banda, experiments en illots pancreàtics humans i de rata sotmesos a estimulació perllongada amb concentracions de glucosa elevades han suggerit que aquesta secreció d'ambdós pèptids no es produeix sempre de forma estrictament coordinada (320, 321).

L'amilina circula en plasma a concentracions picomolars. Els mètodes disponibles per a la determinació de les concentracions plasmàtiques d'amilina han demostrat que existeixen considerables variacions entre els nivells detectats en individus normals sans i en pacients amb diabetis. En subjectes no diabètics i no obesos les concentracions basals d'amilina oscil·len entre 2 i 13 pmol/l, i augmenten de forma paral·lela a la insulina en el període postprandial o després d'una sobrecàrrega oral de glucosa fins a 5-17 pmol/l (263, 322-324). Pacients amb diabetis tipus 1 amb una severa reducció de la secreció del pèptid C, presenten també nivells plasmàtics mínims o no detectables d'amilina, corresponent aquesta pèrdua de secreció a la destrucció de cèl·lules β (325). En contrast, individus obesos en els que es detecten nivells basals i estimulats d'insulina incrementats, presenten de forma anàloga nivells augmentats d'amilina en relació a subjectes amb normopés (326-328).

En estadis inicials de la diabetis tipus 2, els nivells plasmàtics d'amilina solen estar incrementats, mentre que en el curs de la malaltia, la secreció d'amilina disminueix de forma paral·lela a la progressiva reducció de la secreció d'insulina (329, 330). D'altra banda, també la teràpia utilitzada en la diabetis tipus 2 pot influir sobre la secreció d'amilina. Així, s'ha demostrat que pacients amb DM tipus 2 en tractament amb sulfanilurees presenten concentracions postprandials d'amilina augmentades en comparació a pacients tractats amb dieta o insulina (331). S'ha hipotetitzat que aquest increment en la secreció d'amilina seria responsable d'una acceleració en el procés de deposició de fibres d'amiloide i, ulteriorment, del deteriorament de la funció cel·lular β i del fracàs secundari al tractament amb aquests fàrmacs.

Un potent estímul de la secreció d'amilina per la cèl·lula β , de forma anàloga a la insulina, és la glucosa. Ludvik i col. (332) van investigar la secreció d'amilina en resposta a una prova estàndard de tolerància oral a la glucosa (PTOG) en 10 subjectes amb tolerància a la glucosa normal, 20 subjectes obesos (12 amb tolerància normal a la glucosa i 8 amb tolerància alterada), i en 10 pacients amb diabetis tipus 2 tractats exclusivament amb dieta. Pacients amb tolerància anormal i amb diabetis tipus 2 van presentar hiperglucèmia acompanyada d'una secreció augmentada d'insulina i amilina en els primers, mentre que en els segons va cursar amb nivells reduïts d'ambdós pèptids. Cal remarcar que individus obesos amb tolerància a la glucosa normal, també van presentar nivells augmentats d'insulina i amilina en la PTOG, en comparació amb individus amb normopès. La secreció d'amilina també va ser investigada en el mateix grup de subjectes durant una prova de tolerància endovenosa a la glucosa. Pacients amb diabetis tipus 2 van mostrar una pèrdua de la primera fase o fase precoç de secreció de la insulina amb conservació de la segona fase, mentre que ambdós fases de secreció de l'amilina van resultar abolides. Aquest fet suggereix que el deteriorament de la secreció de l'amilina pot precedir el fracàs en la secreció de la insulina en pacients amb diabetis tipus 2.

Thomaseth i col. (333) van dissenyar un model matemàtic per avaluar la cinètica de secreció i d'extracció hepàtica del pèptid C, insulina i amilina durant una PTOG. El mètode va utilitzar la tècnica de cateterització de la vena hepàtica, en la qual ambdós vena hepàtica i artèria femoral resulten canulades, i els resultats van ser emprats per definir un factor de cosecreció per amilina i insulina (factor σ) en diferents subjectes. Mitjançant aquest model els autors van demostrar que el factor σ estava reduït de forma significativa en pacients amb diabetis tipus 2 en comparació a subjectes no diabètics, proporcionant més evidències a favor de que la secreció d'amilina disminueix més precoçment que la d'insulina en pacients amb diabetis tipus 2.

D'altra banda, estudis en rates amb resistència a la insulina desenvolupada com a resultat de l'administració de dexametasona, han demostrat la presència d'una secreció augmentada de l'amilina i conseqüent reducció del quocient molar insulina/amilina en comparació a animals no tractats (316).

No obstant, en l'avaluació de la relació molar amilina/insulina basada en la determinació de les concentracions plasmàtiques d'ambdós pèptids, s'ha de tenir en compte que l'aclarament plasmàtic de l'amilina és inferior al de la insulina. A diferència d'aquesta última, l'amilina és predominantment excretada via renal presentant una cinètica semblant al pèptid C (334).

En el procés d'envelliment es produeix una disminució progressiva de la secreció d'amilina, que s'associa a un deteriorament de la secreció d'insulina (335). Aquesta reducció d'ambdós pèptids tradueix el fracàs de la cèl·lula β per augmentar de forma compensadora la seva funció secretora a l'estat de resistència a la insulina que és característic d'aquest procés fisiològic (336). En contraposició, un procés associat a nivells plasmàtics augmentats d'amilina és la insuficiència renal crònica. Pacients amb

insuficiència renal poden arribar a presentar concentracions d'amilina en plasma de 25 pmol/l, mentre que després d'hemodiàlisi els nivells del pèptid experimenten una reducció fins al 50% (337, 338). Finalment, també s'ha descrit un augment de les concentracions plasmàtiques d'amilina en pacients amb diabetis gestacional en relació a dones gestants amb tolerància oral a la glucosa normal (339, 340).

2.5- Altres components de l'amiloide pancreàtic de potencial importància

L'examen de mostres d'autòpsies procedents de pacients amb diabetis tipus 2 ha demostrat la presència d'almenys dos components addicionals en els dipòsits de substància amiloide en els illots pancreàtics: l'apoproteïna E (apo E) i l'heparan sulfat proteoglicà perlecan. Ambdós proteïnes han estat també identificades en altres formes d'amiloïdosis (241).

L'apo E és una proteïna d'origen hepàtic que s'expressa en la superfície de les lipoproteïnes circulants en plasma que són riques en triglicèrids: quilomicrons, VLDL, IDL i LDL. Desenvolupa una funció crítica en l'aclarament de les lipoproteïnes aterogèniques remanents en l'espai vascular unint-se al receptor LDL i LRP ("*LDL receptor related protein*"), així com participant en el transport revers del colesterol, fora de la paret arterial (341).

El gen humà de l'apo E és polimòrfic, havent-se identificat 3 al·lels diferents ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ i $\epsilon 4$) en el locus de l'apo E ubicat en el cromosoma 19, codificants per tres isoformes diferents (apo E2, apo E3 i apo E4), que donen lloc a sis fenotipus diferents (apoE2/2, apoE3/3, apoE4/4, apoE3/2, apoE4/2 i apoE4/3) (342). En població caucàsica, les freqüències dels al·lels $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ i $\epsilon 4$ són 8%, 77% i 15%, respectivament. En comparació amb l'al·lel $\epsilon 3$, els nivells de colesterol total i LDL són inferiors en subjectes amb l'al·lel $\epsilon 2$ i estan augmentats en portadors de l'al·lel $\epsilon 4$, mentre que

ambdós al·lels $\epsilon 2$ i $\epsilon 4$ s'associen a uns nivells incrementats de triglicèrids. Actualment es considera que els polimorfismes de l'apo E constitueixen un dels més importants determinants genètics de la coronariopatia isquèmica en la població general, conferint especialment l'isoforma E4 un risc incrementat de malaltia coronària (343).

L'apoproteïna E constitueix un component fonamental de les plaques senils i de les estructures neurofibril·lars detectades en el cervell de pacients amb la malaltia d'Alzheimer (344). Investigacions recents han demostrat que la presència de l'al·lel $\epsilon 4$ s'associa a un risc incrementat de presentació de formes esporàdiques i familiars de la malaltia (345, 346). De forma anàloga, s'ha detectat per immunocitoquímica la presència d'apo E formant part dels dipòsits d'amiloide en illots pancreàtics d'humans, simis i ratolins transgènics (245, 347), però aquests estudis no han pogut demostrar mai la presència de l'ARNm de l'apo E, suggerint aquest fet que el lloc de síntesi de l'apo E és extrapancreàtic (246, 347). En contrast, en la malaltia d'Alzheimer sí que s'ha detectat abundant ARNm en els astròcits, que constitueixen la font predominant de producció d'apo E (348), sent vehiculitzada cap a l'interior de les neurones a través del receptor LDL. L'origen més probable de l'apo E present en els illots pancreàtics és el fetge, que constitueix el principal lloc de síntesi d'aquesta proteïna, o bé els macròfags circulants a través de l'illot (349).

L'hipotètic paper de l'apoproteïna E en l'amiloidogènesi dels illots pancreàtics és controvertit. Estudis desenvolupats en la malaltia d'Alzheimer suggereixen que pot promoure la fibril·logènesi i estabilitzar les fibres d'amiloide formades a partir del precursor amiloide A beta ($A\beta$), sent la isoforma E4 la variant amb major afinitat per l'amiloide β (350-352). D'altra banda, experiments amb models de ratolins transgènics que expressen l'amiloide β però que no expressen l'apo E, han demostrat que aquests desenvolupen amiloidosi en la regió de l'hipocamp més lentament que ratolins transgènics que presenten una expressió normal de l'apo E (353). Basant-se en

aquests estudis i per extrapolació de la malaltia d'Alzheimer, s'ha hipotetitzat que l'apoproteïna E també podria exercir un paper en el desenvolupament de l'amiloïdosi en els illots pancreàtics. No obstant, els estudis desenvolupats en aquest sentit han estat negatius. D'una banda, els estudis genètics no han demostrat l'associació de l'al·lel ε4 amb una major freqüència o severitat de l'amiloïdosi en els illots de pacients amb diabetis tipus 2 (354). D'altra banda, experiments amb models de ratolins transgènics que sobreexpressen l'amilina humana però que són deficitaris en apo E, no han mostrat tampoc una major freqüència ni severitat de l'amiloïdosi en relació a animals que expressen correctament l'apo E (355).

Altres components de l'amiloide dels illots pancreàtics és el perlecan (247). Aquesta molècula proteica és un heparan sulfat, formant part de la família dels proteoglicans, i constitueix un component fonamental de la membrana basal de les cèl·lules endotelials, sent per tant ubiqüa (356). Les proteïnes amiloidogèniques, incloent l'amilina, contenen una seqüència consensual d'unió a les cadenes de glucosaminoglicans del perlecan (241). S'ha demostrat que el perlecan és un dels components de l'amiloide detectat en la malaltia d'Alzheimer (357), la síndrome de Down (358) o en malalties causades per prions (per exemple, la malaltia de Creutzfeldt-Jacob, la síndrome de Gerstmann-Straussler, i el Kuru) (359). Estudis efectuats en la malaltia d'Alzheimer suggereixen que el perlecan actuaria estimulando la deposició de fibres d'amiloide a partir de la proteïna A β , estabilitzant els agregats neurofibril·lars i inhibint la degradació proteolítica d'aquests (360-362). Evidències a favor d'un potencial paper del perlecan en la formació dels dipòsits d'amiloide també en els illots pancreàtics de pacients amb diabetis tipus 2 han estat proporcionades per experiments *in vitro* desenvolupats per Castillo *et al.* (363), en els quals s'ha demostrat que les cadenes de glucosaminoglicans del perlecan constituïrien la malla on precipitarien les molècules d'amilina, promovent la formació d'agregats fibril·lars i, finalment, conduint a l'aparició dels dipòsits d'amiloide.

La degradació de l'heparan sulfat es realitza als lisosomes mitjançant l'activació de l'enzim iduronat-2-sulfatasa (IDS). Actualment se sap que el dèficit d'aquest enzim és responsable de la malaltia de Hunter (mucopolisacaridosi tipus II), havent-se demostrat que el dèficit és degut a mutacions en el gen de l'IDS (364, 365), i també que la transfecció del gen intacte a línies cel·lulars deficitàries en IDS és capaç de corregir el dipòsit de mucopolisacàrids (366). Estudis desenvolupats pel nostre grup d'investigació han detectat la presència d'ARNm de l'IDS en illots pancreàtics, la qual cosa suggereix que també podria participar en el procés de formació dels dipòsit d'amiloide en la diabetis tipus 2.

2.6- Mecanisme de formació d'amiloide en els illots pancreàtics

2.6.1 Capacitat amiloidogènica de l'amilina

L'amilina ha sigut identificada en tots els mamífers examinats fins al moment actual: simis (367), gossos (368), gats (369), hámsters (370), pumes (371), rates, ratolins i cobais (372, 373). Però no en totes les espècies animals es forma amiloide: només humans, primats i felins són capaços de desenvolupar dipòsits d'amiloide, mentre que altres espècies animals –com rata i ratolins- no ho són. Aquesta diferència és deguda a les variacions d'aminoàcids en la porció central de la molècula i, específicament, la seqüència d'aminoàcids 24-28 glicina-alanina-isoleucina-leucina-serina (GAILS) és crítica en el procés d'amiloidogènesi. En aquest sentit, experiments *in vitro* han demostrat que la substitució de la serina en posició 28 de la seqüència de l'amilina humana per prolina, tal com presenten rosegadors (veure Figura 8), inhibeix la formació de fibres d'amiloide (374).

No obstant, la crítica seqüència amiloidogènica de l'amilina és necessària però no suficient per a la formació d'aquests dipòsits en els illots pancreàtics de subjectes amb diabetis tipus 2. D'una banda, cal tenir en compte que la presència de dipòsits d'amiloides és excepcional en individus sans no diabètics. D'altra banda, malgrat que la seqüència d'aminoàcids 24-28 és idèntica en felins i gossos, només els primers presenten amiloïdosi associada a diabetis, encara que sí s'ha descrit la formació d'amiloides en alguns insulinomes d'origen caní (369). En conseqüència, altres factors estarien involucrats en el procés d'amiloidogènesi, genètics i/o ambientals.

	N-IAPP	IAPP	C-IAPP
		1	37
Home	TPIES: : : HQVEKR	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF GAILS STNVGSNTY	GKRNAVEVLKREPLNYLPL
Simi (mico)	-----: : : - - - - -	----- R ----- - T - ----- D - -	-----
Gat	-----: : : N - - - - -	----- IR - - - - L - - - - P - - - - -	- - - ST- DI - N - - - - - F
Gos	- - -K- : : : - -M - - -	----- - - - - - RT - - - L - - - - P - - - - -	- - - TI - I - N - G - - - - -
Rata	- -VG-GTN - - D - -	----- - - - - - R - - - - L - PV-PP - - - - -	- - - VA- DPN- - S- DF-L -
Ratolí	- -VR-GSNP-MD - -	----- - - - - - R - - - - L - PV-PP - - - - -	- - - - AGDPN- - S- DF-KV
Hamster	- -VR-GTN- -MD- -	----- - - - - - N - -L - PV-P - - - - -	- - - S-A - IPDGDS- DLFL-
Cobai	- S-A-DTG- - - G - -	----- T - - - - R - -H - L - - A -LP - D - - - - -	- - - - - PQISD - - LCH - - -

Figura 8. Comparació de la seqüència d'aminoàcids de la proamilina en 8 espècies de mamífers. IAPP, amilina; N-IAPP, regió aminoterminal; C-IAPP, regió carboxiterminal. La seqüència compresa entre els aminoàcids 24-28 (GAILS), que és crítica per a la fibril·logènesi, està conservada en espècies en les quals es desenvolupa amiloide en els illots pancreàtics o en insulinomes (home, gos i gat), i presenta només una substitució en simis. Els guions indiquen els residus que son idèntics als humans per aquesta posició. Els aminoàcids estan indicats amb els símbols: A, alanina; C, cisteïna; D, àcid aspàrtic; Z, àcid glutàmic; F, fenilalanina; G, glicina; H, histidina; I, isoleucina; K, lisina; L, leucina; M, metionina; N, asparagina; P, prolina; Q, glutamina; R, arginina; S, serina; T, treonina; V, valina; Y, tirosina.

2.6.2 Defectes genètics i hipersecreció de l'amilina

De forma anàloga a algunes formes d'amiloïdosis en les quals s'ha demostrat la presència d'alteracions genètiques que resulten en l'agregació de la proteïna codificada, com succeeix en la malaltia d'Alzheimer (375, 376), es va postular que mutacions en el gen de l'amilina podrien exercir un paper en el procés d'amiloidogènesi, per exemple, incrementant la propensió del pèptid a l'agregació. En aquest sentit, estudis en població japonesa desenvolupats per Sakagashira *i col.* van detectar la presència de la mutació S20G a l'exó 3 del gen de l'amilina en un 4% de pacients amb diabetis tipus 2, associant-se aquesta mutació a un patró fenotípic específic: edat de diagnòstic relativament jove (≤ 35 anys), tendència a la insulinopènia i a l'agregació familiar de diabetis (224). Aquesta mutació no s'ha detectat en altres poblacions estudiades, per la qual cosa si constitueix un factor patogènic, seria inusual i evidentment no pot explicar la freqüent associació d'amiloide i diabetis tipus 2.

Altre hipòtesi que es va postular és que una hipersecreció de l'amilina podria conduir a l'acumulació i agregació del pèptid. Això no obstant, estudis *in vivo* intentant verificar aquesta hipòtesi han resultat negatius, i un important argument en contra ve donat per la infreqüent detecció dels dipòsits d'amiloide en individus normoglicèmics que són obesos i/o que presenten resistència a la insulina i que, per tant, potencialment serien hipersecretors d'amilina (253). Malgrat tot, en determinats casos d'una estimulació massiva crònica de la cèl·lula β és possible la formació de dipòsits d'amiloide en humans, l'exemple més demostratiu és l'amiloide associat a insulinomas humans (258). Així també, s'ha documentat el desenvolupament d'abundant amiloïdosi insular en un pacient amb hiperplàsia d'illots degut a la presència d'anticossos contra el receptor de la insulina (377). D'altra banda, una situació especial és la de pacients

no diabètics amb insuficiència renal terminal, en els quals juntament amb elevades concentracions d'amilina s'ha descrit una major prevalença d'amiloide pancreàtic en relació a subjectes no diabètics i sense insuficiència renal (378). Aquesta major prevalença podria ser el resultat de les elevades concentracions d'amilina, una prediabetis no diagnosticada, i/o un estat de resistència a la insulina que freqüentment acompanya a la insuficiència renal.

2.6.3 Localització dels dipòsits d'amiloide en el pàncrees

Els dipòsits d'amiloide en el pàncrees estan ubicats dins dels límits de l'illot, entre les cèl·lules endocrines i els capil·lars, i mostren immunoreactivitat per amilina. La distribució dels dipòsits en els illots pancreàtics no és homogènia i, a més a més, els illots contenint amiloide poden estar limitats només a un o dos lòbuls exocrins (379), fent més complex el procés d'identificació. Aquesta distribució lobular també és característica de la fase precoç del procés de destrucció autoimmune de les cèl·lules β en la diabetis tipus 1 (380).

D'altra banda, no s'han detectat dipòsits d'amiloide en els illots del cap del pàncrees, els qual contenen un escàs nombre de cèl·lules β i en el desenvolupament embrionari deriven del primordi ventral (381).

Una qüestió llargament debatuda en el procés d'amiloïdosi dels illots en la diabetis tipus 2 és si la formació de fibril·les comença intracel·lularment o bé aquest procés només s'inicia una vegada l'amilina és secretada per la cèl·lula, i per tant el lloc de formació de dipòsits seria extracel·lular. Al llarg de la literatura hi ha estudis tant a favor d'un origen intracel·lular (258, 382-384), extracel·lular (385), com a favor d'ambdós orígens simultanis (386). En aquest sentit, s'ha detectat immunoreactivitat per amilina en els compartiments intracel·lulars, incloent-hi grànuls de secreció i

lisosomes (261), suggerint aquest fet que els dipòsits serien inicialment formats dins de la cèl·lula. Malgrat això, estudis per microscopia electrònica d'illots procedents de pacients amb diabetis tipus 2 han demostrat la presència de fibril·les extracel·lulars, però mai han detectat acumulació de material fibril·lar intracel·lular (255, 387). No obstant, s'ha de tenir en compte que l'examen histològic de mostres humanes és complex, i depèn tant de l'estat de conservació de les mostres d'autòpsies com del grau d'amiloïdosi dels illots.

2.6.4 És l'amiloide pancreàtic un component precoç o tardà de la DM tipus 2 ?

Constitueix motiu de gran controvèrsia si la presència d'amiloide en els illots representa un component precoç en la patogènia de la diabetis tipus 2, o es tracta d'un epifenomen.

Part de la dificultat en proporcionar una resposta prové de la impossibilitat de realitzar amplis estudis longitudinals en humans relacionant la presència de dipòsits amb els canvis en el metabolisme de la glucosa. A més a més, gran part de les investigacions desenvolupades estan basades en estudis amb microscopia òptica, amb la qual només es possible detectar canvis corresponents a un estadi avançat del procés d'amiloidogènesi, mentre que els canvis ultraestructurals en fase precoç solament són detectables amb microscopia electrònica.

La deposició d'amiloide precedeix l'inici de la hiperglucèmia en gats (388) i micos (389), suggerint un paper etiològic primari en aquestes espècies.

En estudis amb el primat no humà *Macaca nigra*, capaç de presentar amiloide pancreàtic i diabetis, Howard va ser el primer en examinar la patologia insular i el metabolisme de la glucosa (257, 390). En el seu exhaustiu treball va demostrar que aquells simis en els que en la biòpsia pancreàtica inicial es detectaven dipòsits

d'amiloide, presentaven una secreció d'insulina reduïda amb alteració de la tolerància a la glucosa, però glucèmies en dejú normals (257). El seguiment longitudinal d'aquests animals incloent biòpsies pancreàtiques seriades, va confirmar que la deposició continuada d'amiloide s'associava a una progressiva reducció de la secreció d'insulina i a un deteriorament de la tolerància endovenosa a la glucosa. El desenvolupament d'hiperglucèmia basal constituí un fenomen tardà i es produïa només en aquells animals amb extensa amiloïdosi en els illots.

L'accés a models de ratolins transgènics va proporcionar l'oportunitat d'estudiar l'efecte d'un factor individual en una malaltia multifactorial com és la diabetis. La influència de factors addicionals pot ser estudiada mitjançant l'encreuament del ratolí transgènic inicial amb altre ratolí transgènic, recombinant homòleg o mutant, o mitjançant la manipulació de factors ambientals com la dieta. La creació d'aquests models de ratolins transgènics que produeixen amilina humana en les seves cèl·lules β va permetre estudiar les propietats diabetogèniques i amiloidogèniques de l'amilina humana *in vivo* (305, 391-395).

El ratolins transgènics heterozigots inicials que sobreexpressaven l'amilina humana, no eren capaços de formar dipòsits d'amiloide (305). Però amb l'obtenció de ratolins transgènics homozigots, alguns d'aquests animals van desenvolupar amiloide en els seus illots pancreàtics (394, 395). Aquesta troballa suggereix que la citotoxicitat per la cèl·lula β induïda pel transgen depèn dels nivells d'expressió d'aquest gen, i es correlaciona amb el fet que la presència d'amiloide és fonamentalment detectada en aquells insulinomes que presenten un elevat contingut d'amilina (396).

Donat que l'amilina és cosecretada amb la insulina, com a resultat de seqüències reguladores promotores comunes per ambdós gens codificants (283), la inducció de resistència a la insulina dona lloc a un increment de l'expressió de la

insulina i de l'amilina. Així, el desenvolupament d'hiperinsulinèmia en estats de resistència a la insulina probablement va associat a un increment en les concentracions plasmàtiques de l'amilina. En aquest sentit, s'ha hipotetitzat que la combinació de la producció de l'amilina humana amb resistència a la insulina podria estar implicada en la formació d'amiloide *in vivo* (397).

Estudis practicats per Höppener *i col.* (395) han demostrat que l'encreuament de ratolins transgènics amb el ratolí genèticament obès i deficient en leptina ob/ob com a conseqüència d'una mutació en el gen de la leptina (398), indueix un estat de resistència a la insulina i el desenvolupament d'una amiloïdosi extensa en els illots pancreàtics dels ratolins resultants.

Resultats semblants als de Höppener van ser obtinguts per Soeller *i col.* (399) amb l'encreuament de ratolins transgènics amb el ratolí groc A^{vy/a}, model murí d'obesitat i resistència a la insulina (400), i per Couce *i col.* (401) amb ratolins transgènics sotmesos a tractament amb hormona de creixement i dexametasona. A més a més, en el model creat per Höppener el grau de formació d'amiloide es va correlacionar positivament amb el quocient molar glucosa/insulina en plasma. Ratolins transgènics ob/ob que sobreexpressaven l'amilina humana van presentar glucèmies superiors i concentracions inferiors d'insulina que ratolins ob/ob no transgènics (sobre tot aquells amb dipòsits d'amiloide), indicant que el fracàs de la cèl·lula β era el resultat de la formació d'amiloide.

Aquests estudis *in vivo* indiquen que la deposició d'amiloide pot esdevenir com a conseqüència de la resistència a la insulina i, a la mateixa vegada, pot provocar un deteriorament de la secreció d'insulina (Figura 9).

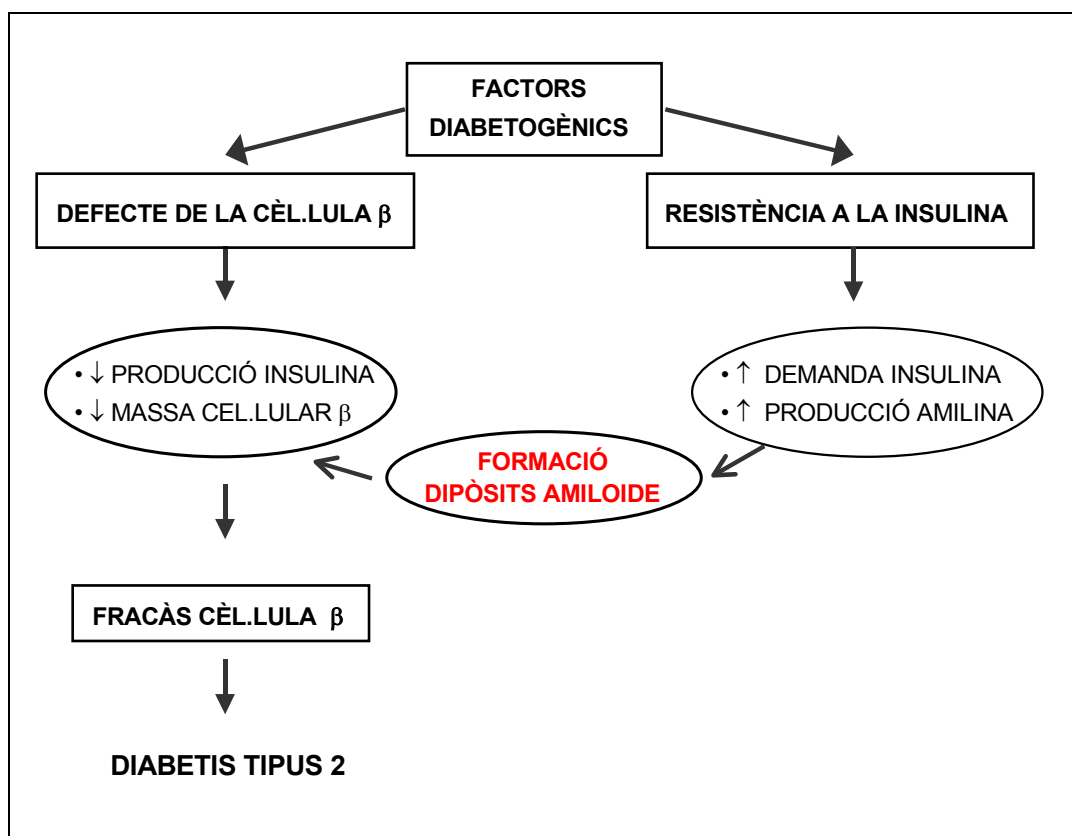


Figura 9. Model proposat de la funció de l'amilina amb la seva seqüència amiloidogènica en la patogènia de la diabetis tipus 2. Diversos factors diabetogènics primaris, determinats genèticament i ambientalment, podrien deteriorar la funció de les cèl·lules β , conduint a un defecte de la cèl·lula β , o bé disminuir la sensibilitat perifèrica a la insulina, conduint a un estat de resistència a la insulina. La resistència a la insulina incrementa la demanda d'insulina, donant lloc a hiperinsulinèmia i a un estat de prediabetis. Si la coexistent hipersecreció d'amilina és suficientment important o perllongada, donarà lloc a la formació d'amiloides en els illots pancreàtics, la qual s'associa a degeneració de les cèl·lules β , reducció de la massa cel·lular β i disminució de la capacitat secretora d'insulina. D'altra banda, les cèl·lules β que resten indemnes intentaràn compensar aquest dèficit augmentant la seva producció d'insulina i, per tant, d'amilina. Si el procés no s'atura, augmentarà progressivament el grau de formació d'amiloides i disminuirà la capacitat productora d'insulina i d'amilina del pàncrees. Finalment, quan la secreció d'insulina esdevé insuficient per compensar aquesta situació mantinguda de resistència a la insulina (fracàs de la cèl·lula β), la concentració plasmàtica de glucosa augmentarà. Per tant, l'amilina amb la seva seqüència amiloidogènica constitueix un factor diabetogènic que pot ser responsable de la disfunció de la cèl·lula β i del deteriorament de la secreció d'insulina. En el cas d'un defecte primari de la cèl·lula β que comporti una reducció en la secreció d'insulina (per exemple, per processament de la proinsulina defectuós), pot desenvolupar-se resistència a la insulina com un defecte secundari, amb el conseqüent increment de la demanda d'insulina, que conduirà també finalment a la formació d'amiloides.

De forma anàloga, l'estimulació crònica de la cèl·lula β per glucosa també donaria lloc a la formació d'amiloide. Així, estudis practicats per MacArthur *i col.* (385) i de Koning *i col.* (386) han demostrat el desenvolupament ràpid d'amiloide en illots pancreàtics isolats de ratolins transgènics que sobreexpressaven l'amilina humana després d'incubació amb elevades concentracions de glucosa.

Recentment, s'ha demostrat que la glicosilació de l'amilina humana pot augmentar el seu potencial amiloidogènic (402), suggerint que la hiperglucèmia pot promoure la formació d'amiloide no només estimulant la producció d'amilina humana, sinó també incrementant la seva capacitat d'agregació i fibril·lació. Aquest efecte estarà absent en subjectes amb resistència a la insulina que no presenten diabetis, i podria explicar perquè malgrat presentar concentracions plasmàtiques augmentades d'amilina, aquests individus infreqüentment desenvolupen amiloide.

2.6.5 Alteracions del processament i secreció de l'amilina

Altre hipòtesi que s'ha postulat és que una lesió de la cèl·lula β que comportés una alteració en el processament o alliberament de l'amilina seria el factor addicional a la seqüència amiloidogènica del pèptid necessari per a la formació del dipòsits d'amiloide en la diabetis tipus 2 (246).

Després de la seva síntesi en el reticle endoplasmàtic, els dos grans precursors peptídics (proinsulina i proamilina) travessen l'aparell de Golgi i són emmagatzemats en grànuls de la via secretora regulada o són alliberats en les vesícules de la via secretora constitutiva (403). Les vesícules en la via constitutiva travessen l'interior de la cèl·lula ràpidament i són alliberades en aproximadament 20 minuts després de la seva formació. Donat el ràpid trànsit d'aquestes vesícules i la seva manca d'endopeptidases PC2 i PC3 responsables del processament proteolític de la

proinsulina a insulina i, presumiblement també, de la proamilina a amilina (271), són predominantment alliberats els propèptids. La quantitat de pèptid alliberat mitjançant la via constitutiva depèn de la quantitat sintetitzada, i és accelerada per nutrients com la glucosa, que són capaços d'estimular la biosíntesi de la insulina i de l'amilina (404-406). D'altra banda, els grànuls de la via secretora regulada contenen, a més de proinsulina i proamilina, les endopeptidases PC2 i PC3, sent la seva acció proteolítica altament dependent del PH i la concentració de calci de l'interior del grànul. Mitjançant la via regulada són fonamentalment secretats els pèptids madurs, però també en petita quantitat proinsulina i proamilina. Aquesta via de secreció depèn de la naturalesa i la magnitud de l'estímul i, a diferència de la via constitutiva, només indirectament de la síntesi (403). A més a més, les secrecions d'insulina i amilina estan freqüentment coordinades produint-se a un quocient molar fix (327, 330, 335).

S'ha hipotetitzat que una alteració de la secreció, comportant a) un processament defectiu de la proamilina en la via secretora regulada (407), o b) un excessiu alliberament del pèptid a través de la via constitutiva (408), podria estar implicada en la patogènia de la formació dels dipòsits d'amiloide en la diabetis tipus 2.

Pacients amb diabetis tipus 2 presenten uns nivells plasmàtics de proinsulina desproporcionadament elevats en relació a les concentracions d'insulina (272, 273, 409) la qual cosa és compatible amb una conversió disminuïda de proinsulina a insulina en el grànul de la via secretora regulada (410). Donat que ambdós precursors són probablement processats per les mateixes endopeptidases presents en el grànul de secreció (274), és presumible que la secreció augmentada de proinsulina mitjançant aquesta via s'associï a un increment similar de la secreció de proamilina.

D'altra banda, en el cas dels insulinomes, malgrat que també és activa la via regulada, la via constitutiva és la principal via de secreció de proinsulina (403, 405).

Donat que aquesta via manca de les endopeptidases PC2 i PC3, és probable que en els insulinomes humans la proamilina sigui, juntament amb la proinsulina, un dels productes de secreció principals.

Malgrat que els patrons de secreció d'insulina i amilina són habitualment similars i que el processament de proinsulina a insulina és incomplet en pacients amb diabetis tipus 2 i insulinomes, l'associació de malalties humanes amb un augment de les concentracions de proamilina no ha pogut ser demostrada de forma definitiva per no disposar-se de mètodes suficientment sensibles per a la seva determinació. No obstant això, existeixen evidències a favor d'aquesta associació. D'una banda, s'ha documentat la presència en plasma d'una forma d'amilina immunoreactiva d'elevat pes molecular en una pacient amb un tumor insular secretor d'amilina (411), suggerint que pot produir-se un processament incomplet de proamilina en aquests tumors. D'altra banda, estudis immunohistoquímics han demostrat la presència de la seqüència aminoterminal de la proamilina en els dipòsits d'amiloide de pacients amb diabetis tipus 2 (412), recolzant la hipòtesi de que una alteració en el processament de la proamilina podria estar implicada en la formació d'aquests dipòsits. Finalment, estudis desenvolupats en la línia cel·lular TC3 derivada d'insulinoma murí han demostrat la presència d'una secreció augmentada d'ambdós precursors, proinsulina i proamilina, a través de la via constitutiva (413).

2.6.6 Implicació d'una dieta rica en greixos en la formació d'amiloide

Donada l'associació d'una dieta rica en greixos amb el desenvolupament de diabetis tipus 2 en humans, sobre tot en poblacions migratòries (414), i l'aparició de dipòsits d'amiloide en els illots de ratolins transgènics sotmesos a dieta amb elevat contingut en greixos (246), s'ha postulat que el consum d'una dieta rica en greixos podria estar implicat en el procés d'amiloidogènesi. Probablement el mecanisme es

multifactorial, i podria estar associat a: a) l'efecte d'estimulació crònica de la cèl·lula β per la hiperglucèmia induïda, b) l'estat de resistència a la insulina produït, c) la disfunció de la cèl·lula β , resultant de l'exposició a uns elevats nivells circulants d'àcids grassos lliures, de l'acumulació intracel·lular de triglicèrids, o de l'apoptosi cel·lular (415, 416), d) un deteriorament del processament proteolític de les endopeptidases PC2 i PC3 com a conseqüència dels elevats nivells d'àcids grassos lliures (417), i e) un increment en la biosíntesi de l'apoproteïna E (418, 419).

2.7- Citotoxicitat de l'amilina humana

La formació de dipòsits d'amiloide en els illots pancreàtics s'associa *in vivo* amb una reducció del 40 al 50% de la massa cel·lular β en pacients amb diabetis tipus 2 (251, 420), així com en gats diabètics (388) i en el ratolí transgènic ob/ob que sobreexpressa l'amilina humana (395). Així mateix, estudis longitudinals en simis han demostrat que el grau de deposició d'amiloide en els illots estava associat al grau de deteriorament de la secreció d'insulina, indicant que els dipòsits d'amiloide estan relacionats causalment amb la mort de la cèl·lula β (257).

S'han implicat diversos mecanismes en la citotoxicitat de l'amilina humana. Diversos estudis indiquen que la formació de fibres d'amilina extracel·lulars indueix l'apoptosi de les cèl·lules β , toxicitat que requereix el contacte directe de les fibres amb la superfície cel·lular (421), i que també pot ser mitjançada pels mecanismes d'estrès oxidatiu (422, 423), i per un augment de l'expressió dels gens promotors d'apoptosi cel·lular p53 i p21 (424). D'altra banda, la formació intracel·lular de fibres d'amilina també pot ser causa de mort cel·lular. Estudis en cèl·lules COS-1, derivades d'hipernefoma de mico, transfectades amb vectors que expressen l'amilina humana han demostrat el desenvolupament de dipòsits d'amiloide intracel·lulars associats a la presència de cèl·lules en apoptosi (425). No obstant, s'ha de tenir en compte que

cèl·lules COS manquen de les endopeptidases PC2 i PC3 i del sistema de grànuls de secreció present en la cèl·lula β i, per tant, un processament i secreció anormals dels pèptids pot haver afavorit la formació d'amiloide, tal com s'ha discutit prèviament.

L'amilina humana, però no la de rata o ratolí, és capaç de formar canals iònics (426). A concentracions elevades, l'amiloidogènica i citotòxica amilina humana pot formar agregats que serien integrats en la membrana cel·lular i podrien funcionar com canals permeables pel calci (427), donant lloc a un flux intracel·lular de calci que, de ser perllongat, contribuiria en el mecanisme d'apoptosi de la cèl·lula β (428).

Estudis desenvolupats per McLean *i col.* han demostrat que la interacció de l'amilina humana (però no la de rosegadors) amb membranes liposomals indueix la formació de fibril·les amb conformació β (429), suggerint que la interacció de la proteïna amiloidogènica amb els components de la membrana cel·lular induiria la formació d'amiloide i l'apoptosi de les cèl·lules β . La detecció de perlecan, un component de la membrana basal de cèl·lules endotelials, en els dipòsits d'amiloide presents en illots humans, així com de simis i ratolins transgènics (247), recolza aquesta hipòtesi. Estudis *in vitro* han mostrat que aquest heparan sulfat estabilitzaria les fibres d'amilina formades, accelerant el procés de fibril·lació (363). El fet que els dipòsits siguin localitzats primàriament entre les cèl·lules dels illots i els capil·lars, tal com foren originalment descrits per Opie (229), recolza aquesta possible acció promotora de la fibril·logènesi dels components de la membrana basal.

Experiments practicats per Janson *i col.* (430) van demostrar que l'acció citotòxica de l'amilina humana podia ser mitjançada per la interacció de la membrana cel·lular amb partícules tòxiques d'amilina de tamany intermedi o "ISTAPs" ("*intermediate-sized toxic amyloid particles*"). Es tractaria d'agregats hidrofòbics contenint de 25 a 6000 molècules d'amilina que causarien desestabilització de les

membranes cel·lulars, amb posterior disrupció i vesiculació d'aquestes. Després de la mort cel·lular (per necrosi o apoptosi) els agregats preamiloideogènics serien alliberats a l'espai extracel·lular, on madurarien, donant lloc com a segon esdeveniment a l'aparició de grans ($>10^6$ molècules per partícula) dipòsits fibril·lars d'amiloide, en els quals la capacitat per causar lesió de membrana està considerablement disminuïda o abolida. Recolzant aquest mecanisme citotòxic de l'amilina, un estudi recent amb ratolins nus en els quals s'han implantat illots procedents de ratolí transgènic (431), ha mostrat que l'aparició de dipòsits extracel·lulars d'amiloide era precedida per la formació d'agregats en la membrana basal.

2.8- Accions biològiques de l'amilina

L'elevada analogia de la seqüència d'aminoàcids del pèptid madur entre diferents espècies i l'amidació del residu carboxiterminal, suggereix que l'amilina pot actuar com a hormona paracrina. Així mateix, l'origen pancreàtic i el fet que sigui cosecretada amb la insulina, apunta a que pot exercir una funció en la regulació del metabolisme de la glucosa. A més a més, la seva homologia amb la calcitonina i els neuropèptids CGRP, suggereix una acció hormonal en el metabolisme del calci.

Fins a l'actualitat, s'han descrit efectes biològics de l'amilina en múscul esquelètic, fetge, pàncrees, tracte gastrointestinal, sistema nerviós central (432-434), metabolisme ossi (435-437) i sistema cardiovascular (438). No obstant això, malgrat haver-se dut a terme extensos estudis fisiològics tant *in vivo* com *in vitro*, les funcions exactes de l'amilina no han estat completament elucidades, i la seva possible rellevància és encara debatuda. Això es degut a que, en la majoria d'investigacions, les concentracions necessàries d'amilina per obtenir un efecte mesurable han estat molt superiors als nivells fisiològics del pèptid.

2.8.1 Efecte en el metabolisme de la glucosa

Cooper i *col.* van proporcionar la primer evidència a favor de que l'amilina podria ser una hormona glucoreguladora, demostrant la inhibició dosi-depenent de la incorporació de glucosa a glicogen en el múscul esquèletic per l'amilina (439). Aquest fet va conduir a que es postulés la hipòtesi de que la hipersecreció d'amilina indueix resistència a la insulina i, en conseqüència, podia exercir una acció important en la disminució de la sensibilitat a la insulina que es produeix en la diabetis tipus 2 (440-444). L'amilina actuaría com a un inhibidor no competitiu de la insulina (445) i disminuiria l'acumulació de glicogen induïda per aquesta hormona (446). Així, inhibeix la síntesi de glicogen i estimula la glucogenolisi, via la inhibició de la glucogen sintasa i l'activació de la glicogen fosforilasa (447), respectivament, produint-se ambdós accions a través de mecanismes de fosforilació independents de l'AMPc (448).

No obstant, la hipotètica funció reguladora de l'amilina en l'homeostasi de la glucosa és controvertida i els diferent estudis practicats *in vivo* han resultat contradictoris. Així, mentre que alguns estudis van mostrar que la infusió endovenosa d'amilina sintètica causava la inhibició de la disponibilitat de glucosa estimulada per insulina en rates (440-443) i gossos (444), altres investigacions no en van detectar cap efecte (449-451). A més a més, la infusió d'amilina en humans durant el clamp euglicèmic-hiperinsulinèmic no va alterar la sensibilitat a la glucosa malgrat incrementar-se fins a 100 vegades les concentracions plasmàtiques del pèptid durant el clamp (452). També en aquesta línia, estudis practicats per Bretherton-Watt i *col.* amb voluntaris sans van demostrar que per alterar la resposta de la insulina a l'administració endovenosa de glucosa eren necessàries concentracions plasmàtiques d'amilina nou vegades superiors a les postprandials fisiològiques (453). Aquests

estudis suggereixen que és improbable que l'amilina a concentracions fisiològiques tingui un efecte en el metabolisme de la glucosa (454).

L'amilina augmenta la producció hepàtica de lactat. No obstant, no està aclarit si aquest efecte és resultat de l'acció directa del pèptid en el fetge, o seria secundari a un augment de la producció de substrats gluconeogènics. Així, alguns estudis han evidenciat un increment de la producció de lactat després de l'administració d'amilina (455-457).

El teixit adipós no constituiria un teixit diana de les accions de l'amilina, no obstant això, sí que resultaria afectat de forma indirecta. S'ha hipotetitzat que un flux excessiu del lactat muscular al fetge podria promoure, en un estat alimentat, la lipogènesi hepàtica i la producció de lipoproteïnes de molt baixa densitat, les quals serien transportades al teixit adipós (458, 459). Recolza aquest mecanisme l'estudi practicat per Suzuki *i col.* en hepatòcits primaris en cultiu, on es demostra que l'amilina és capaç d'estimular la lipogènesi, tant basal com estimulada per insulina (460).

2.8.2 Efecte en la secreció d'insulina

També en referència a aquesta acció biològica els resultats reportats al llarg de la literatura han estat contradictoris. L'amilina a concentracions relativament elevades (0.03 a 10 $\mu\text{mol/l}$) fou capaç d'inhibir la secreció d'insulina estimulada per la glucosa en alguns estudis amb illots pancreàtics isolats (461, 462). Aquest efecte no ha estat observat per altres investigadors (463, 464). D'altra banda, concentracions més baixes del pèptid ($< 100 \text{ pmol/l}$) han estat suficients per inhibir la secreció d'insulina en estudis amb pàncrees perfosos (465, 466). No obstant, estudis realitzats en humans han descartat un efecte inhibitor de l'amilina en la secreció d'insulina, al menys a concentracions fisiològiques (453, 467).

L'efecte inhibidor de l'amilina en la secreció d'insulina pot ser revertit per l'antagonista IAPP₈₋₃₇, (468-471), que actua selectivament bloquejant els receptors de l'amilina (472) i que, a més a més, és capaç d'estimular la secreció d'insulina en illots pancreàtics isolats (469). Aquest fet significa que l'amilina endògena regula de manera continuada la secreció insulínica. Es desconeix el mecanisme pel qual l'amilina inhibeix l'alliberament de la insulina i, donat que és cosecretada amb aquesta, el seu propi alliberament per les cèl·lules β . Estudis en illots isolats de rata i en la línia cel·lular β TC3 de ratolí, han mostrat que l'amilina no modifica els nivells d'ARNm ni tampoc la biosíntesi de proinsulina (405), havent-se suggerit que l'amilina tindria una funció en el mecanisme d'acoblament estímulo-secreció de la cèl·lula β (473, 474).

2.8.3 Efecte en la secreció de glucagó

Estudis en rates utilitzant el clamp euglicèmic-hiperinsulinèmic han demostrat que l'amilina a concentracions fisiològiques és capaç d'inhibir la secreció de glucagó induïda per aminoàcids, tals com l'arginina (475). Aquest efecte també ha estat observat utilitzant l'anàleg de l'amilina pramlintide (AC₁₃₇, en el qual els aminoàcids en posició 25, 28 i 29 han estat substituïts per prolina), tant en estudis amb rates (476) com amb pacients amb diabetis tipus 1 (477, 478). L'acció glucagonostàtica de l'amilina no s'ha demostrat en el model de pàncrees perfós isolat, indicant que podria estar mitjançada per un mecanisme extrapancreàtic (479). Així mateix, el fet que l'efecte supressor de la secreció de glucagó no es produeixi en presència d'hipoglucèmia induïda per insulina (480, 481), recolza la hipòtesi d'un mecanisme central.

2.8.4 Efectes en el tracte gastrointestinal

2.8.4.1 Retardament del buidament gàstric

Estudis clínics efectuats amb pramlintide han demostrat que la infusió contínua d'aquest anàleg és capaç de reduir les elevacions de la glucèmia postprandial (482). Aquesta acció és deguda a l'efecte inhibidor de l'amilina en el buidament gàstric (482, 483). D'altra banda, s'ha documentat en estudis amb rates que la infusió de l'antagonista IAPP₈₋₃₇, accelera el buidament gàstric d'una manera semblant a l'observada en animals deficients en amilina (484).

La supressió de l'efecte de l'amilina en el buidament gàstric després de vagotomia subdiafragmàtica, indica que aquesta acció requereix la presència d'una innervació vagal preservada i que és mitjançada per un mecanisme central (485). D'altra banda, un fet rellevant pel potencial ús terapèutic d'anàlegs de l'amilina, és que aquest efecte és revertit per la hipoglucèmia induïda per la insulina (486), suggerint l'existència d'un mecanisme glucosensor protector d'hipoglucèmia severa.

2.8.4.2 Efecte en la secreció àcida gàstrica

S'ha documentat també un efecte inhibidor de l'amilina en la secreció àcida gàstrica, però no és coneix el mecanisme exacte d'aquesta acció (487). És possible que l'amilina endògena alliberada a partir de les cèl·lules de la mucosa antral estimuli la secreció autocrina de somatostatina, conduint a una inhibició de la secreció antral de gastrina, així com a una inhibició de la secreció àcida i d'histamina en el fundus (265). Així, Jodka *i col.* van objectivar un efecte protector gàstric sobre la gastritis induïda per etanol en experiments amb rates utilitzant dosis d'amilina supressores de la secreció àcida gàstrica (488).

2.8.5 Efecte en el control de la ingesta

Diversos estudis desenvolupats en rates han documentat que l'amilina es capaç de reduir l'apetit (432, 433, 489), i que la seva administració crònica causa una disminució dosi-depenent del consum d'aliments i del pes corporal (490, 491). Així mateix, estudis clínics en pacients amb diabetis tipus 2 han demostrat una reducció de l'índex de massa corporal amb la utilització de l'anàleg de l'amilina pramlintide (492). Aquest efecte anorèctic seria independent de la inhibició del buidament gàstric i produït com a conseqüència d'una acció directa en el sistema nerviós central (491). L'amilina, de forma anàloga a altres hormones com la insulina i la leptina, és eficientment transportada a través de la barrera hematoencefàlica des de la perifèria al sistema nerviós central (493, 494), on s'han identificat llocs d'unió amb elevada afinitat per l'amilina (495-497). Cal remarcar que els nivells plasmàtics de l'amilina, juntament amb els d'insulina i leptina, s'han correlacionat directament amb l'adipositat corporal (498, 499), indicant que podria exercir un paper en el manteniment del balanç energètic corporal (491).

2.8.6 Efectes renals

S'ha demostrat la presència de zones d'unió amb elevada afinitat per l'amilina en el còrtex renal (500). També s'ha documentat un efecte estimulador de l'amilina sobre el sistema renina-angiotensina-aldosterona en rates (501) i humans (502), per la qual cosa es va hipotetitzar que una hipersecreció d'amilina podria ser causa d'hipertensió arterial (503). D'altra banda, estudis recents practicats per Vine *i col.* han demostrat que l'amilina presenta efectes diürètics i natriürètics (504). Això no obstant, mai s'han documentat canvis significatius de la pressió arterial en pacients sotmesos a tractament crònic amb anàlegs de l'amilina.

2.8.7 Efectes en el metabolisme del calci

Estudis *in vitro* han mostrat que l'amilina presenta efectes inhibidors de la resorció òssia i estimuladors de la remodelació òssia (505), suggerint que podria actuar com una hormona paracrina en el metabolisme del calci (506). Així, s'ha documentat que l'amilina és capaç d'inhibir la motilitat dels osteoclasts, mecanisme mitjançat per l'AMPc (507, 508), i que pot presentar una potent acció hipocalcemiant (435, 436). Els efectes biològics de l'amilina serien mitjançats, al menys en part, a través de la unió a receptors de la calcitonina en els osteoclasts (265). No obstant, estudis clínics amb l'anàleg pramlintide en pacients amb diabetis tipus 1 no han objectivat canvis en la densitat mineral òssia ni en marcadors plasmàtics del metabolisme fòsfor-calci (509).

2.8.8 Efectes en el sistema cardiovascular

S'han documentat efectes vasodilatadors i hipotensors de l'amilina en experiments amb rates. Així, després de l'administració intradèrmica, és capaç de promoure un augment del flux sanguini i la formació de l'edema induït per la bradicinina (438), i pot causar la disminució de la pressió arterial sistèmica després de la seva administració endovenosa (510). No obstant, aquests efectes no s'han documentat en humans, al menys amb concentracions fisiològiques del pèptid.

2.9- Potencials perspectives terapèutiques

2.9.1 Tractament amb anàlegs de l'amilina

La història natural de la secreció d'insulina en la diabetis tipus 2 actualment està ben caracteritzada: després d'un període de resistència a la insulina i hipersecreció compensadora de la cèl·lula β , segueix una progressiva disminució de la secreció. El patró de secreció de l'amilina en l'evolució de la diabetis tipus 2 sembla ser paral·lel, amb una primera fase d'hiperamilinèmia (amb probable formació de dipòsits d'amiloide, responsables de la ulterior disfunció de la cèl·lula β) i posterior reducció progressiva dels nivells plasmàtics d'amilina. Per tant, el fracàs de la cèl·lula β en la diabetis, tant en la tipus 1 com en la tipus 2, ha de ser contemplada com la deficiència de dues hormones: l'amilina i la insulina. En conseqüència, la restauració completa del control de l'homeostasi de la glucosa requerirà la correcció dels dos dèficits hormonals (511, 512). Aquest fet obre noves perspectives terapèutiques en la diabetis, mitjançant la utilització d'anàlegs de l'amilina humana que presenten totes les accions fisiològiques de l'amilina, però que són hidrosolubles (513, 514). En aquest sentit, estudis clínics amb pramlintide suggereixen que pot contribuir a optimitzar el control metabòlic tant en pacients amb diabetis tipus 1 com tipus 2 (492, 515-517).

2.9.2 Inhibició del procés d'amiloidogènesi

En una fase precoç de la diabetis tipus 2, la prevenció o interrupció del procés de deteriorament de la funció de la cèl·lula β associat a l'amiloïdosi dels illots, podria preservar la producció endògena d'insulina, o al menys enrederir l'aparició d'hiperglucèmia. Diversos estudis recolzen la hipòtesi de que la sobreexpressió de l'amilina pot promoure la formació d'amiloide (394-396), encara que també hi podrien influir factors microambientals (per exemple, el PH o altres components de la cèl·lula β)

(518-520). D'altra banda, els dipòsits d'amiloide no constitueixen formacions inertes *in vivo*, sinó que estan en remodelació constant, i poden fins i tot regressar si el procés de formació de fibril·les d'amilina és aturat (240). Per tant, les estratègies terapèutiques hauran de ser dirigides en dues direccions: a) la inhibició de la producció de l'amilina, i b) la inhibició de la formació de fibres d'amiloide.

2.9.2.1 Inhibició de la producció d'amilina

Inhibició directa

S'ha demostrat una reducció dels nivells de l'ARNm de l'amilina en experiments *in vitro* utilitzant oligonucleòtids sintètics antisentit (521) o mitjançant adenovirus que expressen l'ADN complementari antisentit de l'amilina (522). Aquests resultats indiquen que la teràpia gènica potencialment podria ser efectiva en la supressió de la producció d'amilina.

Inhibició indirecta

Donat que els gens de la insulina i de l'amilina presenten elements promotors reguladors comuns, l'expressió d'ambdós gens és habitualment coregulada (282, 283). En conseqüència, fàrmacs capaços d'inhibir l'expressió del gen de la insulina, també inhibiran simultàniament l'expressió del gen de l'amilina. Així mateix, una reducció dels requeriments de la producció endògena d'insulina també disminuirà la producció d'amilina i, per tant, pot inhibir indirectament la formació de dipòsits d'amiloide. Aquesta reducció pot ser assolida iniciant precoçment el tractament amb insulina en el curs de la diabetis tipus 2 (523), o mitjançant fàrmacs capaços de disminuir la producció endògena de glucosa (524) o d'augmentar la sensibilitat a la insulina (525). Així, s'ha demostrat una disminució de les concentracions plasmàtiques d'amilina amb tractament amb insulina i metformina (523, 524). Per contra, donat el seu efecte estimulador de la secreció d'insulina, el tractament amb sulfanilurees incrementa les

concentracions d'amilina (331), i aquesta acció potencialment amiloidogènica podria ser el mecanisme responsable del fracàs secundari observat freqüentment amb l'ús d'aquests fàrmacs.

2.9.2.2 Inhibició de la formació de fibres d'amiloides

Com s'ha discutit prèviament, s característica comuna a tots els dipòsits de substància amiloide, independentment de la seva localització i de si es tracta d'una forma localitzada o sistèmica, la presència de components que potencialment poden estabilitzar-los, tals com el component sèric P, l'apoproteïna E i el perlecan. Per tant, el bloqueig de la seva unió a les fibril·les en formació podria inhibir el procés d'amiloidogènesi (246, 526).

Finalment, estudis en la malaltia d'Alzheimer han mostrat una inhibició del procés de fibril·logènesi com a resultat del tractament amb anticossos específics dirigits contra la proteïna β -amiloides (527) i després de l'addició de pèptids sintètics capaços de trencar les fibril·les formades (528). Aquests resultats podrien proporcionar la base d'una nova aproximació terapèutica per prevenir la formació d'amiloides en la diabetis tipus 2.

Els dipòsits d'amiloide s'observen en els illots pancreàtics de la immensa majoria de persones que han sofert diabetis mellitus tipus 2, constituint un fet característic de la història natural de la malaltia. Així, s'ha demostrat la presència d'aquests dipòsits en les autòpsies de més del 90% de pacients amb diabetis tipus 2.

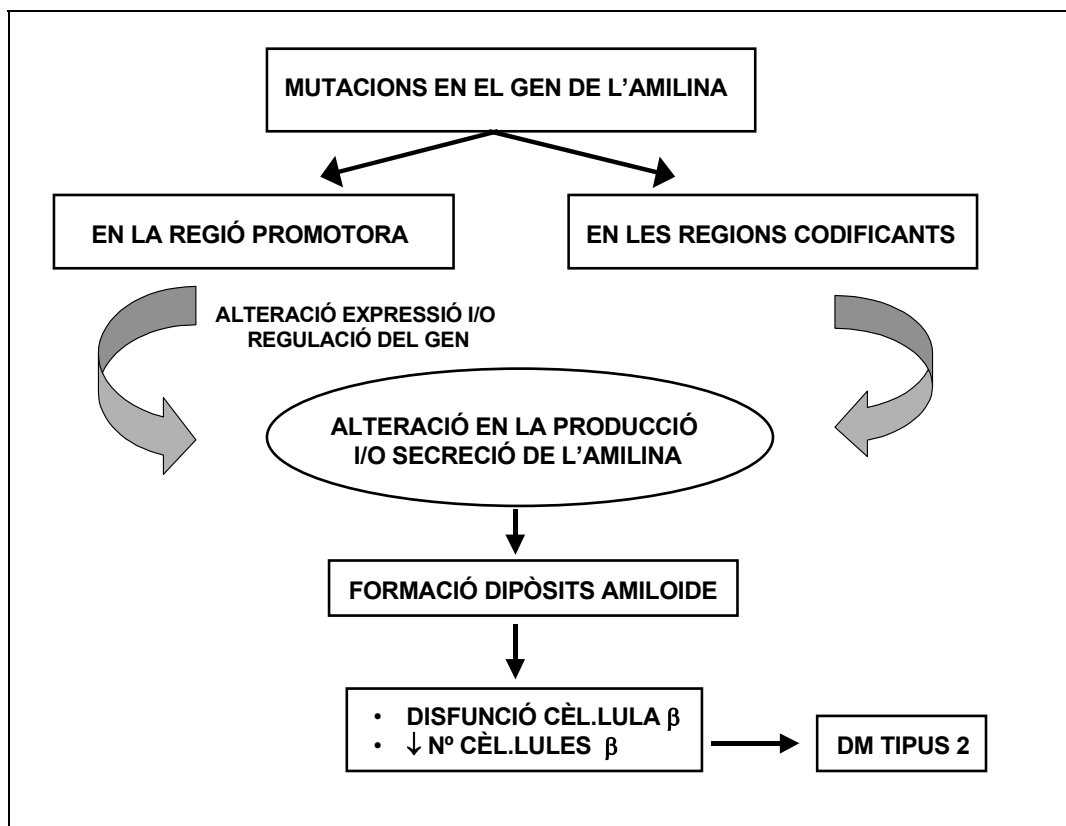
El principal component dels dipòsits de substància amiloide als illots pancreàtics és un pèptid de 37 aminoàcids sintetitzat per la pròpia cèl·lula β pancreàtica i secretat amb la insulina, anomenat amilina (IAPP: "*islet amyloid polypeptide*"). Actualment es postula que la formació de fibril·les d'amilina a l'illot pot exercir un paper rellevant en l'etiopatogènia de la diabetis tipus 2, contribuint a la disfunció de la cèl·lula β pancreàtica i a la progressiva reducció de la població cel·lular β . Aquesta troballa no és comuna a totes les espècies animals: només humans, primats i felins són capaços de formar dipòsits d'amiloide en els seus illots pancreàtics, mentre que altres espècies, com ratolins, no ho són. La especificitat s'atribueix a les variacions d'aminoàcids en la porció central de la molècula de l'amilina i, específicament, la seqüència d'aminoàcids 24-28 Gly-Ala-Iso-Leu-Ser (seqüència GAILS) és crítica per la formació d'aquests dipòsits en persones amb diabetis tipus 2. Espècies animals en què els aminoàcids de la seqüència GAILS són substituïts per prolines, com succeeix en ratolins, són incapaces de formar fibres de substància amiloide. Però, no obstant això, el fet que els dipòsits d'amiloide no siguin habitualment observats en persones sanes no diabètiques, posa de manifest que la crítica seqüència amiloidogènica del pèptid és absolutament necessària però no suficient per a la seva formació, i altres factors estarien involucrats.

Els determinants moleculars del procés d'amiloidogènesi són actualment encara totalment desconeguts. La **hipòtesi de treball** del present projecte de tesi doctoral es basa en el fet que els dipòsits d'amiloide serien secundaris a una alteració

en la expressió de l'amilina o bé en la síntesi del pèptid, i aquesta alteració podria estar determinada per un defecte genètic, localitzat:

- a) en les regions codificants del gen de l'amilina, la qual cosa podria provocar alteracions en la estructura del pèptid (per exemple, incrementant la tendència a l'agregació de les fibril·les d'amilina)
- b) en la regió promotora del gen de l'amilina, que podria provocar alteracions en la regulació o expressió del gen, conduint a una hiperexpressió del gen, amb el conseqüent increment en la síntesi i/o secreció de l'amilina.

La Figura 1 representa un esquema de la hipòtesi de la formació de dipòsits d'amiloid.



Objectiu 1

Investigar la possible presència de mutacions en els exons 1, 2 i 3 del gen de l'amilina en pacients amb diabetis tipus 2 i diabetis gestacional, analitzant els possibles trets clínics característics del pacients portadors de mutacions o polimorfismes, per tal d'establir si existeix una correlació fenotip-genotip.

Objectiu 2

Investigar la possible presència de mutacions en la regió promotora del gen de l'amilina, responsable de l'expressió gènica, en pacients amb diabetis tipus 2 i diabetis gestacional, i analitzar els trets característics de pacients portadors de mutacions.

Objectiu 3

Estudi genètic i clínic del pedigrí familiar de pacients portadors de mutacions en el gen de l'amilina, per determinar la forma de transmissió i establir la possible presència de trastorns en la tolerància a la glucosa i en la secreció d'insulina i amilina en familiars portadors.

Objectiu 4

Investigar en cèl·lules MIN6 si les mutacions detectades en la regió promotora són capaces de modificar l'activitat del promotor de la amilina, així com estudiar els mecanismes de regulació de l'activitat del promotor de l'amilina, amb les seqüències salvatge i mutada.

1.- Pacients

La població total estudiada va incloure 392 persones no relacionades d'origen caucàsic: 186 pacients amb diabetis tipus 2, 130 controls sans, 38 dones amb diabetis gestacional i 38 dones gestants amb tolerància normal a la glucosa.

L'estudi va ser aprovat pel comitè ètic de l'Hospital Clínic, i totes les persones incloses a l'estudi van signar el consentiment informat.

1.1- Estudi de pacients amb DM tipus 2 i controls sans

Va ser estudiada una mostra poblacional de 186 pacients amb DM tipus 2 seleccionats aleatòriament a partir de la consulta externa de la Unitat de Diabetologia de l'Hospital Clínic de Barcelona, consistent en 99 homes i 87 dones, amb edat mitja de 63 ± 10 anys, índex de massa corporal (IMC) de $28,5 \pm 5,3$ Kg/m², i temps d'evolució de la malaltia de 12 ± 9 anys. Tots els pacients inclosos compliren el criteris diagnòstics de diabetis tipus 2 acceptats per l'Organització Mundial de la Salut (529). La població de controls va incloure 130 persones sanes no diabètiques i sense antecedents familiars de DM, reclutades a partir de les parelles dels pacients i personal sanitari del servei d'Endocrinologia i Diabetis de l'Hospital Clínic: 68 homes i 62 dones, amb edat mitja de 51 ± 13 anys i IMC de $27,6 \pm 4,1$ Kg/m². Els criteris de selecció pels controls van ser: absència d'antecedents familiars de DM i absència de malalties cròniques.

L'estudi fenotípic va incloure una sèrie de dades clíniques: edat i sexe; pes i talla; IMC, calculat com pes (Kg) / alçada² (m); antecedents familiars de diabetis; temps d'evolució de diabetis (anys); tipus de tractament actual (insulina, sulfanilurees, metformina, acarbosa, dieta); fracàs previ al tractament amb antidiabètics orals; hipertensió arterial (HTA); complicacions cròniques associades a diabetis (retinopatia, nefropatia, polineuropatia, macroangiopatia i neuropatia autonòmica).

La macroangiopatia diabètica va ser definida per la presència de malaltia coronària, vascular perifèrica o cerebrovascular, o bé per més d'una d'aquestes malalties. Els pacients amb antecedents patològics d'angina de pit, infart agut de miocardi o amb signes electrocardiogràfics de necrosi, foren considerats com portadors de malaltia coronària. La malaltia vascular perifèrica va ser definida per l'existència de simptomatologia clínica compatible amb claudicació intermitent, absència de polsos distals, exploració amb Doppler d'extremitats inferiors patològica, o història prèvia de cirurgia vascular reconstructiva o d'amputació. La malaltia cerebrovascular va ser definida per l'existència documentada d'un accident vascular cerebral i/o estenosi (>70%) o obliteració de les artèries caròtides en l'exploració amb Doppler i/o imatge suggestiva en l'exploració radiològica (escàner o ressonància).

El diagnòstic de retinopatia diabètica va ser establert per la presència de més de cinc microaneurismes, amb o sense hemorràgies, exudats durs o neoformació de vasos en l'exploració oftalmològica amb completa dilatació pupil·lar, o bé per antecedents de laserteràpia prèvia de la retina per causa de diabetis.

La nefropatia diabètica inicial va ser definida per una excreció d'albúmina en orina de 24h entre 20-200 µg/min en dos o més determinacions (en absència d'una infecció urinària), la nefropatia clínica per una excreció d'albúmina superior a 200 µg/min.

La neuropatia diabètica va ser definida en funció dels criteris de la *Conferència de San Antonio* sobre neuropatia diabètica (530, 531).

1.2- Estudi de pacients amb diabetis gestacional i controls gestants

La segona població objecte d'estudi va incloure una cohort de 76 dones gestants remeses a la Unitat de Diabetis per valoració de la tolerància a la glucosa entre la 22-31 setmana gestacional (mitja 26^a setmana gestacional). Van ser

estudiades 38 dones amb diabetis gestacional (edat mitja $31,7 \pm 4,6$ anys, IMC $26,6 \pm 4,9$ Kg/m²) i 38 dones amb tolerància normal a la glucosa (controls gestants), d'edats i IMC semblants (Taula 1).

Taula 1

	Controls gestants	Diabetis gestacional
n	38	38
Edat (anys)	$30,9 \pm 4,5$	$31,7 \pm 4,6$
Antecedents familiars DM	7/38 (18,4 %)	18/38 (47,4 %)
IMC pregestacional (Kg/m ²)	$24,7 \pm 4,5$	$26,6 \pm 4,9$
Increment de pes (kg)	$11,3 \pm 3,3$	$9,8 \pm 3,3$
IMC al final gestació	$29,1 \pm 4,7$	$30,6 \pm 5,1$
O'Sullivan 2 ⁿ trimestre (mmol/l)	$5,4 \pm 1,2$	$9,8 \pm 1,9$
O'Sullivan 3 ^r trimestre (mmol/l)	$6,2 \pm 1,2$	$9,9 \pm 0,7$
SG al diagnòstic	-	$26,4 \pm 4,9$
Antecedents previs de DG	0/38	4/38 (10,5%)
Avortaments previs	11/38 (29%)	19/38 (50%)
Antecedents de macrosomia	1 /38 (2,6%)	9/38 (23,7%)
Antecedents de multiparitat	1/38 (2,6%)	7/38 (18,4%)
Antecedent de mort fetal	0/38	0/38
Primiparitat	16/38 (42,1 %)	18/38 (47,4%)
Tractament	-	- 29/38 (76%) dieta - 9/38 (24%) insulina
Dosi insulina (unitats/Kg/dia)	-	$0,2 \pm 0,1$
HTA crònica	1/38 (2,6%)	7/38 (18,4%)
Preeclàmpsia	2/38 (5,2%)	0/38
Setmana gestacional part	$39,1 \pm 1,4$	$38,2 \pm 1,5$
Pes nadó (g)	$3184 \pm 526,3$	$3100 \pm 676,7$
Complicacions neonatals		
- prematuritat	1/38 (2,6 %)	3/38 (7,9 %)
- macrosomia	3/38 (7,8 %)	1/38 (2,6%)
- Hipoglucèmia	2/38 (5,2 %)	4/38 (10,5%)
- Baix pes edat gestacional	4/38 (10,5%)	3/38 (7,9 %)
- icterícia	1/38 (2,6 %)	2/38 (5,2 %)

Les dades són expressades en número, mitja \pm DE (desviació estàndard), o %. DG, diabetis gestacional; SG, setmana gestacional; IMC, índex de massa corporal.

La tolerància hidrocarbonada va ser avaluada al llarg de la gestació mitjançant el test de O'Sullivan i prova de tolerància oral a la glucosa (PTOG) amb 100 g de glucosa i després de 3 dies de dieta no restrictiva en hidrats de carboni (>150 g de carbohidrats al dia). El test de O'Sullivan, prova que té una sensibilitat del 79% i una especificitat del 87% pel diagnòstic de la diabetis gestacional, fou considerat patològic davant d'una glucèmia en sang venosa superior a 140 mg/dl després de l'administració oral de 50 g de glucosa, confirmant-se el diagnòstic de diabetis gestacional amb la realització de la PTOG. El diagnòstic de diabetis gestacional es va definir per la presència de 2 o més punts de la PTOG per sobre dels valors normals, segons els criteris de O'Sullivan-Mahan: 0' < 105 mg/dl; 60' < 190 mg/dl; 120' < 165 mg/dl; 180' < 145 mg/dl (532).

1.3- Estudi familiar

Els familiars de primer grau de provands portadors de mutacions en el gen de l'amilina van ser estudiats, practicant-se estudi genètic i bioquímic, així com una PTOG estàndard per mesurar glucosa, insulina, amilina i ALP ("*amylin-like peptide*", pèptid semblant a l'amilina) als 0, 30, 60, 90 i 120 minuts.

2.- Determinacions bioquímiques i hormonals

Les determinacions bioquímiques i hormonals van incloure: glucèmia, hemoglobina glicosilada (HbA1c), perfil lipídic (colesterol total, colesterol HDL i LDL, triglicèrids), apolipoproteïna E, microalbuminúria de 24h, proinsulina, insulina, pèptid C, amilina i ALP.

La glucèmia fou determinada mitjançant el mètode de la glucosa oxidasa. La concentració urinària d'albúmina va ser mesurada en col·leccions d'orina de 24h

mitjançant immunonefelometria. Les concentracions sèriques de colesterol i triglicèrids van ser mesurades mitjançant mètodes enzimàtics (Trinder, Bayer Diagnostics, Tarrytown, Nova York), adaptats a un analitzador automàtic Cobas Mira (Hoffman-La Roche, Basel, Suïssa). Les concentracions de colesterol HDL van ser determinades utilitzant un anticòs contra la β -lipoproteïna humana (Sigma Diagnostics, St Louis, Missouri). Les concentracions de colesterol LDL van ser calculades mitjançant la fórmula de Friedewald (533) si els nivells de triglicèrids no eren superiors a 3,45 mmol/l i per ultracentrifugació quan eren $\geq 3,45$ mmol/l.

Les concentracions d'apolipoproteïna E (apo E) en sèrum van ser mesurades mitjançant un mètode nefelomètric (Dade Behring, Marburg, Alemanya), amb un coeficient de variació (CV) intra i interassaig de 2,9% i 4,1%, respectivament, presentant uns valors de referència de 23-63 mg/l (corresponents a l'interval entre els percentils 2,5-97,5).

Les concentracions plasmàtiques de proinsulina van ser determinades per radioimmunoassaig (Linco Research Inc., St Charles, Missouri), amb CV intra i interassaig de 5,2 % i 7,2%, respectivament. Les concentracions plasmàtiques d'insulina van ser mesurades per IRMA (Medgenix Diagnostics, Fleures, Bèlgica), amb CVs intra i interassaig de 5,2% i 6,9%, respectivament. Les concentracions plasmàtiques del pèptid C van ser mesurades per radioimmunoassaig, amb CV intra i interassaig de 2,6% i 4,4%.

Les concentracions plasmàtiques d'amilina i d'ALP van ser quantificades mitjançant un immunoassaig enzimàtic desenvolupat per Amylin Pharmaceuticals (534), utilitzant dos anticossos monoclonals. L'amilina és determinada mitjançant l'anticòs F0024, que reconeix un epítip ubicat a prop de la regió aminoterminal del pèptid, per la qual cosa requereix la integritat del pont disulfur de la molècula. Per la

determinació d'ALP, concepte que engloba formes glicosilades del pèptid d'elevat pes molecular produïdes durant el processament normal en la cèl·lula β pancreàtica (535), fou utilitzat l'anticòs monoclonal F0025-27. Aquest anticòs reconeix la regió carboxiterminal del pèptid, per la qual cosa requereix l'amidació de la tirosina carboxiterminal (és incapaç de reconèixer el pèptid deamidat). Les concentracions mínimes detectables d'amilina i ALP són 1,9 pmol/l i 3,7 pmol/l, respectivament. Els CV intra i interassaig són de 10% i 15%, respectivament, per ambdós pèptids.

3.- Estudi de l'ADN

3.1- Extracció de l'ADN genòmic

L'extracció de l'ADN genòmic a partir dels leucòcits de sang perifèrica va incloure les següents fases:

a) Obtenció de leucòcits

REACTIUS I SOLUCIONS

Solució de lisi d'eritròcits

Reactius: 5 ml de Tris-HCl 2 M (pH 7,5) i 2,5 ml de $MgCl_2$ 1M, afegint H_2O destil·lada fins aconseguir un volum total de 500 ml.

METODOLOGIA

- Posar 10 ml de sang total no congelada en un tub de 50 cc i afegir sèrum fisiològic.
- Centrifugació a 7-8 g durant 10 minuts a 4°C.
- Decantar el sobrenedant deixant la capa cel·lular. Afegir solució de lisi d'eritròcits i agitar suaument fins aconseguir la total dissolució de la mescla.
- Centrifugació a 10 g 15 minuts a 4°C.

- Decantació del tub i afegir, novament, lisi d'eritròcits fins a un volum total de 50 cc i agitar suaument.
- Centrifugació a 10 g 15 minuts a 4°C.
- Decantació del tub. En aquest punt, es pot congelar el *pellet* obtingut a –20°C, o bé es pot continuar el procés d'extracció d'ADN.

b) Digestió de proteïnes

REACTIUS I SOLUCIONS

Solució de lisi de leucòcits

Reactius: 40 ml NaCl 5M, 2 ml EDTA sòdic 0,5 M pH 8, 2,5 ml Tris-HCl 2M pH 7,5 , afegint H₂O destil·lada fins aconseguir un volum total de 500 ml.

Solució de proteïnasa K

Reactius: 100 mg proteïnasa K, 5 ml SDS 10%, 200 µl EDTA sòdic 0,5 M pH 8, afegint H₂O destil·lada fins a un volum total de 50 ml. Es guarda en alíquotes de 1ml a –20°C.

METODOLOGIA

- Afegir de 6 ml de solució de lisi de leucòcits, 400 µl de SDS al 10% i 1 ml de solució de proteïnasa K. Agitació amb vòrtex fins a l'obtenció d'una solució d'aspecte homogeni.
- Deixar a 37°C en estufa durant tota la nit.

c) Extracció de l'ADN

METODOLOGIA

- Afegir 1,3 ml d'una solució de NaCl 5,5 M. Agitar durant 15'' en vòrtex i centrifugació a 10 g 15 minuts a 4°C.

- Traspasar el sobrenedant a altre tub de 50 cc i tornar a centrifugar a 10 g 15 minuts a 4°C.
- Recollir el sobrenedant i afegir 7,5 ml de cloroform. Agitar manualment i centrifugar a 10 g durant 5 minuts.
- Traspasar la fase superior a un altre tub i afegir 15 ml d'etanol absolut. Agitar fins a la precipitació de l'ADN en forma de xarxa (medusa d'ADN)
- Efectuar 2 rentats amb 1 ml d'etanol al 70% a -20°C i passar a un tub Nunc de 3,6 ml.
- Afegir 500 µl Tris-HCl 10mM / EDTA 0,2 mM (pH 7,5) a l'ADN i deixar a 37°C en agitació.
- La valoració de la concentració de l'ADN es realitzarà per espectrofotometria a 260 nm i a 280 nm.

3.2- Amplificació per PCR

L'amplificació de l'ADN es va portar a terme mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa o PCR (*polymerase chain reaction*).

SOLUCIONS I REACTIUS

- ADN patró (ADN genòmic obtingut de leucòcits).
- Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Gaithersburg, MD): 5U/µl.
- Tampó de reacció 10 x (subministrat amb l'enzim).
- MgCl₂ 50 mM.
- Barreja equimolar (10mM) de dATP, dCTP, dGTP, dTTP.
- Oligonucleòtids encebadors específics (representats a les Taules 2 i 3), a concentració de 20 µl.
- Oli mineral (2 gotes).

EQUIPAMENT

- Termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc Watertown, Massachusetts).

PROCEDIMENT

La barreja dels components es realitza en tubs eppendorf amb capacitat de 0,5 ml. La reacció de PCR es du a terme en un volum de 50 μ l contenint 100 ng d'ADN genòmic, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs, 1 μ M de cada oligonucleòtid, i 2,5 unitats de Taq polimerasa. L'addició dels diferents reactius es pot fer a cada tub per separat i de manera successiva, o alternativament, es pot preparar una mescla de reacció comuna que contingui tots els components excepte l'ADN.

Les quantitats de cada reactiu descrites a continuació corresponen a un volum de 50 μ l:

<u>Reactius</u>	<u>Volum</u>
- Tampó de reacció 10 x	5 μ l
- $MgCl_2$ 50 mM	1,5 μ l
- dNTPs 10 mM	1 μ l
- Oligonucleòtid encebador 5' 20 μ M	2,5 μ l
- Oligonucleòtid encebador 3' 20 μ M	2,5 μ l
- Taq polimerasa 5U/ μ l	0,5 μ l
- ADN + H ₂ O destil·lada	37 μ l
	50 μ l volum total

3.2.1 Amplificació de la regió promotora

Van ser dissenyades 4 parelles d'oligonucleòtids per l'amplificació d'una regió del promotor del gen de l'amilina compresa entre -571pb i +163pb del punt d'inici de la transcripció. La Taula 2 mostra la seqüència dels oligonucleòtids utilitzats i els

fragments amplificats. La Figura 1 mostra el fragment amplificat de la regió promotora del gen de l'amilina, amb la ubicació de les 4 parelles d'oligonucleòtids (en colors verd, blau, vermell i rosa, respectivament).

Taula 2

Fragment amplificat	Oligonucleòtid sentit	Oligonucleòtid antisentit
-571bp a -375pb	5'-TCCCTGTCATATCTCTGGTA-3'	5'-CCAAGTGACCTCAATGGCTG-3'
-418bp a -172pb	5'-TATTCCTGAAGCTTCATGGG-3'	5'-CGTAGCAAATACACAGTGT-3'
-229bp a +38 pb	5'-ACTTCTGCTGTGTATGACACACCA-3'	5'-GAGTCCAAGCTTGTATCCACTGGA-3'
-85bp a +163pb	5'-ATGACAGAGGCTCTCTGAGCT-3'	5'-ACACCAAGTGTGCATTTCTCT-3'

Figura 1.- Seqüència de nucleòtids de la regió promotora del gen de l'amilina

-615 ttcatttggg tatgtagcat ttgttcattc taattttggt ttgTTCCCTG TCATATCTCT
-555 GGTAcctaga ataatcccta ccacagagta ggtcttccat tactcttatg cttttaaatc
-495 tcccctcacc tcattgtaa tgacttttga tttctctttt atgcctttt tatacacctt
-435 tccttatat ctccattTAT TCCTGAAGCT TCATGGGatt CAGCCATTGA
GGTCACTTGG
-375 gtttagatat accaaaagtc tgtgatttct ctgtttgcat atatgcacat ttgttggtat
-315 ccttaccctt ttctatcagt tccttaccat aacatacact taattcttgg aaatttactc
-255 atgtcttaca aagatggcaa attcaaACTT CTGCTGTGTA TGACACACCA ttaactgcac
-195 aaggACACTG TGTATTTGCT ACGttaatat ttactgatga gttaatgtaa taatgacca
-135 tccgcttctg ctgcctgtga ggtactttct atctataggg atggaaatta ATGACAGAGG
-75 CTCTCTGAGCtgctgatgt cagagctgag aaaggtgtga ggggtatata agagctggat
-15 tactagttag caaatgaggg ggtaaatatT CCAGTGGATA CAAGCTTGA CTCttttctt
+46 gaagctttct ttctatcaga agcatttgcg gatattgctg acattgaaac attaaaaggt
+106 aaagaatttc ctatttctgg gaaagtttta tttatttAGA GAAATGCACA CTGGTGTta

La reacció d'amplificació consisteix en una fase prèvia de calentament a 95°C durant 5 minuts seguida per 30 cicles de desnaturalització a 95°C durant 1 minut, hibridització dels oligonucleòtids amb l'ADN a temperatures específiques per cada parella d'oligonucleòtids (50°C, 50°C, 54°C i 51°C, respectivament) durant 30'', i la síntesi a 72°C durant 1 minut, amb una extensió final a 72°C durant 10 minuts.

3.2.2 Amplificació dels exons 1, 2 i 3

Van ser utilitzades 3 parelles d'oligonucleòtids per l'amplificació individual de cada exó del gen de l'amilina, incloent-hi les regions limítrofes exó/intró. La Taula 3 mostra la seqüència específica dels oligonucleòtids utilitzats. La reacció d'amplificació consisteix en una fase prèvia de calentament a 95°C durant 5 minuts seguida per 30 cicles de desnaturalització a 95°C durant 1 minut, hibridització a 51°C (exó 1)/ 49°C (exó 2)/ 50°C (exó 3) durant 1 minut, i la síntesi a 72°C durant 1 minut, amb una extensió final a 72°C durant 10 minuts. La Figura 2 mostra una representació esquemàtica del gen humà de l'amilina i l'orientació dels oligonucleòtids utilitzats.

Taula 3

Exó	Oligonucleòtids sentit	Oligonucleòtids antisentit
1	5'-ATGACAGAGGCTCTCTGAGCT-3'	5'-ACACCAAGTGTGCATTTCTCT-3'
2	5'-GAACTGTAAGAAATCTCTTG-3'	5'-GATATAGTCAGAAATCTAAGGCTG-3'
3	5'-GGCTGGATCCAGCTAAAATTC-3'	5'-GCAAGTAATTCAGTGGCTCTC-3'

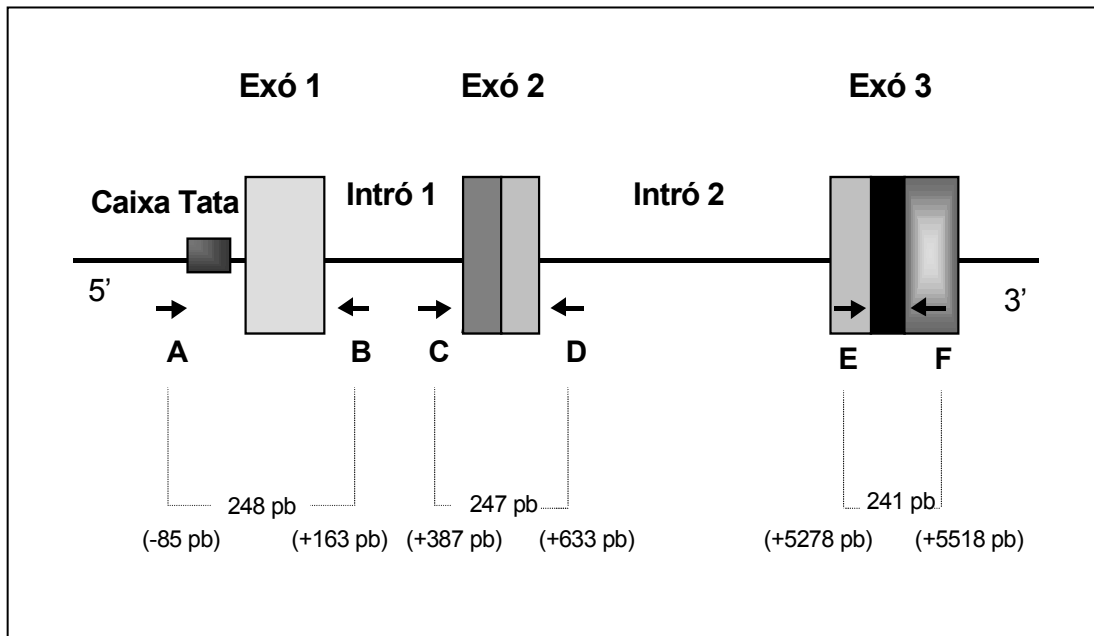


Figura 2. Representació esquemàtica del gen humà de l'amilina amb l'orientació dels oligonucleòtids utilitzats en la amplificació per PCR i els respectius fragments resultants. El primer fragment amplificat (oligonucleòtids A i B, seqüència compresa entre -85pb i $+163\text{pb}$ del punt d'inici de la transcripció) és de 248pb . El segon fragment (oligonucleòtids C i D, entre $+387$ i $+633\text{pb}$) és de 247pb . El tercer fragment amplificat (oligonucleòtids E i F, entre $+5278$ i $+5518\text{pb}$) és de 241pb .

3.2.3 Electroforesi de l'ADN en gel d'agarosa

L'ADN obtingut en les reaccions de PCR descrites prèviament serà sotmès a una electroforesi horitzontal per comprovar, i més endavant purificar, si el nostre fragment d'ADN ha estat amplificat, i si és així, extreure l'ADN de l'agarosa per tal de, finalment, seqüenciar-lo.

Els gels d'agarosa tenen menor poder de resolució que altres tipus de gels, això no obstant, tenen gran poder de separació ($70\text{-}800.000\text{pb}$), i el seu maneig és senzill. El poder de separació està directament relacionat amb el percentatge de l'agarosa.

% agarosa	Interval eficient de separació en Kb
0,3	5-60
0,6	1-20
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

REACTIUS

- Agarosa (Gibco BRL ultrapura)
- Solució de bromur d'etidi a concentració final 5 µg/ml (50 mg de bromur d'etidi en 100 ml H₂O)
- Solució TAE x 50 (Tris-acetat/EDTA) amb un pH de 8,5
 - Tris-HCl 2M 242 g.
 - Àcid acètic glacial 57,1 ml.
 - EDTA sòdic 100 mM 37,2 g.

 afegir H₂O destil·lada fins aconseguir un volum total de 1 l.
- Marcador d'ADN de pes molecular apropiat.
- Tampó de càrrega x 10 (preparat amb 20% Ficoll 400, EDTA sòdic 0,1 M pH 8, 0,25% blau de bromofenol i 0,25% xilècianol)

EQUIPAMENT

- Microones
- Aparell horitzontal d'electroforesi
- Cubeta i font d'electroforesi, pintes

PROCEDIMENT

Preparació d'un gel d'agarosa

- Segellar els laterals del motlle per fer gels amb una cinta adhesiva i col·locar una pinta, que constituirà els pous de càrrega i les carreres de les mostres.
- Mesclar en un matràs 1 g d'agarosa en 50 ml de TAE x 1 (agarosa 2%). S'escalfa al microones per tal de dissoldre l'agarosa i obtenir una solució transparent i homogènia.
- Deixar refredar la solució a temperatura ambient fins a uns 50° C, i afegir bromur d'etidi a concentració final de 0,5 µl/ml (2-3 µl).
- Abocar la mescla al motlle per fer gels i deixar solidificar de 30 min a 1 hora a temperatura ambient.
- Un cop solidificat el gel, retirar la cinta adhesiva i la pinta amb cura i col·locar el gel en la cubeta d'electroforesi plena de tampó TAE x 1.

Preparació de les mostres

- Afegir a cada mostra la quantitat adient de tampó de càrrega 6 vegades concentrat (20% del volum de la mostra). Es mesclen bé les mostres amb el tampó de càrrega i es carreguen en els pous del gel. S'afegirà un marcador de pes molecular en el primer pou per controlar que el tamany de la mostra sigui l'adequat. La finalitat del tampó de càrrega és la d'augmentar la densitat i proporcionar color a la mostra, facilitant així mateix la seva càrrega en el gel i la visibilitat del seu front de migració a través del gel en direcció a l'ànode.

Condicions d'electroforesi

- Una vegada carregades les mostres, es connecta la font d'electroforesi a voltatge constant de 50 V, a temperatura ambient. Finalitzada l'electroforesi, el gel s'inspecciona sobre un transil.luminòmetre de llum ultraviolada.

3.3- Anàlisi de polimorfismes

L'anàlisi de polimorfismes es va practicar mitjançant estudi conformacional de cadena senzilla (SSCP: *single-strand conformation polymorphism*). Aquesta tècnica es basa en el fet que si es desnaturalitza l'ADN amplificat per PCR i es deixa renaturalitzar alhora que es realitza una electroforesi, a més de la banda de l'ADN corresponent a la doble cadena, s'obtidran bandes de conformacions secundàries de les cadenes senzilles, que varien segons les bases del fragment. Si es disposa d'ADNs que presentin un o més canvis nucleotídics, aquests poden afectar a les conformacions, que seran visualitzades en un gel de poliacrilamida mitjançant tinció amb nitrat de plata.

El poder efectiu de separació de molècules d'ADN en gels de poliacrilamida està directament relacionat amb el percentatge d'acrilamida:

% acrilamida	Interval eficient de separació en pb
3,5	1000-2000
5,0	80-500
8,0	60-400
12,0	40-200
15,0	25-150
20,0	6-100

REACTIUS I SOLUCIONS

Solució d'acrilamida/ bisacrilamida 29: 1

Reactius: 29 g. acrilamida, 1 g. bisacrilamida (Boehringer Mannheim), afegint H₂O destil·lada fins aconseguir un volum total de 100 ml. Emmagatzemar com a màxim un mes a 4°C. L'acrilamida és neurotòxica, per tant caldrà sempre utilitzar guants quan es treballi amb el monòmer polimeritzat.

Solució TBE x 10 (Tris/borat/EDTA)

Reactius: 108 g. Tris-HCl (890 mM), 55 g. àcid bòric (890 mM), 40 ml EDTA sòdic 0,5 M , pH 8, afegint H₂O destil·lada fins aconseguir un volum total d'un litre.

Solució de persulfat d'amoni al 10%

Reactius: mesclar 2 g. de persulfat d'amoni en 20 ml H₂O destil·lada

Gel de poliacrilamida al 12%

- 12 ml de solució d'acrilamida/ bisacrilamida 29:1
 - 3 ml de solució de TBE x 10 (pH = 8)
 - 15 ml H₂O destil·lada
 - 263 µl de solució de persulfat d'amoni al 10% (emmagatzemat a 4°C màxim un mes)
 - 41 µl de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina) emmagatzemat a 4°C
- * en el cas de l'exó 3, els gels contenen addicionalment 3 ml de glicerol al 50% (i, per tant, només 12 ml H₂O destil·lada)

Solució oxidant

Reactius: 15,4 ml àcid nítric al 65% en 984,6 ml H₂O destil·lada

Solució de tinció

Reactius: 2,02 g. de Na₂CO₃ en 1 l. H₂O destil·lada

Solució de revelat

Reactius: 29,6 g. de Na₂CO₃ deshidratat, 540 µl formaldehid al 37%, afegint H₂O destil·lada fins aconseguir un volum total d'un litre.

EQUIPAMENT

- Aparell i font d'electroforesi
- Vidres i separadors
- Pinces d'ajustament, pintes, xeringues de plàstic amb agulla
- Assecadora de gels

PROCEDIMENT

L'estudi conformacional de cadena senzilla o SSCP es va dur a terme segons la tècnica descrita per *Orita i col.* (536).

Preparació d'un gel de poliacrilamida

- Rentar bé els vidres amb alcohol. Posar els separadors entre els dos vidres, ajustant-los amb les pinces de plàstic. Col·locar el conjunt a la cubeta inferior d'electroforesi, posant la pinta entre els dos vidres.
- Preparar la solució d'acrilamida pel gel al 12%.
- Transferir amb l'ajuda d'una xeringa de plàstic la solució entre els dos vidres, amb molta cura de que no es formin bombolles. Deixar solidificar com a mínim 1h.

Preparació de les mostres

- Afegir en un tub eppendorf a cada mostra la quantitat adient de tampó de càrrega de SSCP (en general, 2 μ l de mostra i 7 μ l de tampó). Desnaturalització dels productes amplificats (mitjançant calentament a 95°C durant 5 min). Carregar les mostres en els pous del gel. Prèviament s'haurà afegit a les dues cubetes solució d'electroforesi TBE x 1 (100 ml de solució TBE x 10 i 900 ml H₂O destil·lada).

Condicions d'electroforesi

- Connectar la font d'electroforesi una vegada carregades les mostres. Les específiques condicions electroforètiques per cada fragment són les següents: regió promotora i exó 1, electroforesi a temperatura ambient, 160V, 16-20h; exons 2 i 3: 4°C, 200V, 16h.

Tinció del gel de poliacrilamida amb solució de nitrat de plata

- Desconnectar la font, desmuntar l'aparell i separar els dos vidres. Tractar a continuació el gel amb les diferents solucions evitant que es trenqui en el processament.
- Submergir el gel en una solució d'etanol al 10% durant 10 minuts.
- Abocar la solució anterior, i a continuació tractar el gel amb la solució oxidant durant 3 minuts.
- 2 rentats breus (aproximadament de mig minut) amb H₂O destil·lada.
- Afegir la solució de tinció amb nitrat de plata i deixar el gel en incubació durant 20 minuts.
- 2 rentats breus amb H₂O destil·lada.
- Revelar el gel amb la solució de bicarbonat sòdic. El revelat s'ha d'efectuar en dos passos: primer abocar la meitat de la solució fins a la producció d'un precipitat de color marró; a continuació, afegir la resta fins a obtenir les bandes amb la intensitat desitjada.
- Parar la reacció amb solució d'àcid acètic al 10% durant 5-10 minuts.
- Finalment, transferir el gel a un paper Whatmann i connectar la assecadora de gels durant 2h a 60°C. Analitzar el patró de migració obtingut.

3.4 Purificació de fragments d'ADN a partir de gels d'agarosa

Les mostres amb patró electroforètic de migració aberrant van ser purificades després d'electroforesi en un gel d'agarosa utilitzant el sistema d'extracció QIAEX II.

El procés de purificació comprèn: 1) solubilització de l'agarosa i adsorció quantitativa de l'ADN a les partícules de silici en presència d'una concentració de sal elevada; 2) rentats per tal d'eliminar impureses com l'agarosa, proteïnes, sals i bromur d'etidi; 3) elució de l'àcid nucleic en una solució de concentració salina baixa: tampó TE (10mM tris-HCl, 1mM EDTA sòdic, pH 8) o H₂O pura.

SOLUCIONS I REACTIUS

- QIAEX II gel extraction Kit (Qiagen Inc., Chatsworth, EUA).

EQUIPAMENT

- Bisturí i transil.luminòmetre de llum ultraviolada d'ona llarga.
- Bany a 50°C.
- Microcentrífuga

PROCEDIMENT

- 1- Tallar amb bisturí sota llum ultraviolada la banda d'ADN a purificar (procurar que el fragment d'agarosa no superi un pes de 250 mg) i transferir a un tub eppendorf de 1,5 ml.
- 2- Afegir 3 volums de la solució de solubilització de l'agarosa o tampó QX1 (300 µl per 100 mg d'agarosa). Aquesta solució conté una elevada concentració d'una sal caotrópica que trenca els ponts d'hidrogen entre els sucres del polímer d'agarosa. Per altra banda, l'elevada força iònica també facilita la dissociació de les proteïnes d'unió a l'ADN.
- 3- Després d'agitar la mescla amb vòrtex (30''), afegir 10 µl de la suspensió de partícules de silici o QIAEX II i tornar a agitar amb vòrtex.
- 4- Incubació a 50°C durant 10 minuts, per tal de solubilitzar l'agarosa. A fi de mantenir la solució QIAEX II en suspensió, durant la incubació el tub s'agitarà amb vòrtex cada 2 minuts. L'adsorció de l'ADN a les partícules de silici només és eficient a un pH ≤ 7,5. Si el contingut del tub adquireix color

taronja o púrpura, indicarà un pH bàsic, i per tant serà necessari afegir 10 µl d'acetat sòdic 3M pH 5, fins adquirir una coloració groga, indicativa d'un pH òptim. En aquest cas, la incubació es prolongarà 5 minuts addicionals.

- 5- Centrifugació durant 30''. A continuació, treure amb molta cura el sobrenedant amb pipeta.
- 6- Efectuar un nou rentat amb el tampó QIAEXI. Resuspendre amb vòrtex, centrifugar durant 30'', i treure amb molta cura el sobrenedant amb pipeta. Aquest pas elimina l'agarosa residual.
- 7- Efectuar 2 rentats amb 500 µl del tampó PE, que conté etanol. Resuspendre amb vòrtex, centrifugar i treure novament el sobrenedant. Aquest pas elimina les sals residuals.
- 8- Les partícules de silici amb l'ADN absorbit es deixen assecar a temperatura ambient durant 10-15 minuts.
- 9- Afegir 20 µl de tampó TE o H₂O, resuspendre amb vòrtex, i incubar a temperatura ambient durant 5-10 minuts.
- 10- Centrifugar durant 30''. El sobrenedant que conté l'ADN purificat es separa fàcilment de la matriu que queda al fons del tub. Amb molta cura, transferir amb pipeta el sobrenedant a un tub estèril. Emmagatzemar l'ADN purificat a -20°C.

3.5 PCR de seqüenciació

Posteriorment, les mostres d'ADN purificades van ser seqüenciades utilitzant l'utilitatge de seqüenciació cíclica *Thermo SequenaseTM dye terminator Kit* (Amersham Life Science) en un seqüenciador automàtic ABI PrismTM 377 (Perkin Elmer) segons el protocol del fabricant (25 cicles a 96°C 30'', 45°C 15'', 60°C 4 minuts, i extensió final durant 10 minuts a 72°C). Les seqüències de l'ADN seran comparades a les bases de dades utilitzant el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>) (537).

4. Estudi de l'activitat del promotor

4.1- Construccions plasmídiques

L'estudi de l'activitat del promotor de l'amilina va ser realitzat mitjançant el Sistema Dual-Luciferasa (Promega) (538). Com vector experimental es va utilitzar el plàsmid pGL3-Basic (4818 pb), que conté el gen de l'enzim Luciferasa sota el control del promotor de gen de l'amilina, i com vector control de l'eficiència de la transfecció el plàsmid pRL-CMV (4079 pb) (Figura 3).

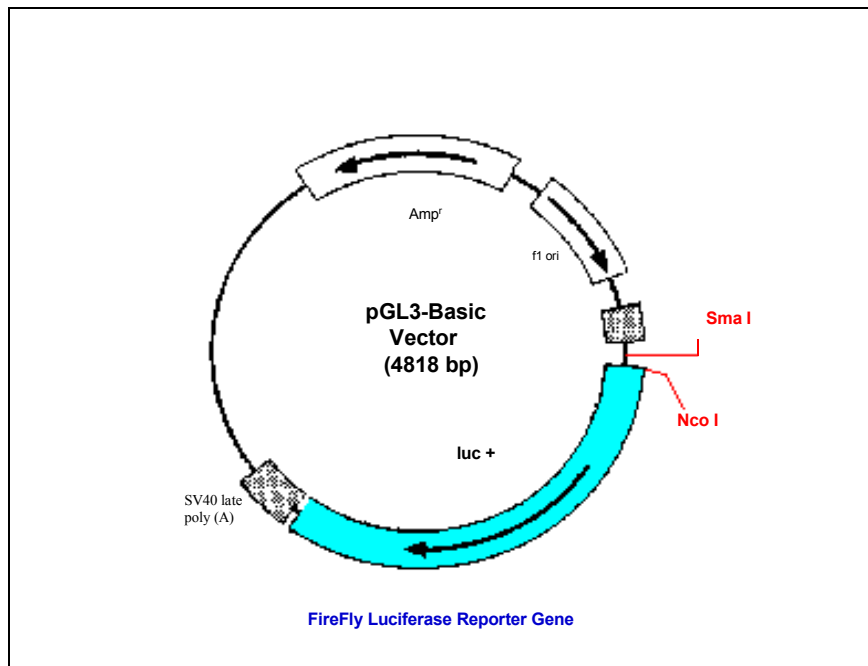
Característiques del vector pGL3-Basic:

- Manca de promotor eucariota i seqüències activadores.
- Conté el gen Luc+, clonat del *Firefly Photinus pyralis*, codificant de l'enzim *firefly luciferase*, proteïna monomèrica de 61 KDa que catalitza l'oxidació de D-luciferina, reacció que requereix la presència d'ATP, oxigen i magnesi, resultant en l'emissió de fotons (veure Figura 4). Aquesta reacció luminescent de la luciferasa és quantificada utilitzant un luminòmetre.
- Conté el gen Amp^r, conferint la resistència a l'ampicilina en *E. coli*.
- Conté una seqüència SV40 poli(A), localitzada immediatament en situació 5' del gen Luc+, origen de la replicació del plàsmid en *E. coli*.

Característiques del vector pRL-CMV:

- Conté l'ADN codificant de la *Renilla Luciferase* (Rluc), una proteïna monomèrica de 36 kDa que presenta un 3% d'hidrats de carboni en la seva composició quan és aïllada de la seva font natural, *Renilla reniformis*. La reacció luminescent catalitzada per la *Renilla luciferase* utilitza oxigen i coelenterazina (veure Figura 4).
- Conté la regió promotora del CMV, que proporciona una potent expressió constitutiva de Rluc.
- Conté, de forma anàloga, el gen Amp^r i una seqüència SV40 poli(A).

Vector pGL3-Basic



Vector pRL-CMV

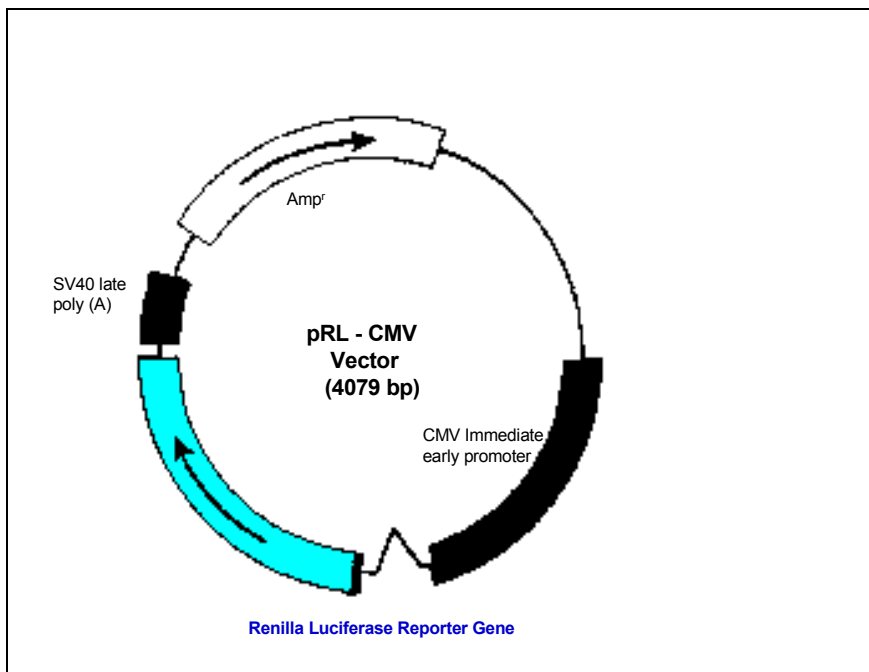


Figura 3. Mapes circulars dels vectors pGL3-Basic i pRL-CMV.

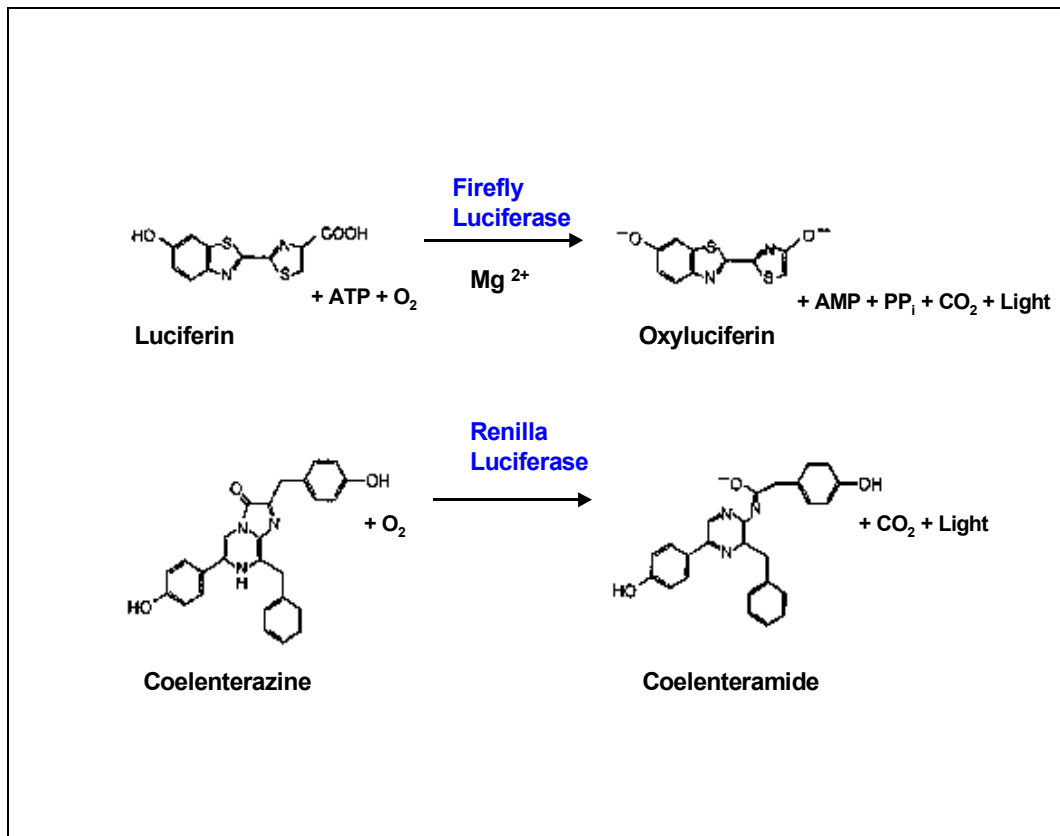


Figura 4. Reaccions bioluminiscentes catalitzades per la *Firefly* i la *Renilla luciferases*.

Es van dissenyar quatre construccions plasmídiques a partir de mostres d'ADN genòmic humà obtingudes de dos subjectes (un portador de la mutació identificada a la regió promotora, i l'altre no). Els fragments amplificats van ser clonats al vector pGL3-Basic pels llocs de restricció de Sma I i Nco I. En la meitat de les construccions el fragment clonat correspon a la seqüència de -229 a +38 pb (fragment sense intró 1, oligonucleòtid sentit 5'-ACTTCTGCTGTGTATGACACACCA-3', i antisentit 5'-GAGTC CAAGCTTGTATCCACTGGA-3'), mentre que l'altre meitat correspon a la seqüència de -229 a +458 pb (incloent intró 1, oligonucleòtid sentit 5'-ACTTCTGCTGTGTATGACACACCA-3' i antisentit 5'-GGATGCCCATGGCTTCTCAA ATTTTCTGCAAA-3').

4.2- Cultius cel·lulars

L'estudi va ser realitzat en la línia cel·lular MIN6. Aquesta línia cel·lular deriva de cèl·lules d'insulinoma de ratolí transgènic, que expressen l'antigen T SV40, sota el control del promotor del gen de la insulina de rata (539).

Les cèl·lules MIN6 van ser cultivades en el medi DMEM (*"Dulbecco's Modified Eagle Medium"*, Gibco-BRL, Gaithersburg) contenint glucosa a dos concentracions diferents –5,5 o 22,7 mM-, sèrum fetal boví al 15%, 100 U/ml de penicil·lina, 100 µg/ml de estreptomycina i 5 µmol/l de β-mercaptoetanol. Les cèl·lules van ser mantingudes a 37°C en una atmosfera contenint 5% de diòxid de carboni i tripsinitzades setmanalment.

4.3- Transfeccions cel·lulars

Les construccions plasmídiques van ser transfectades a la línia cel·lular MIN6 mitjançant lipofectamina (Gibco-BRL). Rutinàriament, 1 µg del vector pGL3-Basic salvatge o mutant va ser cotransfectat amb 20 ng del vector control pRL-CMV. La concentració proteica va ser determinada pel mètode de Bradford (Bio-Rad, Richmond, Califòrnia). Les activitats luciferasa (*firefly* i *renilla*) van ser mesurades a partir de 6 µg d'extracte cel·lular a les 35-40h de la transfecció. Els senyals luminescents generats després de l'addició dels substrats que catalitzen les reaccions d'ambdós luciferases (veure Figura 3) van ser determinats en un luminòmetre Lumat LB 9507 (BadWilbad, Alemanya). Els valors resultants de l'activitat *Firefly Luciferase* van ser normalitzats en relació als de l'activitat *Renilla Luciferase*, i cada experiment va ser repetit com a mínim 3 vegades per condició.

4.4- Estudi d'activadors i inhibidors de l'activitat del promotor

L'activitat del promotor de les cèl·lules transfectades va ser estudiada després de la incubació durant 20-24h en el medi de cultiu amb diversos agents:

- Glucosa, a concentracions de 5,5 i 22,7 mM.
- 6-deoxi-D-glucosa, anàleg de la glucosa no fosforilable ni metabolitzable, a concentració de 11,2 mM.
- Mannoheptulosa, inhibidor de la via glicolítica, a concentració de 11,2 mM. Aquest agent competeix amb la glucosa per la unió al centre catalític de la glucocinasa provocant una inhibició reversible d'aquest enzim.
- Verapamil, antagonista dels canals de calci, a concentració de 100 μ M.
- Diazòxid, a concentració de 0,6 mM.
- Forskolina, activador de l'adenilciclasa, a concentració de 10 μ M.
- Dexametasona, a concentració de 10 μ M.

5- Anàlisi estadística

L'estudi estadístic es va realitzar mitjançant el programa STATA versió 6.0 (Stata Corporation 1999, College Station, Texas, EUA). Es van determinar mitges \pm desviacions estàndards (DE) o \pm mitges de l'error estàndard per dades quantitatives, i freqüències per dades categòriques o qualitatives. Les variables contínues que no presentaren una distribució normal van ser analitzades en escala logarítmica, i els seus resultats són reportats en termes de mitjana geomètrica en comptes de mitjana aritmètica en les anàlisis descriptives, així com en termes de risc associat per doblar el

valor de la variable en les anàlisis de logística en comptes de risc associat per increment unitari. Les variables quantitatives que no foren normalitzades mitjançant la transformació logarítmica, es van categoritzar per la seva mitjana.

En les comparacions univariants, les diferències en variables contínues entre grups d'individus van ser analitzades mitjançant la prova t-Student o el test Wilcoxon Rank Sum. Per analitzar les diferències entre grups per variables categòriques es va emprar el test de Pearson Chi-quadrat (χ^2) o el test exacte de Fisher.

L'estimació del model de relacions independents amb la presència del marcador C79A va ser realitzat mitjançant models de regressió logística multivariant, emprant les variables que presentaren una significació univariada $< 0,1$. El criteri de selecció de les variables per a incloure-les en el model va ser un *Forward-Stepwise* amb un criteri d'entrada de p (*Likelihood-ratio-test*) $< 0,05$, i un criteri de sortida de $p > 0,10$.

Valors de $p \leq 0,05$ van ser considerats estadísticament significatius.

1.- Estudi dels exons 1, 2 i 3 del gen de l'amilina

1.1 Identificació de polimorfismes en el gen de l'amilina

1.1.1 Exó 1

El fragment amplificat inclou la regió 5'UTR, així com un petit fragment de la regió promotora (85 pb en direcció 5' des del punt d'inici de la transcripció del gen), seqüència contenint dos elements reguladors: la caixa TATA i un element semblant al CRE (CRE amb la substitució d'una citosina per adenina de la seqüència consensual). No es va detectar cap polimorfisme a la regió 5'UTR ni en la seqüència de la caixa TATA o CRE en la població estudiada.

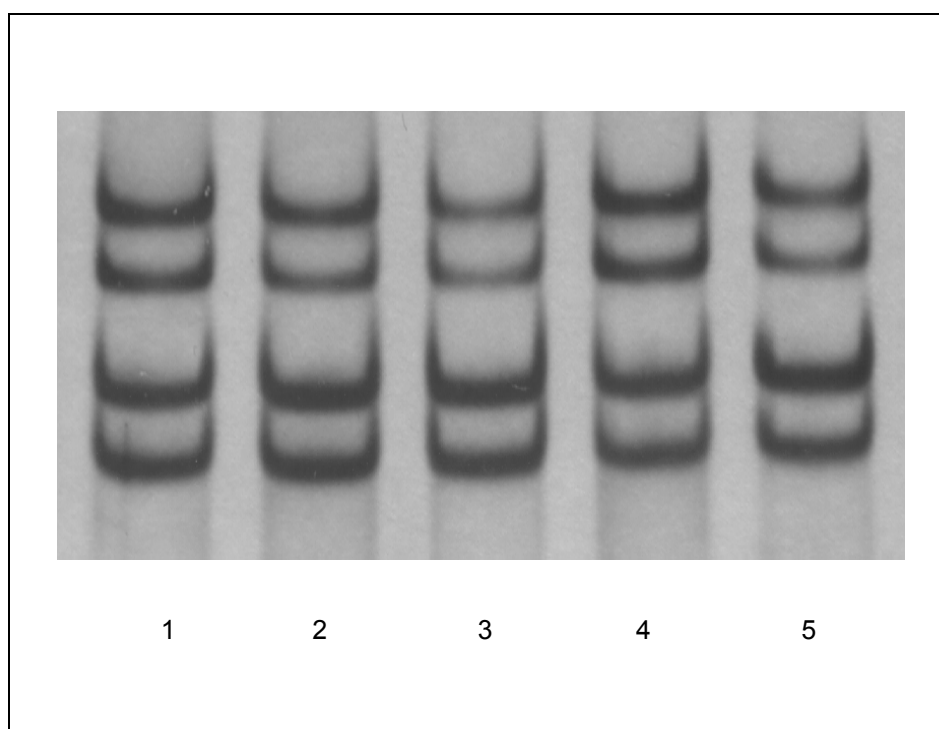


Figura 1. Anàlisi per SSCP de l'exó 1 del gen de l'amilina. No es va detectar cap patró electroforètic anòmal en les mostres estudiades.

1.1.2 Exó 2

El fragment amplificat conté la regió codificant pel pèptid senyal, 14 nucleòtids codificants pel propèptid aminoterminal i els primers 105 nucleòtids en direcció 3' de l'intró 2. Va ser identificat un patró electroforètic de migració anòmal en la regió de l'exó 2 explorada mitjançant PCR i anàlisi per SSCP (Figura 2). L'estudi per seqüenciació de l'ADN va detectar la presència d'un polimorfisme, consistent en la substitució del nucleòtid citosina per adenina en posició +79 pb des del punt d'inici de l'intró 2 del gen de l'amilina (polimorfisme C79A, Figura 3). No es va detectar cap subjecte amb genotip AA. Les freqüències del genotip CA en la població estudiada van ser: 13,5% en pacients amb DM tipus 2 (25/186), 15,4% en controls no diabètics (20/130), 23,7% en dones amb diabetis gestacional (9/38) i 18,4% en controls gestants (7/38). No es van detectar diferències significatives en les freqüències d'aquest polimorfisme entre els grups estudiats. Les freqüències al·lèliques i genotípiques del polimorfisme C79A estan representades a la Taula 1.

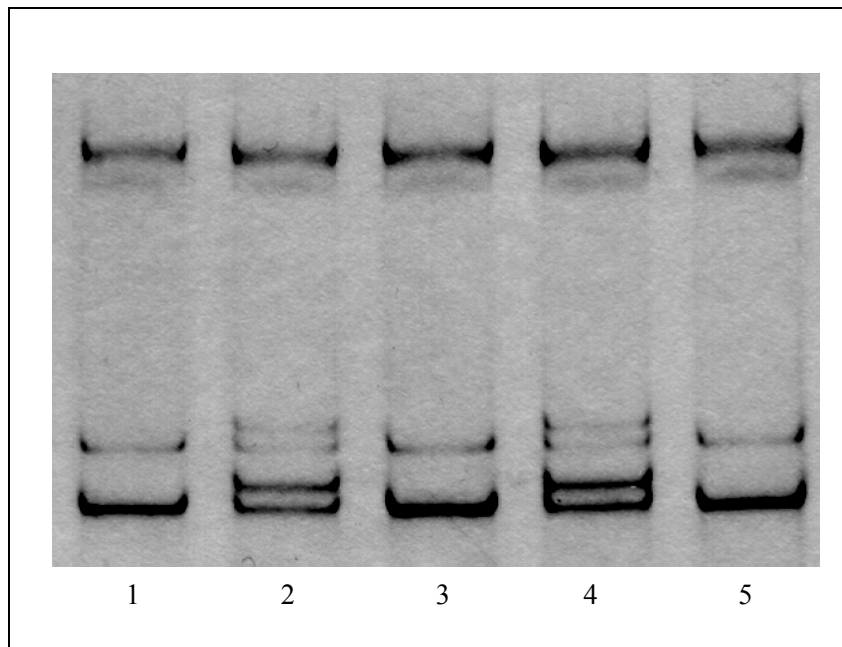


Figura 2. Anàlisi per SSCP de l'exó 2 del gen de l'amilina. El patró normal està representat en els carrils 1, 3 i 5. Els carrils 2 i 4 mostren el patró electroforètic anòmal corresponent al polimorfisme intrònic C79A.

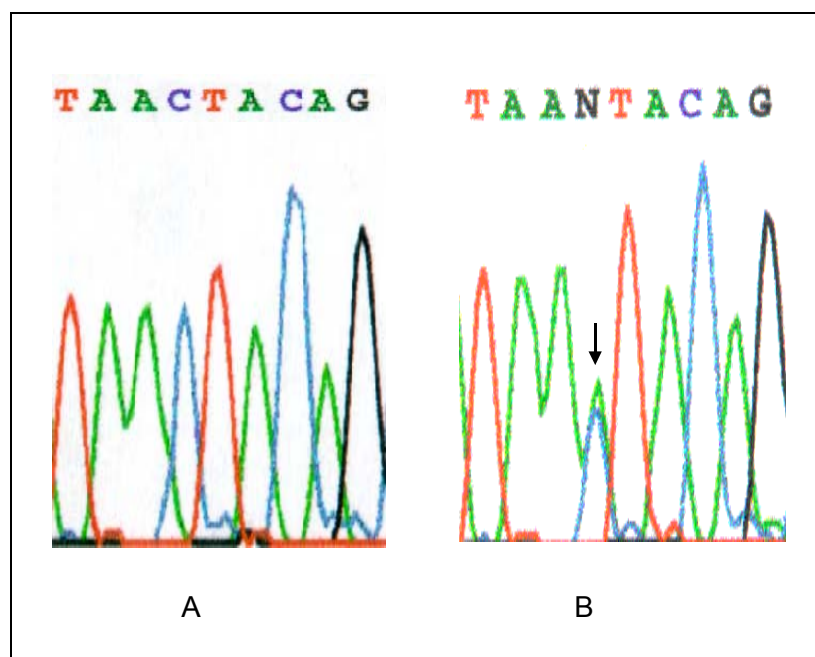


Figura 3. Anàlisi per seqüenciació de l'ADN de l'exó 2 del gen de l'amilina corresponent a un individu normal (A) i a un individu portador del polimorfisme C79A en heterozigosi (B). La fletxa indica la substitució C→A en posició +79 pb de l'intró 2.

Taula 1. Freqüències al·lèliques i genotípiques del polimorfisme C79A en la població estudiada.

	Freqüències al·lèliques		Freqüències genotípiques	
	al·lel C	al·lel A	CC	CA
Controls	0,92	0,08	0,85	0,15
Pacients amb DM tipus 2	0,93	0,07	0,87	0,13
Controls gestants	0,91	0,09	0,82	0,18
Diabetis gestacional	0,88	0,12	0,76	0,24

1.1.3 Exó 3

El fragment amplificat conté la regió codificant pel pèptid madur amilina. L'anàlisi per SSCP va detectar un patró de migració anòmal en un pacient amb diabetis tipus 2 (Figura 4). L'estudi per seqüenciació va identificar la presència d'un polimorfisme silent al codó 31: Asn₃₁ (AAC→AAT), i que per tant no comporta cap canvi en la seqüència d'aminoàcids del pèptid (ambdós codons codifiquen per l'asparagina) (Figura 5).

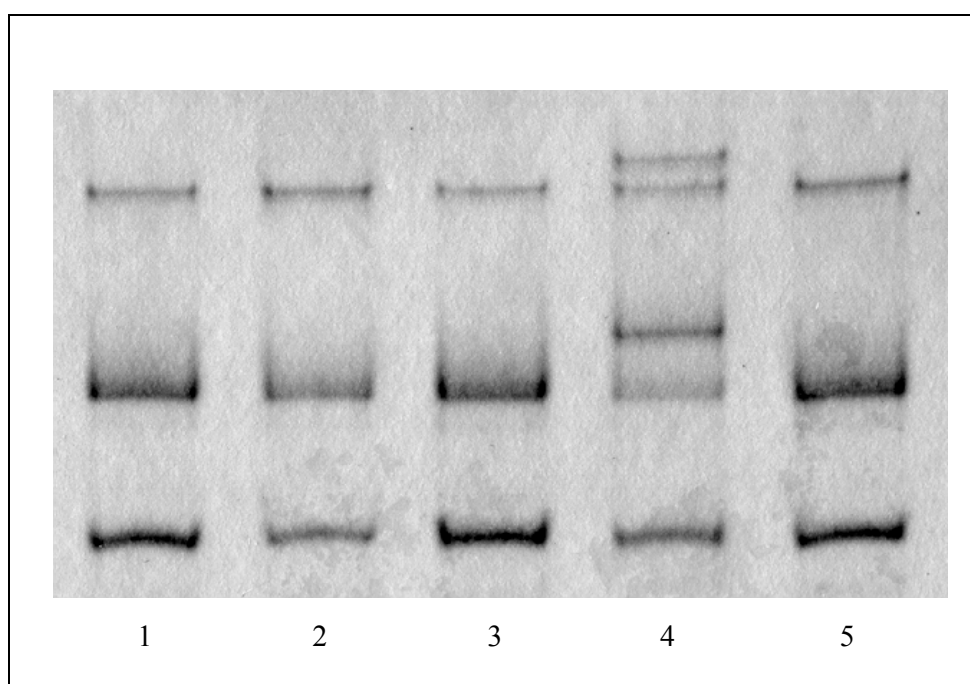


Figura 4. Anàlisi per SSCP de l'exó 3 del gen de l'amilina. El patró normal està representat als carrils 1, 2, 3 i 5. El carril 4 mostra el patró electroforètic de migració anòmal corresponent al polimorfisme Asn₃₁ (AAC→AAT).

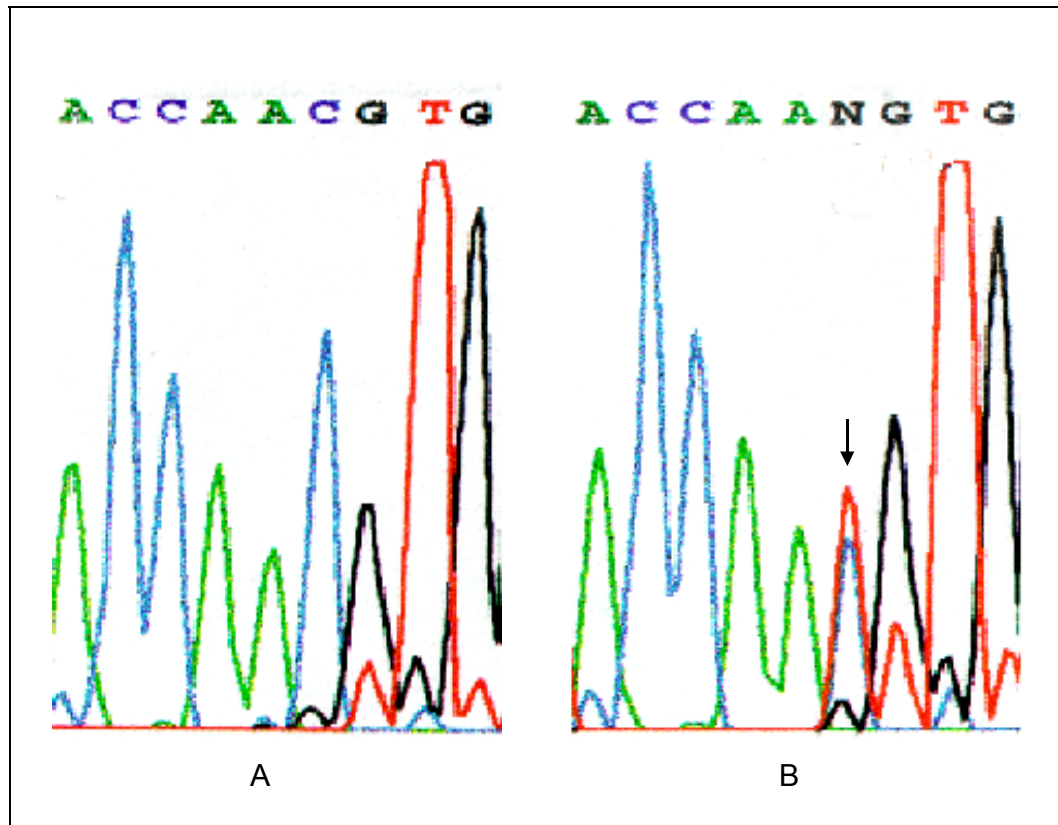


Figura 5. Anàlisi per seqüenciació de l'ADN de l'exó 3 corresponent a un individu normal (A) i a al individu portador del polimorfisme Asn₃₁ (AAC→AAT) en heterozigosi. La fletxa indica la substitució C→T (B).

1.2 Caracterització clínica dels pacients amb el polimorfisme C79A

Les característiques clíniques dels grups estudiats es mostren a la següent taula.

Taula 2. Característiques clíniques i biològiques dels grups estudiats.

	Controls no diabètics	Pacients amb DM tipus 2	Controls gestacionals	Pacients amb DG
n	130	186	38	38
Edat (anys)	50,8 ± 13,2	63,1 ± 10,9*	30,9 ± 4,5	31,7 ± 4,6
Sexe (H/D)	65/65	98/88	D	D
IMC (Kg/m ²)	27,6 ± 4,1	28,5 ± 5,3	24,7 ± 4,5	26,6 ± 4,9
Glucèmia basal (mmol/l)	5,1 ± 0,5	9,6 ± 3,4*	4,3 ± 0,5	4,6 ± 0,9
Colesterol total (mmol/l)	5,5 ± 1,1	5,4 ± 1,2	6,2 ± 1,4	6,4 ± 1,3
Colesterol HDL (mmol/l)	1,4 ± 0,4	1,2 ± 0,4*	2,1 ± 0,5	1,9 ± 0,5
Colesterol LDL (mmol/l)	3,8 ± 0,8	3,5 ± 1,1	3,4 ± 1,3	3,6 ± 1,1
Triglicèrids (mmol/l)	1,2 ± 0,7	1,7 ± 0,9*	1,9 ± 0,6	2,2 ± 0,8

Les dades estan expressades en n, mitges ± D.E., o %. DG, diabetis gestacional. * p < 0,001 pacients amb DM tipus 2 vs. controls no diabètics.

Pacients amb DM tipus 2 van presentar nivells més elevats en plasma de glucèmia i triglicèrids, i nivells inferiors de colesterol HDL. El temps d'evolució de la diabetis fou de 12,6 ± 9,2 anys. En relació al tractament, 12% dels pacients van ser tractats amb dieta, 56% amb insulina, 19,5% amb hipoglucemians orals i 12,5% van rebre teràpia combinada. 15% dels pacients amb diabetis seguien tractament hipolipemiant. En relació a les complicacions cròniques, 65% dels pacients van desenvolupar complicacions microvasculars, 35% retinopatia i 47% nefropatia (27%

microalbuminúria, 16% proteinúria macroscòpica i 7% insuficiència renal). 38% van presentar clínica de complicacions macrovasculars (8% malaltia cerebrovascular, 13% malaltia vascular perifèrica i 26,5% malaltia coronària).

L'estudi de les característiques clíniques i biològiques dels grups estudiats va posar de manifest que el polimorfisme C79A detectat en el gen de l'amilina estava associat a un perfil lipídic específic: pacients amb diabetis tipus 2 i controls no diabètics portadors del polimorfisme van presentar concentracions significativament més baixes de colesterol total i colesterol LDL en relació a pacients no portadors (Taula 3). Per contrast, no es van poder detectar diferències significatives entre els dos grups de genotips per altres variables com sexe, índex de massa corporal, glucèmia plasmàtica basal, microalbuminúria o tractament amb agents hipolipemiants.

El model de regressió logística multivariant va mostrar que la concentració de colesterol LDL és la única variable associada independentment amb el polimorfisme C79A ($p < 0,001$, odds ratio: 0,33, interval de confiança del 95%: 0,17-0,63). Encara que la malaltia coronària va presentar una tendència a ser menys freqüent en pacients diabètics portadors del polimorfisme (12,5% vs. 17,6%), la diferència no va ser estadísticament significativa. D'altra banda, van ser mesurades les concentracions plasmàtiques d'apolipoproteïna E (apo E), element que forma part del dipòsits d'amiloide en els illots pancreàtics juntament amb l'amilina i el perlecan, però no es van detectar diferències significatives ni entre el grup de controls i el grup de pacients amb diabetis, ni entre portadors i no portadors del polimorfisme C79A.

En relació a la cohort de dones amb diabetis gestacional, l'anàlisi univariant també va mostrar que les concentracions de colesterol LDL eren més baixes en pacients portadores que en no portadores del polimorfisme (Taula 4).

Taula 3. Estudi comparatiu univariant dels controls no diabètics i pacients amb diabetis tipus 2 en funció de la presència (genotip CA) o absència (genotip CC) del polimorfisme C79A.

	Controls		Pacients amb DM tipus 2	
	CA	CC	CA	CC
N	20	110	25	161
Sexe (H/D)	6/14	62/48	15/10	84/77
Edat (anys)	47,3 ± 11,7	51,5 ± 13,4	64,4 ± 9,9	62,8 ± 11,1
Duració de diabetis (anys)	-	-	10,5 ± 8,7	12,9 ± 9,3
IMC (Kg/m ²)	29,8 ± 6,9	27,2 ± 3,2	29,7 ± 4,8	28,3 ± 5,4
Teràpia amb insulina (%)	-	-	62,5	55,5
Hipertensió (%)	-	-	58,3	55,3
Tabaquisme (%)	29,4	30,1	33,3	32,6
Menopausa (%)	41,6	68,2	100	89
Teràpia hipolipemiant (%)	-	-	12,5	17,6
Glucèmia basal (mmol/l)	5,1 ± 0,5	5,1 ± 0,5	9,3 ± 3,7	9,7 ± 3,4
HbA1c (%)	4,2 ± 0,5	4,6 ± 0,6	7,3 ± 1,8	7,8 ± 1,8
Triglicèrids (mmol/l)	1,1 ± 0,5	1,2 ± 0,7	1,6 ± 0,8	1,8 ± 0,9
Colesterol total (mmol/l)	4,9 ± 0,8	5,6 ± 1,1*	4,9 ± 0,8	5,5 ± 1,3†
Colesterol LDL (mmol/l)	3,2 ± 0,6	3,9 ± 0,8*	2,7 ± 0,6	3,7 ± 1,1‡
Colesterol HDL (mmol/l)	1,3 ± 0,5	1,4 ± 0,4	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,4
Apolipoproteïna E (g/l)	48,1 ± 2,7	36,5 ± 13,3	39,7 ± 7,4	46,3 ± 19,6

Les dades estan expressades en n, mitges ± DS, o %. *p < 0,05 (genotip CA vs CC) en el grup control. †p < 0,005 i ‡p < 0,001 (genotip CA vs CC) en el grup de pacients amb diabetis tipus 2. Cada paràmetre bioquímic en cada individu correspon a la mitja de 3 determinacions separades per intervals de 3 mesos.

Taula 4. Estudi comparatiu dels controls gestants i pacients amb diabetis gestacional (DG) en funció de la presència (genotip CA) o absència (genotip CC) del polimorfisme C79A.

	Controls gestants		DG	
	CA	CC	CA	CC
N	7	31	9	29
Edat (anys)	30,6 ± 2,8	30,9 ± 4,8	29,1 ± 5,6	31,3 ± 4,6
IMC pregestacional (Kg/m ²)	23,9 ± 3,6	24,8 ± 4,7	27,7 ± 3,9	26,3 ± 5,2
Increment ponderal (kg)	11,7 ± 2,4	11,2 ± 3,4	8,4 ± 2,9	10,1 ± 3,3
Macrosomia (+/-) prèvia	0 / 7	1 / 30	1 / 8	8 / 21
Setmana gestacional al diagnòstic de DMG	-	-	26,3 ± 5,8	26,4 ± 4,7
Teràpia amb insulina (+/-)	-	-	1 / 8	8 / 21
Hipertensió (+/-)	0 / 7	1 / 30	2 / 7	5 / 24
Glucèmia basal (mmol/l)	3,9 ± 0,4	4,4 ± 0,4	5,2 ± 0,9	4,6 ± 0,7
HbA1c (%)	4,1 ± 0,3	4,1 ± 0,3	4,2 ± 0,7	4,3 ± 0,3
Colesterol total (mmol/l)	6,1 ± 1,1	6,3 ± 1,5	5,9 ± 1,4	6,6 ± 1,2
Colesterol HDL (mmol/l)	2,3 ± 0,5	1,9 ± 0,5	1,9 ± 0,3	1,9 ± 0,5
Colesterol LDL (mmol/l)	3,1 ± 0,8	3,5 ± 1,3	2,9 ± 1,1	3,8 ± 0,9*
Triglicèrids (mmol/l)	1,7 ± 0,4	2,1 ± 0,7	1,9 ± 0,9	2,4 ± 0,8
IRI basal (pmol/l)	63,4 ± 35,8	73,9 ± 30,8	101,1 ± 39,2	81,9 ± 40,5

Les dades estan expressades en n o mitges ± D.E. DG, diabetis gestacional. *p < 0,05 (genotip CA vs. CC) en el grup de pacients amb DG. Cada paràmetre bioquímic en cada individu correspon a la mitja de 3 determinacions separades per intervals de 3 mesos.

2.- Estudi de la regió promotora del gen de l'amilina

2.1 Anàlisi conformacional de cadena senzilla i seqüenciació de l'ADN

L'estudi conformacional de la cadena senzilla de l'ADN va identificar un patró electroforètic de migració anòmal corresponent al fragment amplificat de la regió promotora des de -229 pb fins a +38 pb. Aquesta variant va ser detectada en 18 pacients amb diabetis tipus 2 i en 2 controls. L'estudi per seqüenciació de l'ADN d'aquest fragment va revelar la presència d'una mutació en heterozigosi consistent en el canvi del nucleòtid guanina per adenosina (substitució G→A), en posició -132 pb del punt d'inici de transcripció del gen. La Figura 6 mostra la imatge de l'estudi conformacional de cadena senzilla de la regió promotora del gen de la amilina, mentre que la Figura 7 mostra la imatge de l'anàlisi per seqüenciació del promotor. Aquesta mutació està situada en un domini activador del promotor (281). La Figura 8 mostra la localització de la mutació G→A dins de la seqüència del promotor.

La freqüència del genotip GA va ser significativament superior en la població diabètica que en controls (9,7% vs. 1,5%, $p < 0,005$, odds ratio: 6,85, interval de confiança del 95%: 1,56-30,08). La distribució de genotips no va diferir significativament de les expectacions de la llei de Hardy-Weinberg. Les freqüències al·lèliques i genotípiques d'aquesta mutació es presenten a la Taula 5.

Taula 5. Freqüències al·lèliques i genotípiques de la mutació G→A.

	Freqüències al·lèliques		Freqüències genotípiques	
	G	A	GG	GA
Controls	0,930	0,007	0,985	0,015
Pacients amb DM tipus 2	0,952	0,048 ^a	0,903	0,097 ^b

^a $p < 0,001$ al·lel A entre pacients amb DM tipus 2 i controls. ^b $p < 0,005$ genotip GA entre pacients amb DM tipus 2 i controls.

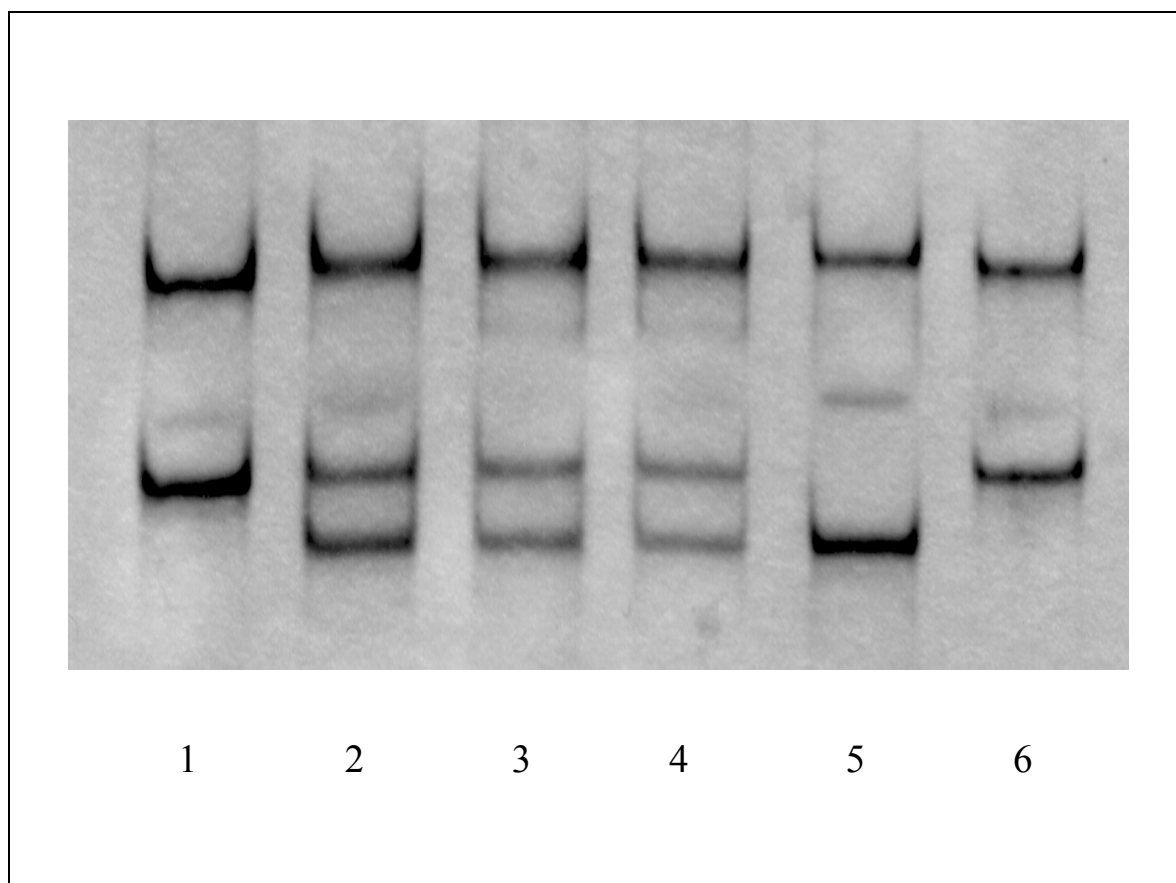


Figura 6. Imatge d'un gel de SSCP de la regió promotora del gen de l'amilina. Els carrils 1 i 6 corresponen a mostres amb patró de migració normal; els carrils 2, 3 i 4 corresponen a subjectes heterozigots, mentre que el carril 5 correspon a un subjecte homozigot per la mutació G→A.

En l'estudi del patró fenotípic, no es van poder detectar diferències significatives entre pacients amb diabetis tipus 2 portadors i no portadors del canvi G→A. La Taula 6 mostra l'estudi comparatiu entre les característiques clíniques del pacients amb DM tipus 2 portadors i no portadors de la mutació.

Els dos controls no diabètics heterozigots per la mutació, de 26 i 35 anys, respectivament, no tenien antecedents familiars de diabetis i les seves glucèmies basals sempre van ser normals. Malauradament, no es va poder realitzar una PTOG en cap dels dos casos.

En relació a la cohort de dones gestants, no es van detectar alteracions en la seqüència de la regió promotora estudiada ni en el grup de dones amb diabetis gestacional ni en el grup de gestants amb tolerància normal a la glucosa.

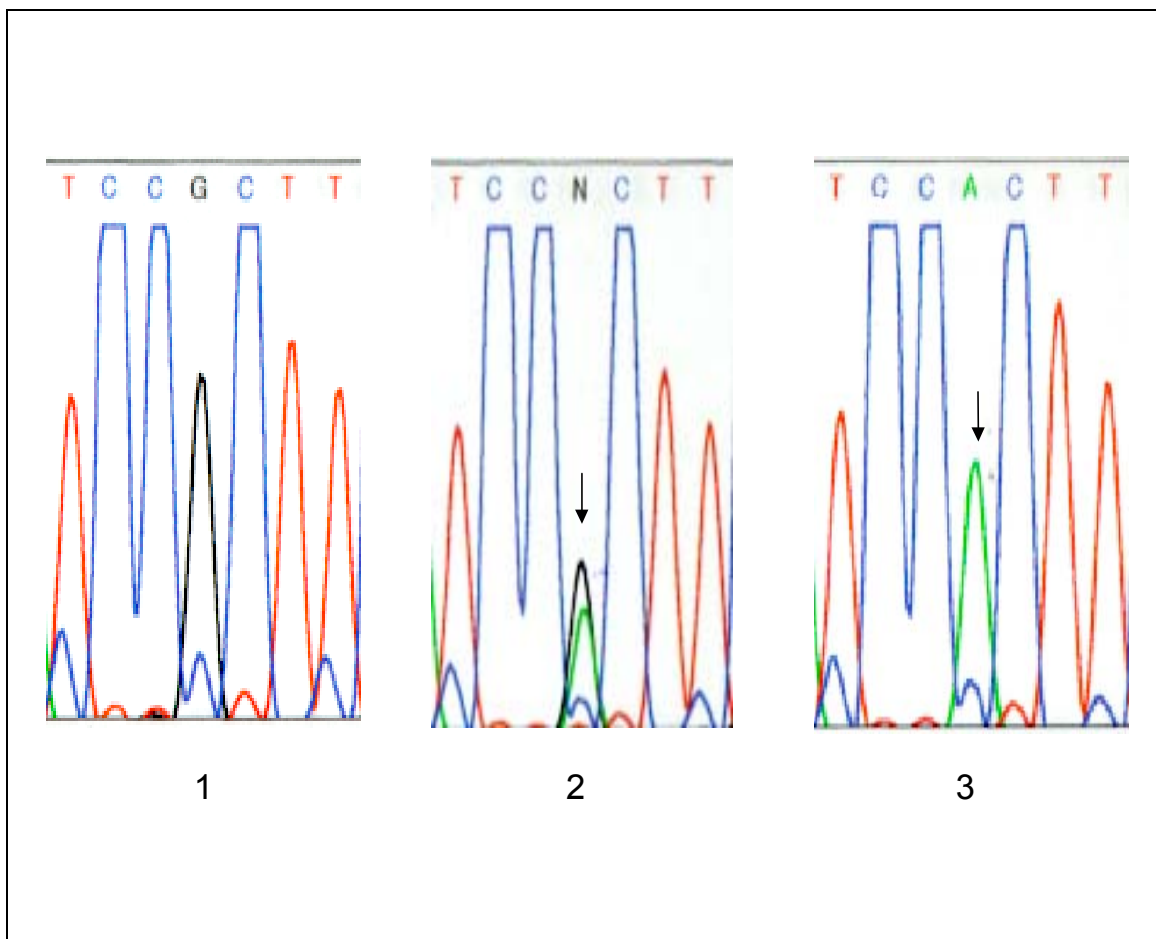


Figura 7. Anàlisi per seqüenciació parcial de la regió promotora del gen de l'amilina, corresponen a un individu no portador (1), a un individu heterozigot (2) i a un individu homozigot (3). La fletxa indica el canvi G→A en posició -132 pb del punt d'inici de la transcripció del gen.

PROMOTOR DEL GEN DE L'AMILINA

-555 ggtacctaga ataatcccta ccacagagta ggtcttccat tactcttatg cttttaaatc
 -495 tcccctcacc tcattgtaaa tgacttttga tttctctttt atgcoctttt tatacacctt
 -435 tcctttatat ctccatttat tcttgaagct tcatgggatt cagccattga ggtcacttgg
 -375 gtttagatat accaaaagtc tgtgatttct ctgtttgcat atatgcacat ttgttgttat
 -315 ccttaccctt ttctatcagt tccttaccat aacatacact taattcttgg aaatttactc
 -255 atgtcttaca aagatggcaa attcaaACTT CTGCTGTGTA TGACACACCA ttaactgcac
 -195 aaggacactg tgtatttgcg acgttaatat ttaactgatga gttaatgtaa taatgaccca
 -135 tccgcttctg ctgctgtgga ggtactttct atctataggg atggaaatta atgacagagg
 -75 ctctctgagc tgcctgatgt cagagctgag aaagggtgga ggggtatata agagctggat
 -15 tactagttag caaatgagg ggtaaatatT CCAGTGGATA CAAGCTTGA CTCttttctt
 +46 gaagctttct ttctatcaga agcatttgcg gatattgctg acattgaaac attaaaaggt

- DOMINI ACTIVADOR (-182 / -122)
- E2 DOMAIN -LIKE SEQUENCE (-155/-137)
- DOMINI REPRESSOR (-111/-101)
- CRE LIKE SEQUENCE (-61/-54)
- CAIXA TATA (-31/-25)
- START SITE. EXÓ 1(+1)

Figura 8. Seqüència de nucleòtids de la regió 5' (de -555 a +105 pb) del gen de l'amilina, mostrant la localització del canvi G→A en un domini activador del promotor de l'amilina. En majúscula i en verd estan representats els oligonucleòtids sentit i antisentit utilitzats per l'amplificació de la regió que conté la mutació.

TAULA 6. Característiques clíniques del pacients amb diabetis tipus 2 en funció de la presència (genotip GA) o absència (genotip GG) del canvi G→A.

	Genotip GA	Genotip GG
N	18	168
Edat (anys)	63,2 ± 11,4	63,1 ± 10,9
Sexe (H/ D)	9/9	89/79
IMC (Kg/m ²)	30,1 ± 3,8	28,4 ± 5,4
Edat al diagnòstic (anys)	52,7 ± 11,5	50,5 ± 11,1
Història familiar de DM (%)	70	57
Duració de DM (anys)	11,1 ± 9,3	12,8 ± 9,2
Temps fins a la insulinització (anys)	6,6 ± 5,2	9,4 ± 7,2
Tractament amb insulina (%)	53	60
Glucèmia basal (mmol/l)	9,4 ± 3,7	10,1 ± 3,4
HbA _{1c} (%)	7,5 ± 1,9	8,1 ± 2,1
Insulinèmia basal (pmol/l) #	122,1 ± 60,5	114,1 ± 93,9
Amilina basal (pmol/l)	< 1,9 pmol/l	< 1,9 pmol/l
ALP basal (pmol/l) *	6,5 ± 5,1	8,2 ± 4,3
Proinsulinèmia basal (pmol/l)	28,5 ± 32,2	26,8 ± 26,3
Pèptid C basal (nmol/l)	0,6 ± 0,4	0,6 ± 0,5

Les dades estan expressades en forma de mitges ± DS o freqüències. * La concentració plasmàtica de l' ALP en dejú va ser determinada en una mostra de 50 pacients amb diabetis tipus 2 tractats exclusivament amb dieta (8 pacients amb genotip GA i 42 pacients amb genotip GG). # La insulinèmia basal va ser determinada en tots els pacients excepte en aquells tractats amb insulina.

A fi de determinar la possible contribució de la mutació G→A en el desenvolupament de la diabetis van ser estudiades les famílies dels provands. L'estudi va incloure 14 familiars de primer grau procedents de 8 famílies. L'anàlisi per SSCP va detectar un segon patró electroforètic de migració anòmal en 2 familiars, confirmant l'anàlisi per seqüenciació de l'ADN la presència de la mutació G→A en homozigosi (imatge representada en la Figura 7). En 7 familiars la mutació va ser detectada en heterozigosi, mentre que els altres 5 van resultar ser no portadors. La Figura 9 mostra el pedigrí de les dos famílies en les quals la mutació va ser detectada en homozigosi.

Per determinar si familiars portadors de la mutació presenten alteracions en la tolerància a la glucosa, es va practicar una PTOG estàndard. La PTOG va resultar patològica en ambdós subjectes homozigots. En el primer provand, una dona de 45 anys, fou diagnòstica de diabetis; en el segon provand, una dona de 30 anys amb antecedent previ de diabetis gestacional, diagnòstica d'intolerància a la glucosa. Aquells familiars heterozigots o no portadors de la mutació, van presentar una tolerància a la glucosa normal. La Taula 7 mostra la distribució dels familiars estudiats en funció del genotip.

Taula 7. Estudi genètic en familiars de primer grau

	No portadors (genotip GG, n = 5)	Heterozigots (genotip GA, n = 7)	Homozigots (genotip AA, n = 2)
Edat (anys)	35,7 ± 9,1	28,1 ± 6,5	36,2 ± 5,6
IMC (kg/m ²)	23,7 ± 3,3	22,4 ± 3,4	29,2 ± 8,2
Sexe (H:D)	2 : 3	6 : 1	0 : 2

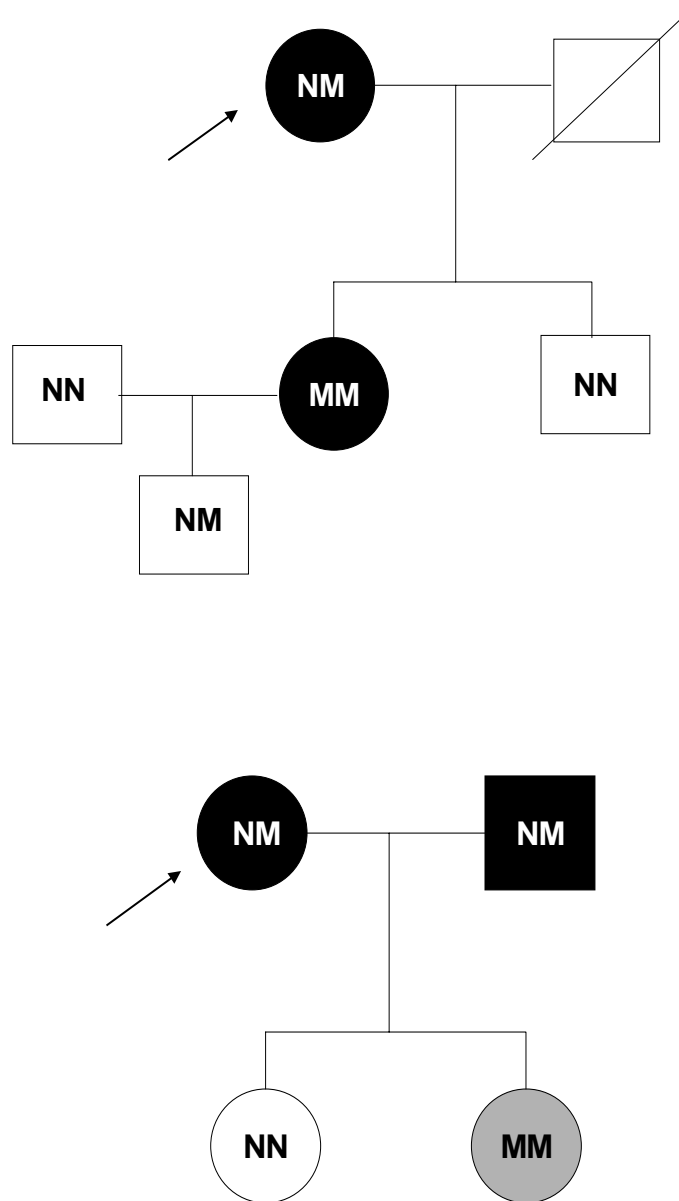


Figura 9. Pedigrís familiars dels dos provands homozigots. Els subjectes amb diabetis estan representats mitjançant símbols en negre, subjectes amb intolerància a la glucosa amb símbols grisos i subjectes no diabètics amb símbols blancs. El genotipus dels familiars està indicat de la següent manera: N, al·lel normal; M, al·lel mutat.

2.2 Estudi de les concentracions plasmàtiques d'amilina, ALP i insulina

Tal com s'ha representat prèviament a la Taula 6, les concentracions plasmàtiques d'amilina en dejú van ser indetectables o en els límits inferiors de detecció de l'assaig (1,9 pmol/l) en la majoria de pacients diabètics estudiats (portadors i no portadors del canvi G→A). D'altra banda, la concentració plasmàtica d'ALP en dejú va ser determinada en una mostra de 50 pacients diabètics tractats exclusivament amb dieta, no objectivant-se diferències entre els dos grups: $6,5 \pm 5,1$ pmol/l en pacients heterozigots ($n = 8$) vs $8,2 \pm 4,3$ pmol/l en pacients no portadors ($n = 42$).

A fi de determinar si una secreció incrementada o desproporcionada d'amilina estava associada amb la mutació detectada, van ser mesurades les concentracions plasmàtiques d'amilina, ALP i insulina en els punts 0'-30'-60'-90'-120' de la PTOG en els 14 familiars de primer grau estudiats, així com en 10 controls sans no portadors, d'edat i IMC similars. Els valors de glucèmia, IRI, amilina i ALP en la PTOG estan expressats en la Taula 8.

Les concentracions plasmàtiques d'amilina en dejú van mostrar una tendència a ser més elevades en individus homozigots (HZ) que en heterozigots (HT) i no portadors (NP) : HM $,6,8 \pm 4,4$ pmol/l; HT; $2,5 \pm 1,5$ pmol/l; NP, $2,1 \pm 2,4$ pmol/l; $p=0,08$). D'altra banda, les concentracions plasmàtiques d'ALP en dejú van presentar la mateixa tendència, amb valors més elevats en persones homozigotes per la mutació.

En resposta a l'estímul de la glucosa, els tres pèptids incrementen les seves concentracions. El pic de màxima concentració d'insulina es va produir als 60 min en el grup d'heterozigots i en el de no portadors, i als 90 min en el grup d'homozigots. En relació a les concentracions d'amilina, el pic de màxima concentració s'assoleix als 90 min en els tres grups. Al estudiar la gràfica de

secreció de l'ALP, veiem que la seva morfologia és diferent en individus homozigots, presentant un pic màxim als 60 i posterior ràpida davallada dels nivells del pèptid. Les gràfiques d'ambdós pèptids queden reflectides a la Figura 10.

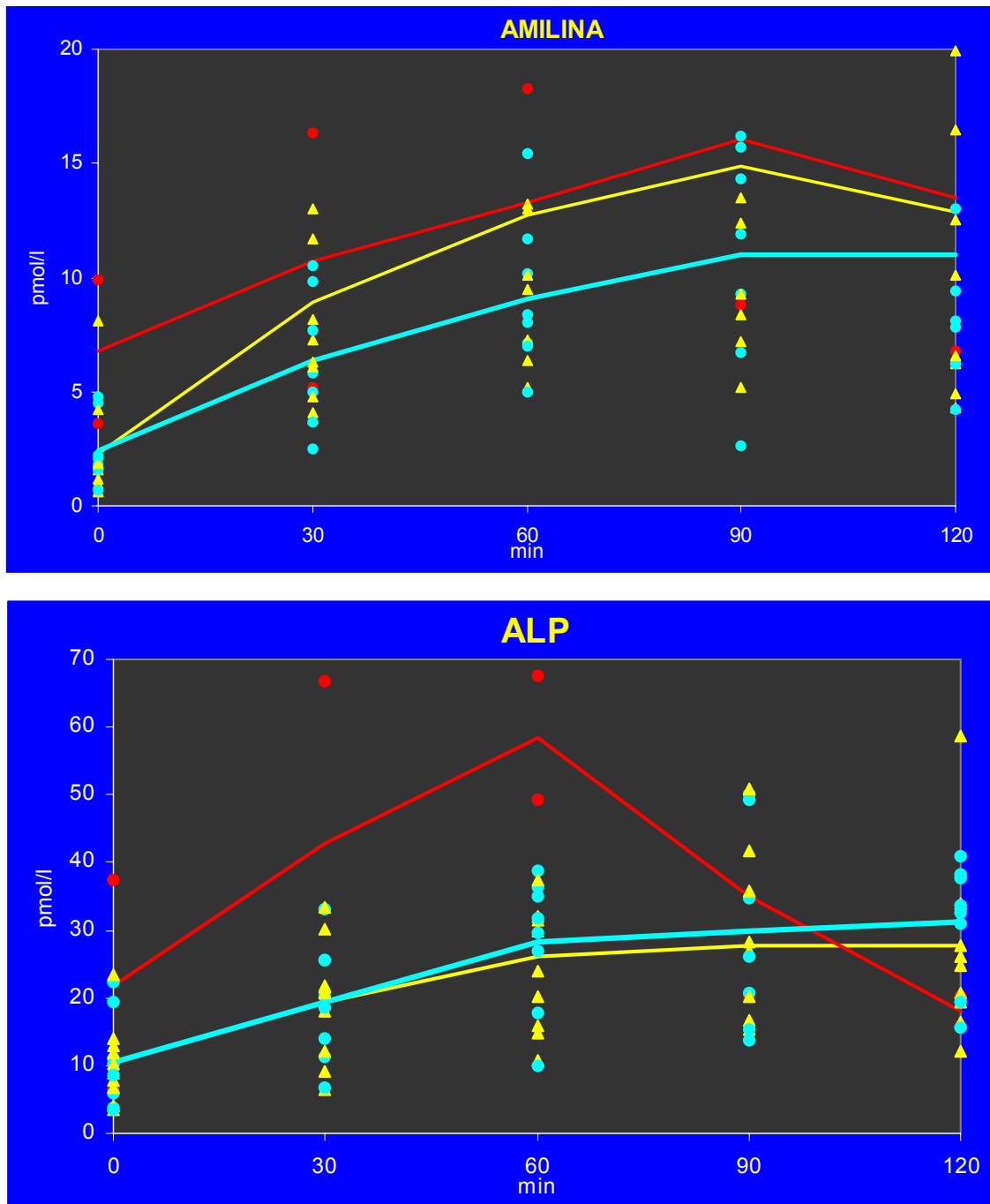


Figura 10. Concentracions plasmàtiques d'amilina i ALP en resposta a l'estímul de la glucosa en la PTOG. Els valors en vermell corresponen a persones homozigotes, en blau a heterozigotes i en groc a controls no portadors. Les gràfiques corresponen als valors de les mitges per cada grup.

Taula 8. Concentracions plasmàtiques de glucosa, IRI, amilina i ALP en la PTOG segons la presència de la mutació G→A.

	No portadors (n=14) (genotip GG)	Heterozigots (n=7) (genotip GA)	Homozigots (n=2) (genotip AA)	Valor de <i>p</i>
Glucosa (mmol/l)				
0-min	5,2 ± 0,3	4,8 ± 0,4	6,1 ± 1,9	ns
30-min	9,1 ± 1,5	7,9 ± 1,5	9,1 ± 2,3	ns
60-min	8,1 ± 2,3	6,9 ± 1,4	10,6 ± 1,2	ns
90-min	6,5 ± 1,7	5,5 ± 1,1	10,3 ± 0,4	0,05
120-min	5,8 ± 1,1	5,2 ± 1,8	8,7 ± 0,5	0,05
ASC Glucosa (mM.120 min)	866 ± 169	762 ± 82	1118 ± 155	ns
IRI (pmol/l)				
0-min	62,1 ± 22	44,8 ± 13,5	116,4 ± 103	ns
30-min	374,1 ± 230	335,7 ± 184	405,9 ± 333	ns
60-min	426,1 ± 281	381,6 ± 138	614,4 ± 450	ns
90-min	402,4 ± 256	322 ± 166	783 ± 589	ns
120-min	356,5 ± 206	181,9 ± 61	614,1 ± 356	0,06
ASC IRI (mM.120 min)	42356 ± 23506	34581 ± 11362	65055 ± 48124	ns
Amilina (pmol/l)				
0-min	2,1 ± 2,4	2,5 ± 1,5	6,8 ± 4,4	0,08
30-min	9,5 ± 6,7	6,4 ± 3,1	10,8 ± 7,8	ns
60-min	12,7 ± 9,3	9,1 ± 3,2	13,3 ± 7,1	ns
90-min	14,9 ± 8,8	10,9 ± 5,1	16,1 ± 10,2	ns
120-min	12,8 ± 7,8	10,9 ± 9,2	13,5 ± 9,4	ns
ASC Amilina (mM.120 min)	1422 ± 780	971 ± 411	1511 ± 970	ns
ALP (pmol/l)				
0-min	10,4 ± 5,7	10,6 ± 6,9	21,9 ± 21,8	ns
30-min	21,6 ± 11,4	19,3 ± 8,5	42,7 ± 33,1	ns
60-min	23,7 ± 8,7	28,3 ± 9,8	58,4 ± 13,1	0,05
90-min	26,2 ± 10,1	29,9 ± 15,2	34,9 ± 21,2	ns
120-min	29,1 ± 14,9	31,1 ± 9,1	18,1 ± 31,1	ns
AUC ALP (mM.120 min.)	2772 ± 1019	2880 ± 1103	4680 ± 2414	ns
Proinsulina basal (pmol/l)	6,6 ± 1,7	13,2 ± 6,2	8,8 ± 6,9	ns

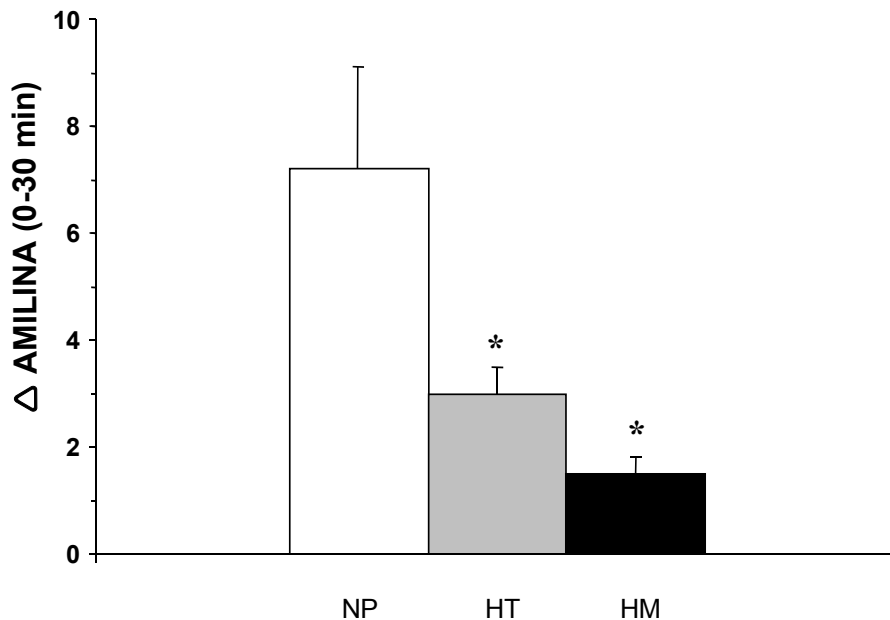
ALP, "amylin-like peptide"; ASC, àrea sota la corba; IRI, insulina immunoreactiva. Els valors estan expressats en forma de mitja ± D.E.

2.3 Increment de les concentracions d'amilina, ALP i IRI en la PTOG

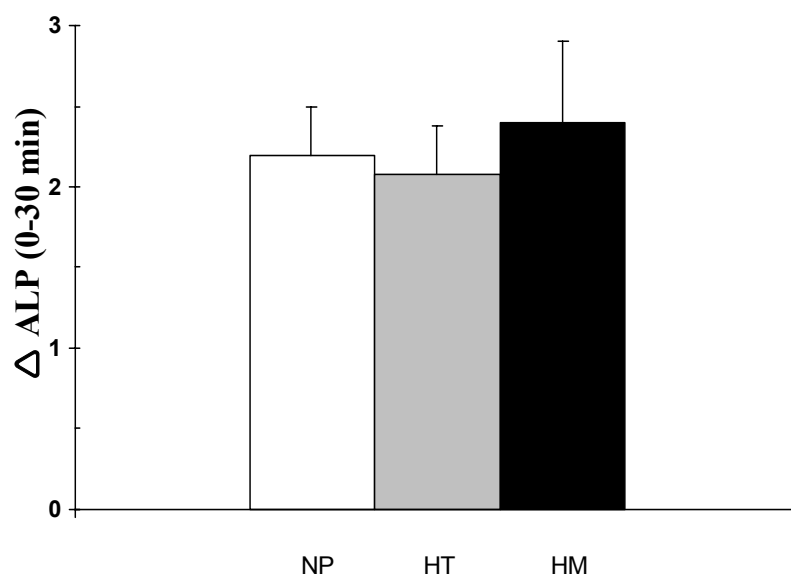
Les respostes secretores del tres pèptids –insulina, amilina i ALP- van ser mesurades durant l'interval 0-30 min de la PTOG, sent calculat l'increment de les concentracions (Δ IRI, Δ amilina, Δ ALP) mitjançant el quocient 30'/0'. Mentre que l'increment de la concentració de l'amilina (Δ amilina) durant aquest període de temps va ser inferior en persones portadores de la mutació que en no portadores ($p < 0.05$ per no portadors vs homozigots i heterozigots) (Figura 11A), la resposta de l'ALP (Δ ALP) no va ser diferent entre els 3 grups (Figura 11B). L'increment de resposta de la insulina (Δ IRI) tampoc va ser significativament diferent entre els tres grups, malgrat certa tendència a ser més reduïda en homozigots (Figura 11C).

Figura 11. Resposta secretora dels pèptids amilina, ALP i IRI en la PTOG

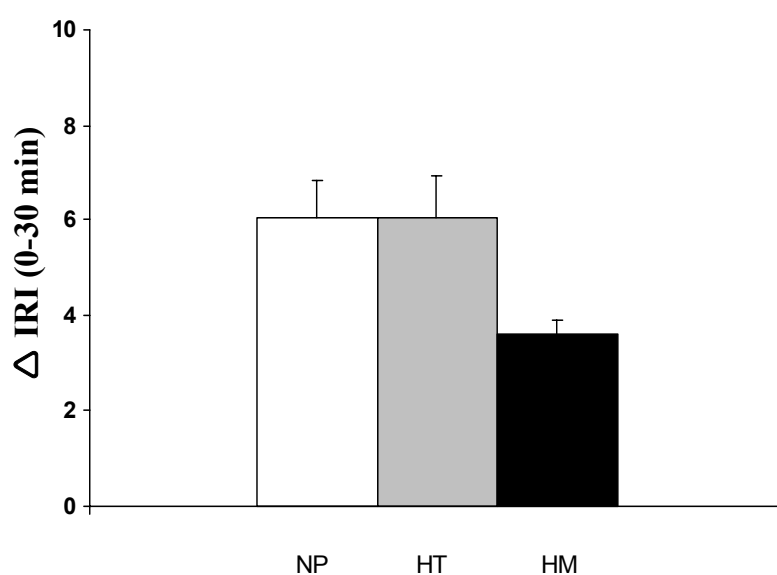
A



B



C



En aquesta figura està representat l'increment en la resposta en els primers 30 min de la PTOG (Δ 0-30 min) de l'amilina (A), ALP (B) i IRI (C) en 15 controls no diabètics i no portadors de la mutació G→A (NP), 7 heterozigots no diabètics (HT) i els 2 individus homozigots (HM) amb alteració de la tolerància a la glucosa. Les dades són expressades en forma de mitges \pm SEM (mitja del error estàndard). L'increment en la resposta de l'amilina va ser significativament inferior en HM i HT en relació a NP (HM, $1,5 \pm 0,1$; HT $2,9 \pm 0,5$; NP, $7,1 \pm 1,9$; $p < 0,05$ per HM i HT vs NP). L'increment en ALP (HM, $2,4 \pm 0,5$; HT, $2,1 \pm 0,3$; NP, $2,2 \pm 0,3$) i IRI (HM, $3,6 \pm 0,3$; HT, $6,1 \pm 0,9$; NP, $6,1 \pm 0,8$) durant el mateix període de temps no va diferir significativament entre els tres grups.

Quan es va determinar la resposta dels pèptids durant els primers 30 min de la PTOG ajustada a la magnitud del canvi en les concentracions de glucosa en aquest interval de temps (ΔG), els resultats van ser anàlegs. Mentre que el quocient Δ Amilina/ ΔG va diferir significativament entre els grups (mitges \pm D.E., HM: $1,1 \pm 0,2$, HT: $2,2 \pm 0,8$, NP: $4,3 \pm 3,7$ pmol/mmol; $p < 0,05$ per no portadors vs homozigots i heterozigots), mentre que els quocients Δ ALP/ ΔG (HM: $1,5 \pm 0,4$, HT: $1,4 \pm 0,4$, NP: $1,3 \pm 0,6$ pmol/mmol) i Δ IRI/ ΔG (HM: $2,4 \pm 0,2$, HT: $4,3 \pm 1,2$, NP: $3,4 \pm 0,2$ pmol/mmol) i no van presentar diferències estadísticament significatives. Com l'increment en les concentracions de glucosa a l'interval 0-30 min es va mantenir pràcticament constant en els tres grups (HM: $1,5 \pm 0,1$, HT: $1,7 \pm 0,3$, NP: $1,8 \pm 0,3$; NS), extrapolem que per la mateixa magnitud de l'estímul, la secreció precoç de l'amilina es troba deteriorada en individus portadors de la mutació G \rightarrow A, mentre que la resposta de la insulina està preservada.

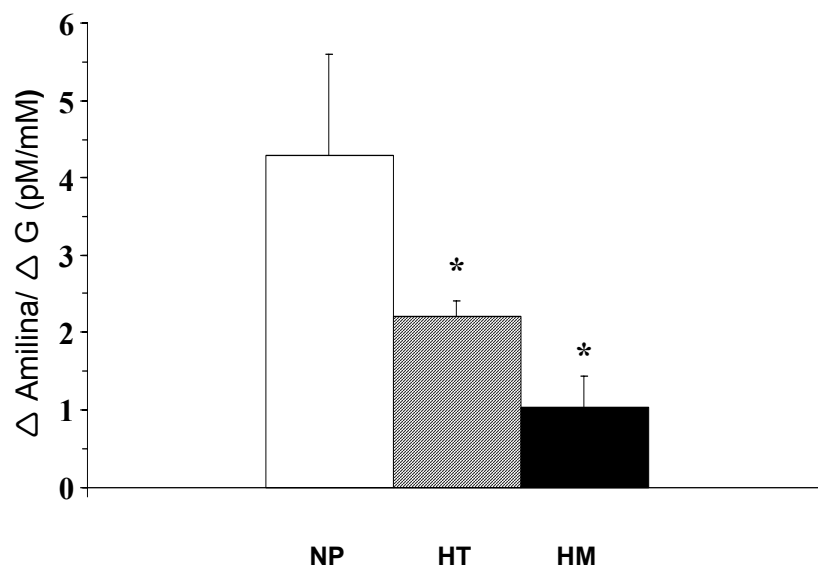


Figura 12. Quocient de l'increment de resposta de l'amilina en funció de l'increment en les concentracions de glucosa durant els primers 30 min de la PTOG (Δ Amilina/ ΔG). Els valors estan expressats en forma de mitja \pm D.E. NP, no portadors; HT, heterozigots; HM, homozigots. Subjectes portadors de mutacions (HM i HT) presenten una disminució significativa en relació a no portadors ($p < 0,05$) d'aquest quocient.

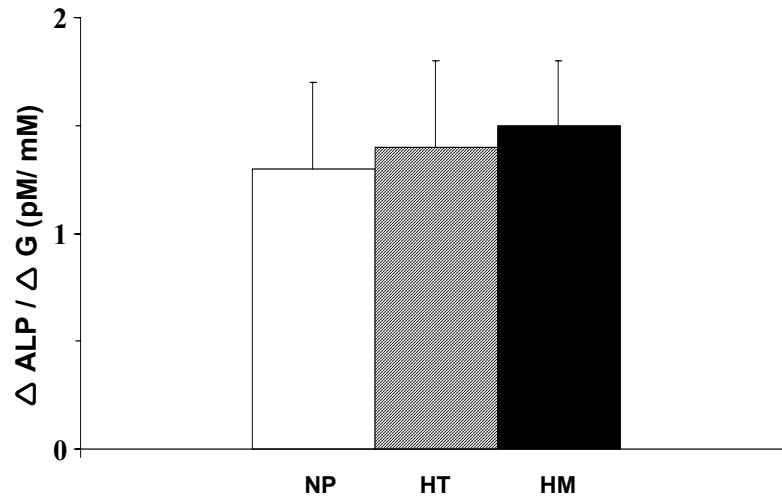


Figura 13. Quocient de l'increment de resposta de l'ALP en funció de l'increment en les concentracions de glucosa durant els primers 30 min de la PTOG ($\Delta \text{ALP} / \Delta \text{G}$).

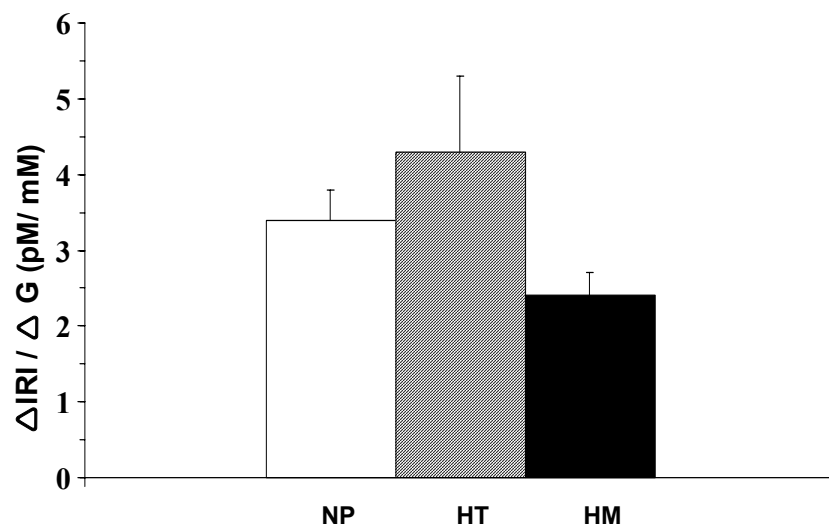


Figura 14. Quocient de l'increment de resposta de la insulina en funció de l'increment en les concentracions de glucosa durant els primers 30 min de la PTOG ($\Delta \text{IRI} / \Delta \text{G}$).

3.- Estudi de l'activitat del promotor de l'amilina

3.1 Estudi de l'efecte de la mutació G→A

L'activitat del promotor de les construccions plasmídiques contenint el gen de la luciferasa i la seqüència salvatge o mutada va ser mesurada a partir de 6 µg d'extracte cel·lular a les 35-40h. de transfecció en la línia cel·lular MIN6. Els resultats de la normalització de l'activitat luciferasa van mostrar que la construcció portadora de la mutació es capaç d'incrementar l'activitat del promotor de l'amilina de forma significativa en relació a la seqüència salvatge ($519 \pm 54,9$ vs $278 \pm 32,6$ % activitat luciferasa relativa, $p < 0.001$). Per tant, la mutació G→A detectada és capaç d'augmentar l'activitat transcripcional del gen de l'amilina.

D'altra banda, cal remarcar que l'activitat d'aquelles construccions dissenyades sense la seqüència de l'intró 1, tant en la construcció salvatge com en la mutant, va resultar pràcticament abolida. Per tant, s'infereix que l'intró 1 exerceix un paper rellevant en l'activitat transcripcional del gen. Els resultats de l'estudi de l'activitat del promotor estan il·lustrats a la Figura 15.

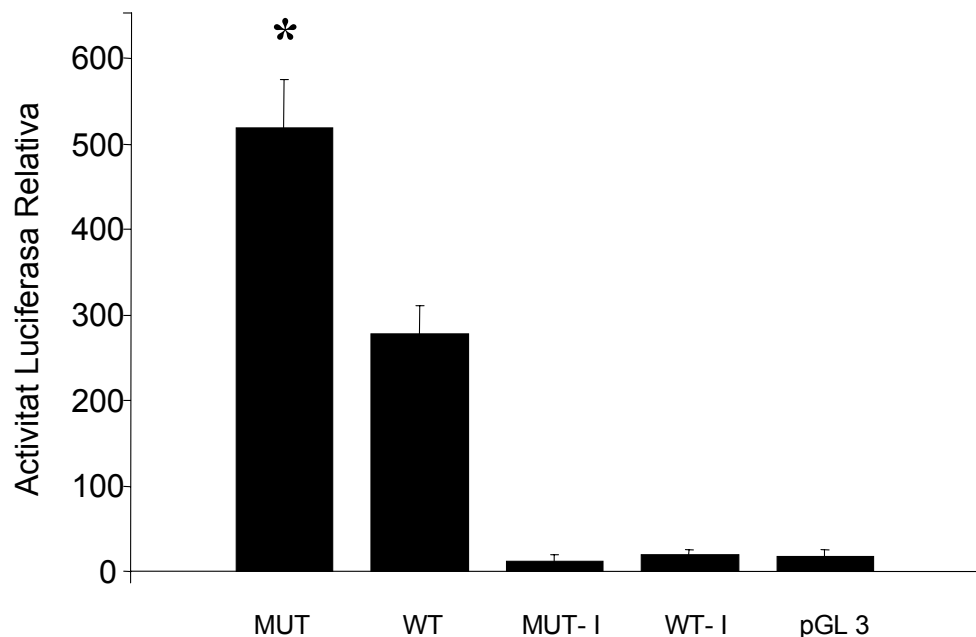


Figura 15. Efecte de la mutació G→A en l'activitat del promotor de l'amilina i importància de la seqüència de l'intró 1 en aquesta activitat. Ambdós construccions, salvatge (WT) i mutant (MUT) amb o sense la seqüència de l'intró 1 (MUT- I i WT- I), i el plasmidi control pGL3 (sense clonació de fragments d'ADN) van ser transfectats separatament en cèl·lules MIN6 cultivades en un medi amb glucosa 22,7 mM. Els resultats van ser normalitzats en relació a l'activitat de la renilla luciferasa i estan expressats com % de l'activitat del plasmidi control pRL-CMV (% d'activitat luciferasa relativa). Els valors representen la mitja ± mitja de l'error estàndard de 10-15 transfeccions independents. La determinació de l'activitat luciferasa en cada transfecció va ser reproduïda en tres experiments separats. * $p < 0,001$ construcció mutant vs construcció salvatge.

3.2 Efecte de la glucosa en l'activitat del promotor

Per tal d'avaluar la importància de la glucosa i del metabolisme glucolític en la regulació de l'activitat transcripcional del gen de l'amilina, va ser analitzada l'activitat luciferasa relativa de cèl·lules MIN6 transfectades a dos concentracions de glucosa diferents: 5,5 i 22,7 mM, i a les 20-24 h de l'addició al medi de cultiu de glucosa 6-deoxi-D-glucosa, i de mannoheptulosa, ambdós agents a concentració 11,2 mM. La glucosa 6-deoxi-D-glucosa és un anàleg de la glucosa que és transportat dins de la cèl·lula β pancreàtica mitjançant el Glut-2, però que no és fosforilable ni metabolitzable. D'altra banda, la mannoheptulosa competeix amb la glucosa per la unió al centre catalític de la glucocinasa, provocant una inhibició reversible d'aquest enzim i, com a conseqüència, una inhibició de la glucòlisi. L'efecte d'ambdós agents van ser analitzat per separat, en presència de glucosa 22,7 mM.

L'activitat luciferasa relativa de cèl·lules MIN6 transfectades tant amb la construcció salvatge com amb la mutant va resultar ser significativament més baixa en condicions d'incubació en glucosa 5,5 mM respecte a concentracions de glucosa 22,7 mM ($p < 0,05$ en ambdós construccions).

D'altra banda, l'activitat luciferasa de cèl·lules MIN6 transfectades amb la construcció salvatge i cultivades en condicions de glucosa 22,7 mM va disminuir en un

20% i 25% després de l'addició al medi de cultiu de 6-deoxi-D-glucosa i mannoheptulosa, respectivament. Aquesta reducció en l'activitat luciferasa va ser estadísticament significativa en ambdós casos ($p < 0,05$). El patró d'activitat luciferasa quan la transfecció cel·lular va ser realitzada amb la construcció mutant va ser semblant al de la construcció salvatge, si bé amb valors absoluts més elevats, objectivant-se reduccions de l'activitat de 60% i 64% després de l'addició de 6-deoxi-D-glucosa i mannoheptulosa, respectivament.

Aquests resultats posen de manifest: a) la important acció estimuladora que exerceix la glucosa de l'activitat transcripcional del gen de l'amilina, b) que la inhibició de la glucòlisi és capaç d'anul·lar aquest efecte estimulador, i c) que la glucosa ha de ser metabolitzada via glucosa-6-fosfat per a que aquest senyal estimulador sigui percebut per la cèl·lula β pancreàtica.

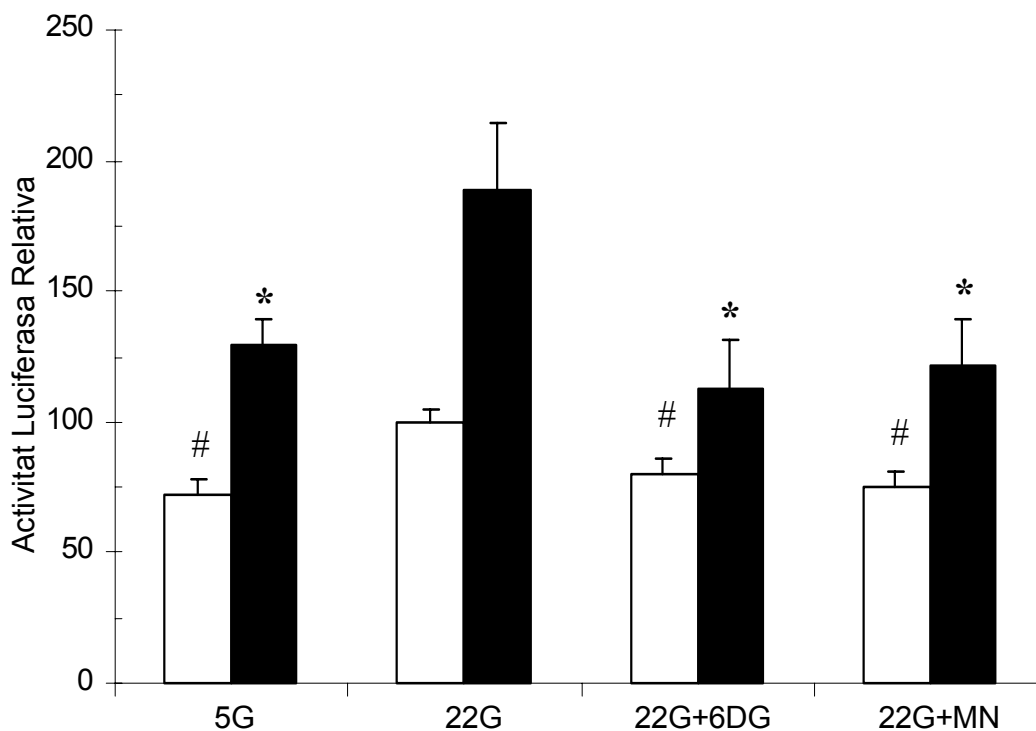


Figura 16. Efecte de la glucosa i del metabolisme glucolític en l'activitat del promotor de l'amilina. L'activitat relativa de la luciferasa corresponent a les construccions salvatge i mutant està representada mitjançant barres blanques i negres, respectivament, i les diferents condicions: glucosa 5,5 mM (5G); glucosa 22,7 mM (22G); 6-deoxi-D-glucosa 11,2 mM (6DG); mannoheptulosa 11,2 mM (MN). Els valors representen les mitges \pm mitja de l'error estàndard d'un mínim de tres transfeccions independents, sent reproduïdes les determinacions per triplicat. * $p < 0,05$ activitat luciferasa de cèl·lules MIN6 transfectades amb la construcció mutant en relació al cultiu 22G. # $p < 0,05$ de les construccions salvatges en relació al cultiu 22G.

3.3 Efecte del calci en l'activitat del promotor

Actualment s'accepta que el metabolisme de la glucosa a la cèl·lula β pancreàtica produeix un augment localitzat de la relació ATP/ADP, conduint al tancament dels canals de K^+ sensibles a l'ATP, amb la conseqüent despolarització de la membrana citoplasmàtica, obertura dels canals de Ca^{2+} sensibles al voltatge i, finalment, entrada de calci dins de la cèl·lula (540). L'augment de la concentració intracel·lular calci donarà lloc a l'exocitosi dels grànuls de secreció, però també podria tenir efectes en la expressió de gens específics.

Per tal d'avaluar l'efecte del calci en l'activitat del promotor de l'amilina, va ser estudiada l'activitat luciferasa de cèl·lules MIN6 incubades durant 20-24h en glucosa 22,7 mM en un medi contenint agents capaços de reduir les concentracions intracel·lulars de calci.

En presència del bloquejant dels canals de calci verapamil o de diazòxid, que impedeix el tancament dels canals de K^+ , l'activitat luciferasa va ser pràcticament abolida (reducció d'activitat superior al 70%, $p < 0,001$) en totes les construccions, tant salvatge com mutant, resultat que reflecteix la important acció que exerceix el calci regulant la transcripció del gen de l'amilina en resposta a l'estímul de la glucosa.

Els resultats de l'activitat luciferasa estan representats a la Figura 17.

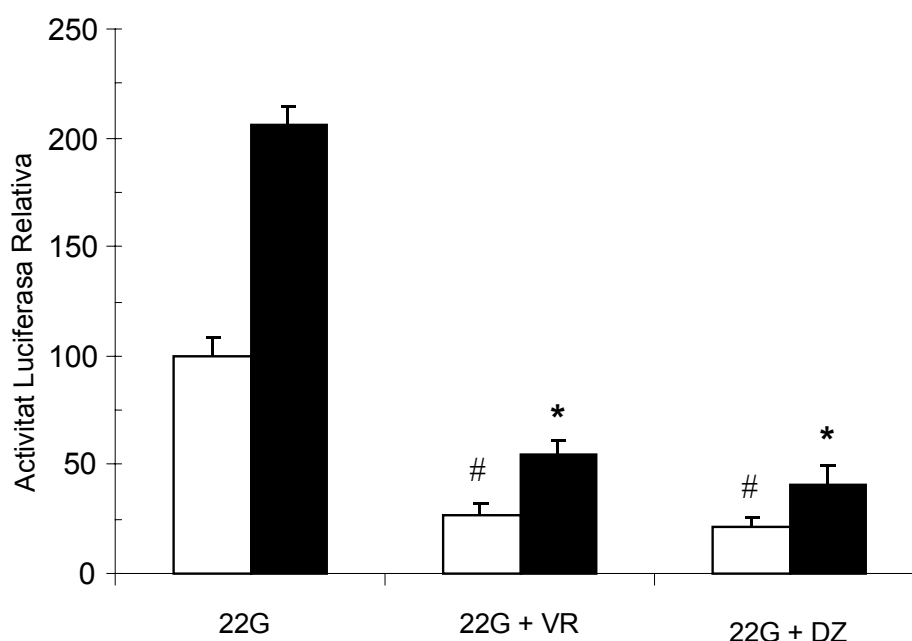


Figura 17. Efecte del calci en l'activitat del promotor de l'amilina. L'activitat relativa de la luciferasa corresponent a les construccions salvatge i mutant està representada mitjançant barres blanques i negres, respectivament, i les diferents condicions: glucosa 22,7 mM (22G); verapamil 100 μ M (VR); diazòxid 0,6 mM (DZ). Els valors representen les mitges \pm mitja de l'error estàndard d'un mínim de tres transfeccions independents, sent reproduïdes les determinacions per triplicat. * $p < 0,001$ construcció mutant en medi amb 22G+VR o 22G+DZ vs. 22G. # $p < 0,001$ construcció salvatge en medi amb 22G+VR o 22G+DZ vs. 22G.

3.4 Efecte de l'AMP cíclic en l'activitat del promotor

Per tal d'identificar senyals que poden estimular o inactivar l'activitat del promotor mitjançant la interacció amb la seqüència CRE (*cAMP response element* o seqüència consensual capaç de respondre a l'AMPc), va ser avaluat l'efecte de forskolina, activador de l'adenilciclasa.

El cultiu de cèl·lules MIN6 durant 20-24h en presència de forskolina va produir un increment de l'activitat luciferasa de cèl·lules transfectades tant amb la construcció

salvatge com mutant, (veure Figura 18). A més a més, aquest augment de l'activitat luciferasa es va produir tant en condicions de glucosa 5,5 mM com en glucosa 22,7 mM. En glucosa 5,5 mM l'augment va ser del 76% (construcció salvatge) i 81% (construcció mutant), mentre que en glucosa 22,7 mM, del 61% (construcció salvatge) i 55% (construcció mutant).

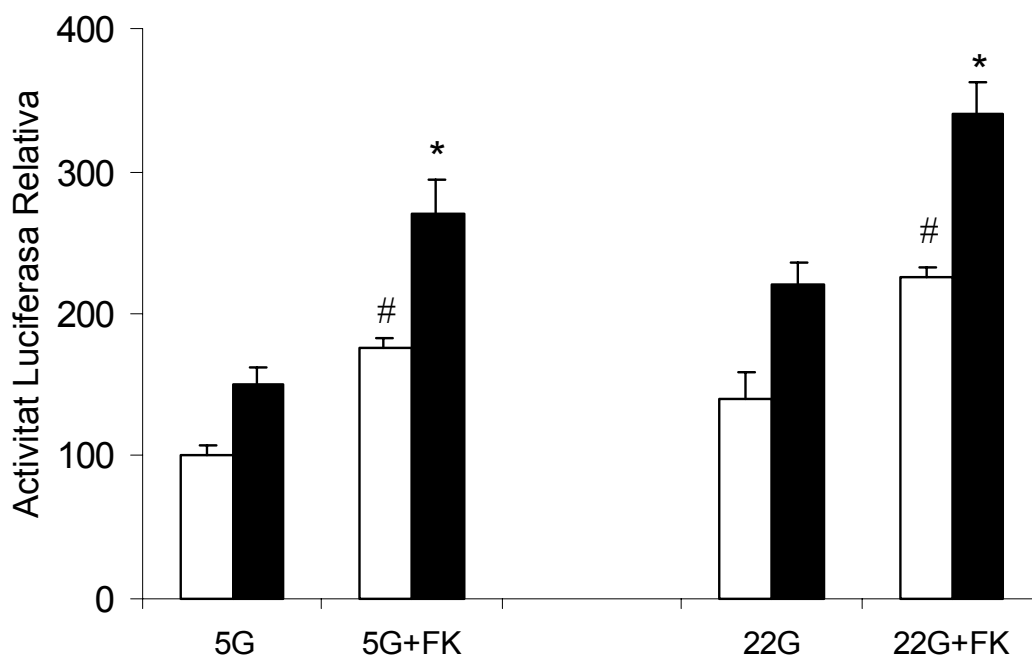


Figura 18. Efecte de l'AMPc en l'activitat del promotor. L'activitat relativa de la luciferasa corresponent a les construccions salvatge i mutant està representada mitjançant barres blanques i negres, respectivament, i les diferents condicions: glucosa 5,5 mM (5G); glucosa 22,7 mM (22G); forskolina 10 μ M (FK). Els valors representen les mitges \pm mitja de l'error estàndard d'un mínim de tres transfeccions independents, sent reproduïdes les determinacions per triplicat. * $p < 0,05$ construcció mutada en condicions 5G+FK i 22G+FK vs. construcció mutada 5G. # $p < 0,01$ construcció salvatge en condicions 5G+FK i 22G+FK vs construcció salvatge 5G.

3.5 Efecte dels corticoides en l'activitat del promotor

L'addició al medi de cultiu de dexametasona durant 20-24h va incrementar significativament l'activitat luciferasa de cèl·lules transfectades tant amb la construcció salvatge (120% en glucosa 5,5 mM, i 50% en glucosa 22,7 mM), com amb la construcció mutant (189% en glucosa 5,5 mM, i 85% en glucosa 22,7 mM). Aquest resultat posa de manifest una acció activadora de la dexametasona de l'activitat transcripcional del gen de l'amilina. L'efecte de la dexametasona es mostra a la Figura 19.

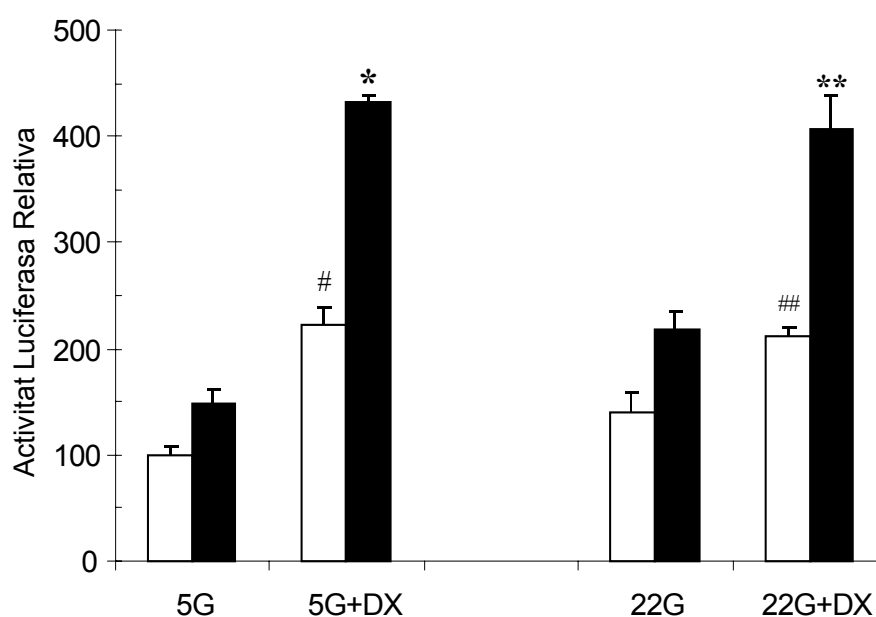


Figura 19. Efecte de la dexametasona en l'activitat del promotor. L'activitat relativa de la luciferasa corresponent a les construccions salvatge i mutant està representada mitjançant barres blanques i negres, respectivament, i les diferents condicions: glucosa 22,7 mM (22G); glucosa 5,5 mM (5G); dexametasona 10 μ M (DX). Els valors representen les mitges \pm mitja de l'error estàndard d'un mínim de tres transfeccions independents, sent reproduïdes les determinacions per triplicat. * $p < 0,01$ construcció mutant en 5G+DX vs. construcció mutada en 5G. ** $p < 0,05$ construcció mutada en 22G+DX vs. 5G. # $p < 0,01$ construcció salvatge en 5G+DX vs. 5G. ## $p < 0,001$ construcció salvatge 22G+DX vs. 5G.

1- DISCUSSIÓ DELS RESULTATS DE L'ESTUDI DE MUTACIONS EN ELS EXONS 1, 2 I 3 DEL GEN DE L'AMILINA

La diabetis tipus 2 es caracteritza per la presència de dipòsits de substància amiloide en els illots pancreàtics de la immensa majoria de pacients, constituint un fet característic de la malaltia (246). El principal component d'aquests dipòsits és l'amilina, un pèptid de 37 aminoàcids sintetitzat i cosecretat amb la insulina per la cèl·lula β pancreàtica, en resposta al mateixos estímuls secretagogs, i que exerceix una important funció en la regulació del metabolisme de la glucosa. Actualment existeixen al llarg de la literatura evidències que suggereixen que aquest pèptid podria desenvolupar una important acció en l'etiopatogènia de la diabetis tipus 2, mitjançant la seva habilitat per formar agregats a partir de monòmers d'amilina i iniciar el procés d'amiloïdogènesi, que conduiria ulteriorment a un deteriorament de la funció de la cèl·lula β i a una reducció de la massa cel·lular β (394, 421).

No obstant, encara no es coneixen en profunditat els mecanismes responsables de la conversió de l'amilina en fibres insolubles que donarien lloc a l'amiloïdosi dels illots i, en conseqüència, al desenvolupament d'una diabetis tipus 2. El desenvolupament del treball de la present memòria s'ha orientat per intentar respondre aquest aspecte. En la hipòtesi de treball s'ha plantejat que una possible base genètica podria condicionar una alteració en la síntesi o en l'expressió del pèptid, i així exercir d'aquesta forma un paper etiopatogènic en la diabetis tipus 2, dins del complex context poligènic de la malaltia. Partint d'aquesta premissa, el primer objectiu del treball fou investigar la possible presència de mutacions o polimorfismes en els exons 1, 2 i 3 del gen de l'amilina en població amb diabetis tipus 2, analitzant els possibles trets clínics característics dels pacients portadors de mutacions, per tal d'establir si existeix una correlació genotip-fenotip.

D'altra banda, la diabetis gestacional és defineix com una forma d'intolerància als hidrats de carboni que comença o és diagnosticada inicialment durant la gestació. Aquesta definició de tipus cronològic i no patogènic engloba diferents tipus de diabetis. Així, ocasionalment la diabetis gestacional pot ser la primera manifestació d'una diabetis tipus 1, o bé d'una síndrome MODY. No obstant, en la gran majoria de casos, representa un estat de tolerància defectuosa a la glucosa en grau variable que desapareix després del part, i que és un factor predictiu de l'aparició futura de diabetis tipus 2 (541). Donat que la diabetis gestacional pot ser considerada com un estat de prediabetis i que estudis recents han demostrat que en pacients amb diabetis gestacional es produeix una hipersecreció d'amilina (542, 543), també va ser analitzada la presència de mutacions en el gen de l'amilina en una cohort de pacients amb diabetis gestacional, per tal d'establir si alteracions en el gen de l'amilina podrien exercir un paper en la susceptibilitat genètica a desenvolupar diabetis gestacional.

En algunes formes d'amiloïdosis, tal és el cas de la malaltia de Alzheimer, s'ha demostrat la presència d'alteracions genètiques que resulten en l'agregació i precipitació de la proteïna constituent (β amiloide, preselenina 1 i preselenina 2), donant lloc a la formació d'amiloïdosi cerebral en pacients afectes (375, 376). De forma anàloga, es va hipotetitzar que alteracions en les regions codificants del gen de l'amilina podrien estar implicades en la formació dels dipòsits d'amiloide en el pàncrees de pacients amb diabetis tipus 2, per exemple donant lloc a un pèptid més inestable químicament i amb major tendència a la precipitació. La hipotètica funció de possibles mutacions del gen de l'amilina en l'etiopatogènia de la diabetis tipus 2 és controvertida, havent-se descrit al llarg de la literatura tant associacions positives com resultats negatius. La primera observació d'una possible associació entre alteracions en el gen i diabetis tipus 2 parteix d'estudis en població japonesa desenvolupats per Sakagashira *i col.* Els autors van detectar en un 4,1% de pacients amb diabetis tipus 2

la presència de la mutació puntual AGC→GGC a l'exó 3 del gen, que involucra la substitució de l'aminoàcid serina per glicina en posició 20 de la molècula de l'amilina (mutació S20G) (224). L'esmentada mutació no va ser detectada en la població control no diabètica estudiada, i s'associava amb un patró fenotípic específic: edat relativament jove d'aparició de la malaltia (≤ 35 anys), tendència a la insulinopènia i important agregació familiar de diabetis. Recentment, estudis amb cèl·lules COS-1 han demostrat que la transfecció de plàsmids portadors de l'amilina mutada és capaç de donar lloc a la formació d'amiloide intracel·lular i induir el procés apoptosi (544). Aquesta relació entre alteracions en el gen de l'amilina i diabetis tipus 2 no ha estat detectada en altres poblacions estudiades, suggerint la presència de factors ètnics associats en l'esmentada associació (225-227). Com a principal crítica a aquests escassos treballs desenvolupats, cal remarcar el reduït nombre de subjectes estudiats. Més recentment, Birch *i col.* (228) van publicar el més ampli estudi efectuat, analitzant 96 pacients amb diabetis tipus 2 d'origen anglosaxó amb important agregació familiar de diabetis (2 o més familiars vius afectes). L'estudi va estar exclusivament focalitzat en l'anàlisi de la mutació S20G, i aquesta mutació no va ser detectada en la població estudiada.

En el present treball la població total estudiada va incloure 392 persones no relacionades d'origen caucàsic (186 pacients amb diabetis tipus 2, 130 controls sans, 38 dones amb diabetis gestacional i 38 dones gestants amb tolerància normal a la glucosa), abordant l'estudi les regions codificants, la regió 5'UTR i les regions d'unió exó-intró del gen de l'amilina. La mutació patogènica S20G no va ser detectada en cap subjecte de la població estudiada, resultat que està en concordància amb l'estudi efectuat per Birch *i col.* en població caucàsica d'origen nord-europeu. No obstant això, cal remarcar la detecció de la presència del polimorfisme C→T en posició +79 pb del punt d'inici de l'intró 2 del gen (polimorfisme C79A). Les freqüències al·lèliques d'aquest polimorfisme no van ser significativament diferents en els grups estudiats, ni

entre pacients amb diabetis tipus 2 i controls (13,5 % vs. 15,4%), ni entre dones amb diabetis gestacional i controls gestacionals (23,7% vs. 18,4%), suggerint que aquest canvi no constituiria un candidat en la susceptibilitat genètica a diabetis tipus 2. Cal remarcar que l'anàlisi de les característiques clíniques de la població estudiada ha posat de manifest que el polimorfisme detectat s'associa a un fenotip específic, amb un patró lipídic menys aterogènic, suggerint un paper protector d'aquest polimorfisme en el risc cardiovascular. Així, l'estudi univariant va mostrar que tant pacients amb diabetis tipus 2 com controls amb genotip CA presenten concentracions plasmàtiques de colesterol total i colesterol LDL més baixes que subjectes amb genotip CC, demostrant el model de regressió logística multivariant que la concentració de colesterol LDL és la única variable associada independentment amb el polimorfisme C79A ($p < 0,001$, odds ratio: 0,33, i interval de confiança del 95%: 0,17-0,63). En relació a la cohort de dones amb diabetis gestacional, malgrat que l'estudi de regressió multivariant no va poder ser emprat pel tamany de la mostra analitzada ($n = 38$, 9 dones amb diabetis gestacional amb genotip CA), l'estudi univariant també va mostrar que pacients portadores del polimorfisme presentaven concentracions inferiors de LDL colesterol en relació a no portadores ($p = 0,05$).

Si analitzem només els pacients amb diabetis tipus 2 portadors del polimorfisme C79A, malgrat presentar un patró lipídic menys aterogènic, la prevalença de coronariopatia isquèmica no va ser significativament diferent en relació a pacients no portadors. No obstant això, hem de considerar l'elevada incidència reportada en diversos estudis d'isquèmia miocàrdica silent en pacients amb diabetis tipus 2 (545, 546). En conseqüència, donat la manca d'informació angiogràfica en pacients asimptomàtics des del punt de vista coronari, la prevalença de coronariopatia isquèmica pot haver estat subestimada (547).

Un important punt a debatre és el possible mecanisme patogènic que explica l'associació del polimorfisme C79A amb unes concentracions de colesterol LDL més baixes. El polimorfisme detectat no involucra cap factor de transcripció conegut ni produeix un canvi estructural en la seqüència del pèptid amilina. D'altra banda, com no afecta l'àrea d'unió exó-intró, és improbable que pugui alterar el mecanisme de *splicing* o maduració de l'ARN de l'amilina. Una possible explicació de l'associació detectada és la presència de lligament d'aquest polimorfisme amb polimorfismes d'altres gens ubicats en el cromosoma 12. Així, ha estat recentment descrita a prop del locus del gen de l'amilina la ubicació de dos possibles gens candidats relacionats amb el metabolisme lipídic i arteriosclerosi: el gen LOX-1, localitzat en la regió del cromosoma 12 p12.3-p13.2, que codifica el *lectin-like oxidized LDL receptor-1* (548), i el gen RPL6, localitzat en la regió cromosòmica 12p11-p13.3, que codifica el *LDL receptor-related protein 6* (549).

Altre component dels dipòsits d'amiloide en els illots pancreàtics de pacients amb diabetis tipus 2 és l'apoproteïna E, l'hipotètic paper de la qual en l'amiloidogènesi dels illots pancreàtics és controvertit. Aquesta proteïna constitueix un component fonamental de les plaques senils i de les estructures neurofibril·lars detectades en el cervell de pacients amb la malaltia d'Alzheimer (344). Estudis desenvolupats en aquesta malaltia suggereixen que pot promoure la fibril·logènesi i estabilitzar les fibres d'amiloide formades a partir del precursor amiloide A beta (350). Per extrapolació, s'ha hipotetitzat que també l'apoproteïna E pot exercir una funció en la formació dels dipòsits de substància amiloide en els illots pancreàtics, i que una producció augmentada d'apo E podria estar associada amb el desenvolupament de diabetis tipus 2 (246). En el present estudi van ser mesurades les concentracions plasmàtiques d'apo E, però no es van detectar diferències significatives entre pacients amb diabetis tipus 2 i controls, ni entre persones portadores i no portadores del polimorfisme C79A. Aquest resultat està en concordança amb estudis recents que suggereixen que l'apo E

no desenvolupa una funció crítica en la formació dels dipòsits d'amiloide en la diabetis tipus 2 (550, 551).

En resum, en aquest treball ha estat identificat un polimorfisme en el gen de l'amilina associat a un perfil lipídic menys aterogènic en població amb diabetis tipus 2 i en població control. Estudis prospectius incloent-hi anàlisi de lligament amb els pedigrís familiars de pacients portadors proporcionaran importants evidències del mecanisme patogènic d'aquesta associació i de la importància d'aquest polimorfisme en el risc cardiovascular en pacients amb diabetis tipus 2.

2- DISCUSSIÓ DELS RESULTATS DE L'ESTUDI DE LA REGIÓ PROMOTORA DEL GEN DE L'AMILINA

Altre aspecte abordat en el desenvolupament del present treball és que potencials alteracions genètiques afectant la regió promotora del gen de l'amilina, responsable de la regulació gènica, podrien conduir a una expressió anòmala del pèptid i, ulteriorment, a la formació de fibril·les i de dipòsits de substància amiloide en els illots pancreàtics de pacients amb diabetis tipus 2. L'evidència més important recolzant aquesta hipòtesis sorgeix d'experiments *in vitro* amb ratolins transgènics que sobreexpressen l'amilina humana, que són capaces de desenvolupar dipòsits d'amiloide i diabetis tipus 2, indicant que la sobreexpressió de l'amilina humana pot constituir un important factor diabetogènic inductor de la formació d'amiloide (394, 395).

Per tal de testar aquesta hipòtesi, va ser estudiada la regió promotora del gen de l'amilina, abarçant la seqüència compresa entre -571 pb i +163 bp del punt d'inici de la transcripció del gen, regió contenint elements crítics en la regulació de l'expressió de l'amilina en la cèl·lula β pancreàtica. Entre aquests, cal destacar els elements d'unió del factor PDX1 al promotor del gen de l'amilina, l'element de resposta a l'AMPc (*cAMP-responsive element*), elements cis de regulació negativa a -111/-101 pb, un domini activador a -182/-122, i la caixa TATA. A més a més, la regió analitzada va incloure la seqüència completa de l'exó 1, que també conté elements promotors reguladors. En la revisió de la literatura, només existeix un estudi previ en població japonesa analitzant la presència d'alteracions genètiques en la regió promotora del gen, concretament abordant una seqüència de 536 pb en la regió 5' (552). Aquest treball només analitza una població compresa per 35 pacients amb diabetis tipus 2, 3 pacients amb diabetis tipus MODY i 49 controls no diabètics, no objectivant-se cap

alteració de seqüència. Evidentment, les limitacions de l'estudi són òbvies, fonamentalment per la reduïda mostra poblacional estudiada, a més de que l'estudi genètic es centra en una població de diferent origen ètnic.

En el present treball ha estat detectat el canvi de nucleòtid guanina per adenina (G→A) en heterozigosi en posició -132 pb del punt d'inici de transcripció del gen de l'amilina en 18 pacients amb diabetis tipus 2 i en 2 controls. A diferència del polimorfisme intrònic detectat en l'exó 2 del gen, el genotip GA presenta una freqüència significativament superior en població diabètica que en població control (9,7% vs. 1,5%, $p < 0,005$, odds ratio: 6,58 i amb interval de confiança del 95% de 1,56-30,08). Aquest resultat suggereix que la mutació G→A podria constituir un potencial candidat en la susceptibilitat genètica a la diabetis tipus 2, sempre considerant el complex context poligènic de la malaltia.

És important remarcar que l'estudi familiar efectuat en pacients portadors de la mutació en heterozigosi ha permès la identificació de dos dones homozigotes. En ambdós casos, la prova de tolerància a la glucosa ha detectat una alteració del metabolisme de la glucosa, intolerància oral a la glucosa i diabetis, respectivament. A més a més, l'estudi genètic dels pedigrís familiars ha detectat 7 individus heterozigots i 5 no portadors, la PTOG dels quals fou normal. L'estudi del pedigrí familiar dels provands homozigots suggereix la presència de cosegregació de la mutació amb diabetis, donat que els germans són no portadors de la mutació (genotip GG) i presenten una tolerància oral a la glucosa estrictament normal. No obstant això, per tal d'assegurar o descartar la presència de cosegregació caldria ampliar el número de famílies estudiades per augmentar la probabilitat d'obtenir individus homozigots.

A continuació, per tal de determinar si una secreció incrementada o desproporcionada d'amilina estava associada amb la mutació detectada, van ser mesurades les concentracions plasmàtiques d'amilina i d'insulina en els punts 0'-30'-

60'-90'-120' de la PTOG en els 14 familiars de primer grau estudiats, així com en 10 controls sans normoglicèmics no portadors, d'edat i IMC similars. Addicionalment, van ser mesurades les respostes secretores d'ambdós pèptids durant l'interval 0-30' de la PTOG, sent calculat l'increment de les concentracions mitjançant el quocient 30'/0'. Com a resultat, l'increment de l'amilina en resposta de l'amilina a l'estímul de la glucosa (Δ amilina 0-30') va ser significativament inferior en individus portadors de la mutació G→A, tant homozigots (increment de 1,5 vegades) com heterozigots (increment de 3 vegades), en relació a individus no portadors (increment de 7 vegades, $p < 0,05$ homozigots i heterozigots vs. no portadors), mentre que la resposta de la insulina no van diferir significativament entre els tres grups. Aquest resultat suggereix que la secreció precoç de l'amilina es troba deteriorada en individus portadors de la mutació, mentre que la resposta de la insulina està preservada.

Està ben establert, tant en humans com en animals, que la insulina és secretada mitjançant un patró bifàsic, amb una fase ràpida i precoç d'alliberament seguida a continuació per una fase secretora gradual i progressiva que persisteix tant com l'estímul de la glucosa és present (553). La pèrdua d'aquesta primera fase de secreció d'insulina constitueix un defecte precoç en la història evolutiva de la diabetis tipus 2, estant present inclús abans del desenvolupament de la hiperglucèmia. D'altra banda, actualment el fracàs de la cèl·lula β en la diabetis, tant tipus 1 com tipus 2 (511, 512) tendeix a ser contemplat com un fracàs tant en la secreció de la insulina com de l'amilina, però no està ben establert quin del dos defectes és previ o bé si es produeixen de forma simultània. El present treball suggereix que familiars portadors de mutacions presenten un defecte precoç de la funció de la cèl·lula β , amb un deteriorament de la secreció de l'amilina, i que aquest defecte és previ al deteriorament de la secreció de la insulina. No obstant això, aquest resultat han de ser interpretats amb extrema cautela. Una crítica que ens podríem plantejar es que ambdós familiars homozigots presenten una tolerància alterada a la glucosa, que per

sí mateixa podria alterar la resposta de la cèl·lula β i ser responsable de l'alteració del patró secretor de l'amilina (330). En aquest sentit cal remarcar que el defecte secretor de l'amilina també va ser detectat en familiars heterozigots, en els qual la PTOG fou diagnòstica de tolerància normal a la glucosa.

Altre aspecte a considerar és la resposta de l'ALP a l'estímul de la glucosa. El significat biològic de l'ALP encara no està ben establert. Així, es desconeix si aquest concepte podria representar formes glicosilades d'elevat pes molecular o bé formes precursors del pèptid (proamilina). Degut a les dificultats que representa la determinació plasmàtica de l'amilina, alguns autors han determinat les concentracions plasmàtiques d'ALP com a forma d'estimació de les concentracions d'amilina (330), la qual cosa és criticable, donat el significat encara incert d'aquesta molècula. Com a resultat dels estudis familiars cal remarcar que, mentre que en subjectes heterozigots i no portadors l'increment de les concentracions plasmàtiques de l'ALP es produeix de forma progressiva i bastant paral·lela, subjectes homozigots presenten un patró de resposta completament diferent, amb un pic de màxima concentració plasmàtica als 60' de la PTOG i posterior ràpida davallada de concentracions. En aquest sentit, podríem hipotetitzar que, si realment l'ALP correspon a formes precursors del pèptid, subjectes homozigots presentarien una activació de la via secretora constitutiva –que no requereix l'acció de les endopeptidases PC2 i PC3, i que per tant allibera propèptids- en relació a subjectes heterozigots i no portadors.

En el desenvolupament del nostre treball, a continuació i a fi de determinar la possible rellevància funcional de la mutació G→A, l'activitat del promotor de les construccions plasmídiques contenint el gen de la luciferasa i la seqüència salvatge o mutant va ser analitzada mitjançant estudis de transfecció en la línia cel·lular MIN6. Aquesta línia cel·lular deriva de cèl·lules d'insulinoma de ratolí transgènic que exhibeixen característiques semblants a les cèl·lules β pancreàtiques normals tant en

relació al metabolisme de la glucosa com a la secreció d'insulina estimulada per la glucosa (538). Com a resultat, hem demostrat que la mutació G→A exerceix un efecte estimulador en l'activitat transcripcional del promotor de l'amilina. Podríem hipotetitzar que aquest augment de l'activitat transcripcional del gen es correlacionaria *in vivo* amb una hiperexpressió de l'amilina i amb un augment de la seva producció en la cèl·lula β . Si analitzem la nostra població de pacients amb diabetis tipus 2, al mesurar en el moment actual mitjançant immunoassaig enzimàtic amb l'anticòs monoclonal F0024 les concentracions plasmàtiques d'amilina, el resultat obtingut és que la majoria de pacients diabètics, independentment si són portadors o no de la mutació presenten concentracions basals indetectables, la qual cosa està en relació amb el temps d'evolució de la malaltia (corresponent a una duració de la diabetis de $12,8 \pm 9,2$ anys en pacients amb genotip GG, i de $11,1 \pm 9,3$ anys en pacients amb genotip GA), tal com altres estudis han demostrat (331). En els estudis familiars, sí que veiem aquesta correlació. Així, individus portadors de la mutació G→A, fonamentalment els homozigots, tenen tendència a presentar concentracions basals d'amilina augmentades en relació a individus sans no portadors.

D'altra banda, els estudis de cotransfecció en cèl·lules MIN6 mostren que l'activitat de totes les construccions plasmídiques dissenyades sense la seqüència de l'intró 1 està pràcticament abolida. La disminució de l'activitat del promotor de l'amilina com a conseqüència de la deleció de l'intró 1 també ha estat reportada en estudis previs (281, 284), considerant-se que aquesta regió intrònica desenvolupa un paper important en el control postranscripcional. Aquesta conclusió està basada en l'observació de que la substitució de la seqüència de l'intró 1 del gen de l'amilina per seqüències no relacionades del gen EF-1 (*polypeptide chain elongation factor-1 alpha*) que s'expressa ubiquament i consta de 8 exons i 7 introns (554), és capaç de restaurar l'expressió de l'amilina fins a nivells comparables al gen salvatge. Encara que no és

coneix amb certesa quin és el mecanisme regulador exacte, els resultats d'aquest darrer estudi suggereixen que es requereix un eficient mecanisme de *splicing* per assolir un màxim nivell d'expressió d'amilina. No es tracta d'un fenomen aïllat a la natura, sinó que estudis desenvolupats amb altres gens de mamífers i plantes indiquen que pot ser un important mecanisme regulador (555).

Finalment, la nostra recerca es va centrar en l'estudi dels mecanismes de regulació de l'activitat del promotor de l'amilina, comparant els efectes de la glucosa, del calci, de l'AMPc i dexametasona en la seqüència salvatge del promotor i la seqüència mutant.

Actualment se sap que la glucosa és un important regulador de l'expressió de l'amilina i de la insulina en la cèl·lula β pancreàtica. Així, estudis previs desenvolupats pel nostre grup de recerca en illots pancreàtics humans i de rata han demostrat que la glucosa a concentracions elevades és capaç d'augmentar el contingut d'ARNm tant de la insulina com de l'amilina als illots (556, 557). Els mecanismes de senyalització intracel·lular que enllacen la glucosa amb l'expressió del gen de l'amilina no estan aclarits. En el present estudi, a l'avaluar la importància de la glucosa i del metabolisme glucolític en la modulació de l'activitat del promotor de l'amilina, com a resultat observem en ambdós construccions, mutant i salvatge, una activitat luciferasa relativa significativament superior en condicions d'incubació amb glucosa 22,7 mM que amb glucosa 5,5 mM. D'altra banda, aquest efecte estimulador de la glucosa s'aboleix en presència de l'inhibidor de la glucocinasa (i, per tant, de la glucòlisi) mannoheptulosa o de l'anàleg de la glucosa no metabolitzable 6-deoxi-D-glucosa, també en ambdós construccions. Aquests resultats posen de manifest l'important acció estimulador que exerceix la glucosa en l'activitat transcripcional del gen de l'amilina, i que la inhibició de la glicòlisi és capaç d'anul·lar aquest efecte estimulador. En conseqüència, l'activació transcripcional del gen de l'amilina està regulada per senyals derivats del metabolisme de la glucosa.

Seguidament, a fi d'avaluar la importància del calci en la regulació de l'activitat del promotor de l'amilina, va ser analitzada l'activitat luciferasa relativa de cèl·lules MIN.6 transfectades en presència de glucosa 22,7 mM i d'agents capaços de disminuir la concentració intracel·lular de calci. En el present estudi, ambdós construccions plasmídiques, salvatge i mutant, van mostrar una severa reducció de l'activitat del promotor amb l'addició al medi de cultiu tant de verapamil, un bloquejant dels canals de calci, com de diazòxid, que impedeix el tancament dels canals de K⁺. És a dir, el bloqueig de l'entrada del catió a l'illot pancreàtic seria capaç d'inhibir l'efecte de la glucosa sobre l'expressió de l'amilina. Aquest resultat reflecteix la important acció que exerceix el calci regulant la transcripció del gen de l'amilina en resposta a l'estímul de la glucosa. Aquest fet constitueix una diferència crítica en la regulació dels promotors dels gens de la insulina i de l'amilina. Tal com hem comentat prèviament, ambdós pèptids, insulina i amilina, s'expressen en la cèl·lula β pancreàtica dels illots de Langerhans i son cosecretats en resposta als canvis en les concentracions de glucosa, sent els nivells dels seus respectius ARNm a l'illot pancreàtic també regulats per la glucosa. Aquest fet és degut a que els promotors d'ambdós gens comparteixen seqüències reguladores comunes (elements *cis-acting*), i presenten zones de unió al factor de transcripció PDX1 (*pancreatic and duodenal homeobox factor 1*, també anomenat *insulin promoter factor 1* o IPF1 *insulin upstream factor 1*). Aquest factor exerceix una funció crítica en la regulació de la transcripció dels gens de la insulina i de l'amilina en resposta a la glucosa. No obstant això, en el cas del promotor de l'amilina perquè aquest mecanisme regulador funcioni eficaçment es requereix la integritat de la via de senyalització del calci, mentre que la regulació per glucosa del promotor de la insulina encara que depèn de l'activitat de PDX1, es produeix independentment dels canvis en la concentració del calci. Dos treballs previs recolzen els resultats del nostre estudi. Gasa *i col.* (557) en estudis desenvolupats en illots pancreàtics humans cultivats en glucosa 16,7 mM demostren una reducció severa

(superior al 60%) dels nivells de l'ARNm de l'amilina en presència de verapamil 100 μ M en relació a illots controls cultivats en absència d'aquest agent. En contraposició, el verapamil no va exercir cap efecte significatiu en els nivells de l'ARNm de la insulina. Més recentment, disposem d'un interessant segon treball efectuat per Macfarlane i col. en la línia cel·lular NES2Y (558). La línia cel·lular NES2Y és una línia proliferativa humana de cèl·lules β derivada d'un pacient amb hipoglucèmia hiperinsulinèmia de la infantesa (559). En conseqüència, son cèl·lules que secreten elevades quantitats d'insulina independentment de les concentracions de glucosa, mostrant una pèrdua de canals de K^+ funcionalment operatius, la qual cosa condueix al fracàs del control de la despolarització de membrana depenent de la via de senyalització intracel·lular del calci. Addicionalment, aquestes cèl·lules presenten una expressió defectuosa del factor de transcripció PDX1 i, per tant, una abolicció de l'efecte estimulador de la glucosa en la transcripció del gen de la insulina (560). Això no obstant, la sobreexpressió de PDX1 en aquestes cèl·lules (constituint la línia cel·lular NES-PDX-1) és capaç de restaurar la regulació normal per glucosa del promotor del gen de la insulina, malgrat la persistència d'una alteració en la senyalització del calci (561). Contràriament, amb la sobreexpressió de PDX1 en cèl·lules NES2Y, la glucosa no és capaç d'estimular l'activitat transcripcional del promotor de l'amilina. Els efectes de la glucosa en el promotor de l'amilina només es van posar de manifest en presència de PDX1 i quan la senyalització normal del calci va ser restaurada amb la sobreexpressió de les dos subunitats dels canals de K^+ SUR1 i Kir6.2. En resum, el resultat del nostre estudi, recolzat per aquests experiments, demostra que la regulació per glucosa del promotor de l'amilina, a diferència del promotor de la insulina, és altament depenent de la concentració intracel·lular de calci. Es desconeix quin és el mecanisme íntim que enllaça ambdós vies de senyalització, havent-se postulat que el factor de transcripció Isl-1 podria ser el factor addicional depenent del calci involucrat amb el factor PDX1 en la mediació dels efectes de la glucosa en el gen de l'amilina (562).

A continuació, l'objecte del nostre projecte es va centrar en l'estudi del paper de l'AMPc en la regulació de l'activitat del promotor de l'amilina. El metabolisme de la glucosa i dels nutrients en general a més d'incrementar les concentracions de l'ARNm de l'amilina a l'illot pancreàtic (557), també provoca un augment significatiu de la concentració intracel·lular d'AMPc (563), efecte secundari a l'augment de la concentració de calci citosòlic. D'altra banda, l'AMPc és capaç d'estimular l'activitat transcripcional del gen de la insulina interaccionant amb el corresponent element de resposta a l'AMPc o element CRE (*cAMP-responsive element*) (564). En el promotor de l'amilina la seqüència de nucleòtids TGATGTTC (-61/-54 pb del punt d'inici de la transcripció) s'assembla a la seqüència consens de l'element CRE descrit en el promotor del gen de la insulina (CRE amb la substitució d'una citosina per una timina), suggerint també un potencial paper regulador de l'AMPc en l'activitat transcripcional del gen de l'amilina. És remarcable que mentre que en estudi previ Mosselman i col. desenvolupat en la línia cel·lular RIN AHT2 (subclona derivada de la línia d'insulinoma de rata RIN-m5F) van arribar a la conclusió de que es tractava d'un CRE no funcional (282), els resultats de la nostra recerca suggereixen que realment sí que es tracta d'un domini de regulació positiva, demostrant-se un efecte estimulador de l'anàleg de l'adenil ciclasa forskolina en l'activitat del promotor de l'amilina. Les discrepàncies amb el nostre estudi podrien se atribuïdes a la utilització de diferents models cel·lulars o a diferències metodològiques. A més a més, en el nostre estudi l'efecte activador de la forskolina va ser objectivat independentment de les concentracions de glucosa en el medi (tant en condicions de glucosa 5,5 mM com a 22,7 mM), extrapolant-se per tant que l'efecte de la forskolina en la transcripció del gen de l'amilina és independent de la glucosa. Aquest resultat suggereix que glucosa i forskolina regulen l'activitat transcripcional del gen de l'amilina mitjançant diferents vies de senyalització intracel·lular.

Finalment, va ser analitzat l'efecte de la dexametasona en l'activitat del promotor de l'amilina. En el nostre estudi, el tractament amb dexametasona va induir un augment un augment de l'activitat del promotor del gen de l'amilina, tant en les construccions salvatges com en les mutants, la qual cosa suggereix que els corticoides contribuirien en la regulació transcripcional del gen de l'amilina. Estudis previs desenvolupats per Mulder *i col.* (565) han demostrat que l'expressió dels gens de la insulina i de l'amilina es regula de forma no paral·lela en resposta a l'estímul de la dexametasona. Així, en rates tractades intraperitonealment durant 12 dies amb dosis elevades de dexametasona (2,6 mg/Kg/dia), es va detectar mitjançant immunoassaig un augment en els illots pancreàtics de les concentracions de l'ARNm de l'amilina i de la insulina ($490 \pm 13 \%$ i $203 \pm 9 \%$, respectivament, en relació a rates no tractades). L'augment en la concentració de l'amilina va ser superior al de la insulina ($p < 0,05$). Anàlisis morfològics van revelar que el tractament amb dexametasona induïx la hipertròfia de les cèl·lules β pancreàtiques. En aquest estudi es demostra que l'augment de les concentracions de l'ARNm de l'amilina es secundari tant a l'augment de l'expressió del gen de l'amilina en cèl·lules β , com a la hipertròfia i la hiperplàsia de cèl·lules β . En contraposició, l'augment de l'ARNm de la insulina és exclusivament degut a la hipertròfia/hiperplàsia de cèl·lules β , donat que l'expressió del gen de la insulina es troba disminuïda després de tractament amb dexametasona. D'altra banda, la detecció d'una estimulació de l'activitat transcripcional del gen de l'amilina en resposta a dexametasona, suggereix la presència d'elements de resposta als corticoides en el promotor de l'amilina. Estudis previs han demostrat la presència d'elements funcionals en el promotor del gen de la insulina, que actuarien com llocs d'unió als corticoides (GRE o també anomenats *glucocorticoid-responsive elements*) (566, 567). Malgrat que fins al moment actual no s'han identificat GRE en el promotor del gen de l'amilina, existeix a l'intró 1 del gen una seqüència de nucleòtids similar a la seqüència consensual descrita en altres gens, diferint només en un nucleòtid

(TGTTCT) (568). Aquesta seqüència va ser inclosa en les construccions plasmídiques dissenyades en el present treball. Es pot hipotetitzar que aquesta seqüència actuaria com un GRE i que la dexametasona s'uniria a aquest element-cis estimulant l'activitat del promotor de l'amilina.

Com a resum dels estudis *in vitro* desenvolupats en aquest treball en la línia cel·lular MIN6, hem demostrat que la mutació G→A detectada en posició -132 pb del punt d'inici de la transcripció del gen de l'amilina és capaç d'incrementar l'activitat transcripcional del gen, i que l'activitat del promotor de l'amilina està regulada per senyals derivades del metabolisme de la glucosa, del calci, de l'AMPc i dels corticoides. La glucosa a concentracions elevades, l'activador de l'adenil ciclasa forskolina i la dexametasona exercirien un efecte estimulador, mentre que la inhibició de la glicòlisi –mitjançant agents com la mannoheptulosa o la 6-deoxi-D-glucosa- o la disminució de la concentració intracel·lular de calci –mitjançant agents com el verapamil o el diazòxid- donarien lloc a un efecte repressor. Finalment, la construcció mutant reproduceix el mateix patró de resposta que la mutació salvatge en front agents activadors o inhibidors de l'activitat transcripcional del gen de l'amilina, si bé amb valors absoluts d'activitat luciferasa més elevats.

L'activació de la transcripció del gen de l'amilina ha estat reportada en diferents treballs (281, 569). Tal com s'ha comentat prèviament, el factor de transcripció PDX1, que és essencial per la diferenciació del pàncrees, exerceix un paper crític en la regulació de la transcripció dels gens de la insulina i de l'amilina (286-289), actuant en els elements cis de regulació positiva A1 (-91/-84 pb), A2 (-154/-142 pb) i A3 (-172/-163 pb). Un estudi previ ha demostrat que Pax 4, un factor de transcripció que està involucrat en el desenvolupament dels illots pancreàtics i que és essencial per la maduració i diferenciació de les cèl·lules pancreàtiques endocrines (570), actuaria com a repressor transcripcional del promotor dels gens de la insulina i de l'amilina (571). El

seu lloc d'unió al promotor del gen de l'amilina encara no ha estat identificat. Donat el seu efecte repressor, podem hipotetitzar que la regió on està ubicada la mutació G→A podria actuar com lloc d'unió a aquest factor de transcripció, i que el seu efecte repressor podria ser anul·lat per l'efecte d'aquesta mutació, fet que explicaria la detecció d'una activitat transcripcional augmentada. Estudis futurs hauran de determinar quin és el factor de transcripció que, mitjançant la unió a aquest element cis, és el responsable dels efectes objectivats en l'activitat transcripcional del gen de l'amilina.

1. L'estudi dels exons 1, 2 i 3 del gen de l'amilina ha permès la identificació del polimorfisme C79A. L'anàlisi clínic i bioquímic ha mostrat una correlació genotip-fenotip, objectivant que aquest polimorfisme s'associa a concentracions plasmàtiques més baixes de colesterol LDL en pacients amb diabetis tipus 2 i en controls en relació a subjectes no portadors del polimorfisme.
2. L'estudi de la regió promotora del gen de l'amilina ha permès la identificació d'una mutació consistent en el canvi de nucleòtid guanina per citosina (mutació G→A), en posició -132 pb del punt d'inici de la transcripció del gen. Aquesta mutació està ubicada en un domini activador del promotor, sent la freqüència del genotip GA major en pacients amb diabetis tipus 2 que en població control ($p < 0,005$, odds ratio: 6,58). Aquest resultat suggereix que la mutació G→A en la regió promotora del gen de l'amilina podria constituir un potencial candidat en la susceptibilitat genètica que presenta la diabetis tipus 2, dins del context poligènic de la malaltia.
3. L'estudi familiar de pacients portadors de la mutació ha detectat dos subjectes homozigots per la mutació G→A, ambdós amb tolerància oral a la glucosa alterada, i suggereixen que familiars portadors d'aquesta mutació (tant heterozigots com homozigots) presenten un trastorn del patró secretor de l'amilina, mentre que la secreció de la insulina es troba preservada.
4. Estudis *in vitro* en la línia cel·lular β MIN.6 han mostrat que la mutació G→A té un efecte estimulador de l'activitat transcripcional del gen de l'amilina, sent necessària la integritat de l'intró 1 pel manteniment d'una activitat transcripcional específica.

5. L'activació transcripcional del gen de l'amilina està regulada per senyals derivats del metabolisme de la glucosa. Així, la glucosa a concentracions elevades exerceix un efecte estimulador de l'activitat transcripcional, sent capaç la inhibició de la glicòlisi d'anul·lar aquest efecte estimulador.

6. La severa reducció de l'activitat del promotor de l'amilina en presència de verapamil i diazòxid, implica que aquesta regulació per la glucosa requereix –a diferència del gen de la insulina- la integritat de la via de senyalització del calci.

7. La detecció d'una activitat transcripcional del gen de l'amilina augmentada després d'estimulació amb forskolina suggereix la presència d'elements de resposta a l'AMPc (CRE) en el promotor de l'amilina. A més a més, la presència d'aquest efecte estimulador independentment de les concentracions de glucosa en el medi, suggereix que glucosa i forskolina regulen l'activitat transcripcional del gen de l'amilina mitjançant diferents vies de senyalització intracel·lular.

8. La detecció d'una activitat transcripcional augmentada després del cultiu de cèl·lules MIN.6 en presència de dexametasona, suggereix que els corticoides contribuïrien a la regulació transcripcional del gen de l'amilina, presentant un efecte estimulador, a diferència del gen de la insulina, en el qual exerceixen un efecte repressor de l'activitat transcripcional.

1. Castell C., Tresserras R., Serra J., Goday A., Lloveras G., Salleras L. Prevalence of diabetes in Catalonia (Spain): an oral glucose tolerance test-based population study. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 43: 33-40; 1999.
2. Rubin R.J., Dietrich K.A., Hawk A.D. Clinical and economic impact of implementing a comprehensive diabetes management program in managed care. *J.Clin.Endocrinol. Metab.* 83: 2635-2642; 1998.
3. DeFronzo R.A., Bonadonna R.C., Ferranini E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* 15: 318-368; 1992.
4. Winter W.E., Nakamura M., House D.V. Monogenic diabetes mellitus in youth. The MODY syndromes. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 28: 765-785; 1999.
5. Moller D.E., Flier J.S. Insulin resistance: mechanisms, syndromes, and implications. *N. Engl. J. Med.* 325: 938-948; 1991.
6. Van den Ouweland J.M., Lemkes H., Trembath R., Ros R., Velho G., Cohen D., et al. Maternally inherited diabetes and deafness is a distinct subtype of diabetes and associates with a single point mutation in the mitochondrial tRNA^{LEU (UUR)} gene. *Diabetes* 43: 746-751; 1994.
7. Hamman R.F. Genetic and environmental determinants of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Diabetes Metab. Rev.* 8: 287-338; 1992.
8. Kahn C.R. Banting lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* 43: 1066-1084; 1994.
9. Yki-Järvinen H. Role of insulin resistance in the pathogenesis of NIDDM. *Diabetologia* 38: 1378-1388; 1995.
10. Hales C.N., Barker D.J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35: 595-601; 1992.
11. Aitman T.J., Todd J.A. Molecular genetics of diabetes mellitus. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 9: 631-656; 1995.

12. Carey D.G., Jenkins A.B., Campbell L.V., Freund J., Chisholm D.J. Abdominal fat and insulin resistance in normal and overweight women: Direct measurements reveal a strong relationship in subjects at both low and high risk of NIDDM. *Diabetes* 45: 633-638; 1996.
13. Chagnon Y.C., Perusse L., Weisnagel S.J., Rankinen T., Bouchard C. The human obesity map: the 1999 update. *Obes. Res.* 8: 89-117; 2000.
14. Barnett A.H., Eff C., Leslie R.D., Pyke D.A. Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia* 20: 87-93; 1981.
15. Newman B., Selby J.V., King M.C., Slemenda C., Fabsitz R., Friedman G.D. Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia* 30: 763-768; 1987.
16. Mitchell B.D., Kammerer C.M., Reinhart L.J., Stern M.P. NIDDM in Mexican-American families. Heterogeneity by age of onset. *Diabetes Care* 17: 567-573; 1994.
17. McCarthy M.I., Froguel P., Hitman G.A. The genetics of non-insulin-dependent diabetes mellitus: tools and aims. *Diabetologia* 37: 959-968; 1994.
18. Serjeantson S.W., Owerbach D., Zimmet P., Nerup J., Thoma K. Genetics of diabetes in Nauru: effects of foreign admixture, HLA antigens and the insulin-gene-linked polymorphism. *Diabetologia* 25: 13-17; 1983.
19. Poller W., Shatz H. Molecular genetic analysis of NIDDM. Status and prospects. *Exp. Clin. Endocrinol.* 101: 58-68; 1993.
20. Sanz N. Karam J.H., Horita S., Bell G.I. Prevalence of insulin-gene mutation in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 314: 1322-1323; 1986.
21. Permutt M.A., Elbein S.C. Insulin gene in diabetes. Analysis through RFLP. *Diabetes Care* 13: 364-374; 1990.

22. Haneda M., Polonsky K.S., Bergenstal R.M., Jaspan J.B., Shoelson S.E., Blix P.M., et al. Familial hyperinsulinemia due to a structurally abnormal insulin. Definition of an emerging new clinical syndrome. *N. Engl. J. Med.* 310: 1288-1294; 1988.
23. Elbein S.C., Gruppuso P., Schwartz R., Skolnick M., Permut M.A. Hyperproinsulinemia in a family with proposed defect in conversion is linked to the insulin gene. *Diabetes* 34: 821-824; 1985.
24. Gruppuso P.A., Gorden P., Kahn C.R., Cornblath M., Zeller W.P., Schwartz R. Familial hyperproinsulinemia due to a proposed defect in conversion of proinsulin to insulin. *N. Engl. J. Med.* 11: 624-634; 1984.
25. Olansky L., Welling C., Giddings S., Adler S., Bourey R., Dowse G., et al. A variant insulin promoter in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 89: 1596-1602; 1992.
26. Raben N., Barbetti F., Cama A., Lesniak M.A., Lillioja S., Zimmet P., et al. Normal coding sequence of insulin gene in Pima indians and Nauruans, two groups with highest prevalence of type II diabetes. *Diabetes* 40: 118-122; 1991.
27. Elbein S.C., Corsetti L., Goldgar D., Skolnick M., Permut M.A. Insulin gene in familial DIDDM. Lack of linkage in Utah Mormon pedigrees. *Diabetes* 37: 569-576; 1988.
28. Seino S., Seino M., Bell G.I. Human insulin-receptor gene. *Diabetes* 39: 129-133; 1990.
29. Wente S.R., Rosen O.M. Insulin-receptor approaches to studying protein kinase domain. *Diabetes Care* 13: 280-287; 1990.
30. Seino S., Seino M., Nishi S., Bell G.I. Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86: 114-118; 1989.
31. Seino S., Seino M., Bell G.I. Human insulin-receptor gene. Partial sequence and amplification of exons by polymerase chain reaction. *Diabetes* 39: 123-128; 1990.

32. Taylor S.I., Kadowaki T., Kadowaki H., Accili D., Cama A., McKeon C. Mutations in insulin-receptor gene in insulin-resistant patients. *Diabetes Care* 13: 257-279, 1990.
33. Moller D.E., Cohen O., Yamaguchi Y., Assiz R., Grigorescu F., Eberle A., et al. Prevalence of mutations in the insulin receptor gene in subjects with features of the type A syndrome of insulin resistance. *Diabetes* 43: 247-255; 1994.
34. Taylor S.I. Lilly lecture: molecular mechanisms of insulin resistance. Lessons from patients with mutations in the insulin-receptor gene. *Diabetes* 41: 1473-1490; 1992.
35. O'Rahilly S., Woong H., Patel P., Tuner R.C., Flier J.S., Moller D.E. Detection of mutations in insulin-receptor gene in NIDDM patients by analysis of single-stranded conformation polymorphisms. *Diabetes* 40: 777-782; 1991.
36. Holman G.D., Kasuga M. From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport. *Diabetologia* 40: 991-1003; 1997.
37. White M.F. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40: S2-S17; 1997.
38. Araki E., Sun X.J., Haag B.L., Chuang L.M., Zhang Y., Yang-Feng T.L., et al. Human skeletal muscle insulin receptor substrate-1. Characterization of the cDNA, gene, and chromosomal localization. *Diabetes* 42: 1041-1054; 1993.
39. Kelly K.L., Ruderman N.B. Insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase: association with a 185-KDa tyrosine-phosphorylated protein (IRS-1) and localization in a low density membrane vesicle. *J. Biol. Chem.* 268: 4391-4398; 1993.
40. Sun X.J., Rothenberg P., Kahn C.R., Backer J.M., Araki E., Wilden P.A., et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal in transduction protein. *Nature* 352: 73-77; 1991.
41. Tamemoto H., Kadowaki T., Tobe K., Yagi T., Sakura H., Hayakawa T., et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372: 182-186; 1994.

-
42. Almind K., Bjorbaek C., Vestergaard H., Hansen T., Echwald S., Pedersen O. Aminoacid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 342: 828-832; 1993.
 43. Imai Y., Fusco A., Suzuki Y., Lesniak M.A., D'Alfonso R., Sesti G., et al. Variant sequences of insulin receptor substrate-1 in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79: 1655-1658; 1994.
 44. Shimokawa K., Kadowaki H., Sakura H., Otabe S., Hagura R., Kosaka K., et al. Molecular scanning of the glycogen synthase and insulin receptor substrate-1 in Japanese subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202: 463-469; 1994.
 45. Laakso M., Malkki M., Kekalainen P., Kuusisto J., Deeb S.S. Insulin receptor substrate-1 variants in non-insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest.* 94: 1141-1146; 1994.
 46. Celi F.S., Negri C., Tanner K., Raben N., De Pablo F., Rovira A., et al. Molecular scanning for mutations in the insulin receptor substrate-1 gene in mexican americans with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 16: 370-377; 2000.
 47. Vassen L., Wegrzyn W., Klein-Hitpass L. Human insulin receptor substrate-2: gene organization and promoter characterization. *Diabetes* 48: 1877-1880; 1999.
 48. Whitters D.J., Gutierrez J.S., Towery H., Burks D.J., Ren J.M., Previs S., et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391: 900-904; 1998.
 49. Bektas A., Warram J.H., White M.F., Krolewski A.S., Doria A. Exclusion of insulin receptor substrate 2 (IRS-2) as a major locus for early-onset autosomal dominant type 2 diabetes. *Diabetes* 48: 640-642; 1999.
 50. Bernal D., Almind K., Yenush L., Ayoub M., Zhang Y., Rosshani L., et al. Insulin receptor substrate-2 amino acid polymorphisms are not associated with random type 2 diabetes among Caucasians. *Diabetes* 976-979; 1998.

51. Almind K., Fredericksen S.K., Bernal D., Hansen T., Ambye L., Urhammer S., et al. Search for variants of the gene-promoter and the potential phosphotyrosine encoding sequence of the insulin receptor substrate-2: evaluation of their relation with alterations in insulin secretion and insulin sensibility. *Diabetologia* 42: 1244-1249; 1999.
52. Bell G.I., Kayano T., Buse J.B., Burant C.F., Takeda J., Lin D., et al. Molecular biology of mammalian glucose transports. *Diabetes Care* 13: 198-208; 1990.
53. Baroni M.G., Alcolado J.C., Gragnoli C., Franciosi A.M., Cavallo M.G., Fiore V., et al. Affected sib-pairs analysis of the GLUT-1 glucose transport gene locus in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM): evidence for no linkage, *Hum. Genet* 93: 675-680; 1994.
54. Baroni M.G., Alcolado J.C., Pozzilli P., Cavallo M.G., Galton D. Polymorphisms at the Glut-2 (beta-cell/liver) glucose transporter gene and non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM): analysis in affected pedigree members. *Clin. Genet.* 41: 229-234; 1992.
55. Matsubara A., Tanizawa Y., Matsutani A., Kanebo T., Kaku K. Sequence variations of the pancreatic islet/liver glucose transporter (GLUT2) gene in Japanese subjects with noninsulin dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 3131-3135; 1995.
56. Baroni M.G., Oealbaum R.S., Pozzilli P., Stocks J., Li S.R., Fiore V., et al. Polymorphisms at the GLUT1 (HepG2) and GLUT4 (muscle/adipocyte) glucose transporter genes and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Hum. Genet.* 88: 557-561; 1992.
57. Exposito L., Carrera P., Pontiroli A.E., Ferrari M. Failure to detect Glut4-Ile383 and IR-Gln1152 variants in NIDDM (non-insulin dependent diabetes mellitus) and control subjects in an Italian population. *Hum. Genet.* 95: 115-116; 1995.

58. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report on the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 30: 1183-1197; 1997.
59. Velho G., Froguel P. Genetic, metabolic and clinical characteristics of maturity onset diabetes of the young. *Eur. J. Endocrinol.* 138: 233-239; 1998.
60. Yamagata K., Furuta H., Oda N., Kaisaki P.J., Menzel S., Cox N.J., et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY 1). *Nature* 384: 458-460; 1996.
61. Froguel P., Vaxillaire M., Sun F., Velho G., Zouali H., Butel M.O., et al. Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 356:162-164; 1992.
62. Yamagata K., Oda N., Kaisaki P.J., Menzel S., Furuta H., Vaxillaire M., et al. Mutation in the hepatocyte nuclear factor-1 α in maturity-onset diabetes of the young (MODY 3). *Nature* 384: 455-458; 1996.
63. Stoffers D.A., Ferrer J., Clarke W.L., Habener J.F. Early-onset type II diabetes mellitus (MODY 4) linked to IPF1. *Nat. Genet.* 17: 138-139; 1997.
64. Horikawa Y., Iwasaki N., Hara M., Furuta H., Hinokio Y., Cockburn B.N., et al. Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF-2) associated with MODY. *Nat. Genet.* 17: 384-385; 1997.
65. Ledermann H.M. Is maturity onset diabetes at young age (MODY) more common in Europe than previously assumed ?. *Lancet* 6: 583-886; 1997.
66. Froguel P., Zouali H., Vionnet N., Velho G., Vaxillaire M., Sun F., et al. Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *N. Engl J. Med.* 328: 697-702; 1993.

-
67. Velho G., Blanché H., Vallixaire M., Bellanné-Chantelot C., Pardini V.C., Timsit J., et al. Identification of 14 new glucokinase mutations and description of the clinical profile of 42 MODY-2 families. *Diabetologia* 40: 217-224; 1997.
 68. Vaxillaire M., Rouard M., Yamagata K., Oda N., Kaisaki P.J., Boriraj V.V., et al. Identification of nine novel mutations in the hepatocyte nuclear factor 1 alpha gene associated with maturity-onset diabetes of the young (MODY 3). *Hum. Mol. Genet.* 6: 583-586; 1997.
 69. Frayling T.M., Bulamn M.P., Ellard S., Appleton M., Dronsfield M.J., Mackie A.D., et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1-alpha are a common cause of maturity-onset diabetes of the young in the U.K. *Diabetes* 46: 720-725; 1997.
 70. Lehto M., Wipemo C., Ivarsson A.A., Lindgren C., Lipsanen-Nyman M., Weng J., et al. High frequency of mutations in MODY and mitochondrial genes in Scandinavian patients with familial early-onset diabetes. *Diabetologia* 42: 1131-1137; 1999.
 71. Lindner T.H., Cockburn B.N., Bell G.I. Molecular genetics of MODY in Germany. *Diabetologia* 42: 121-123; 1999.
 72. Costa A., Bescós M., Velho G., Chevre G., Vidal J., Sesmilo G., et al. Genetic and clinical characterisation of maturity-onset diabetes of the young in Spanish families. *Eur. J. Endocrinol.* 142: 380-386; 2000.
 73. Bell G.I., Xiang K.S., Newman M.B., Wu S.H., Wright L.G., Fajans S.S., et al. Gene for non-insulin dependent diabetes mellitus (maturity-onset diabetes of the young subtype) is linked to DNA polymorphism on human chromosome 20q. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1484-1488; 1991.
 74. Bulman M.P., Dronsfield M.J., Frayling T., Appleton M., Bain S.C., Ellard S., et al. A missense mutation in the hepatocyte nuclear factor 4 α gene in a UK pedigree with maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia* 40: 859-862; 1997.

-
75. Lindler T., Gragnoli C., Furuta H., Cockburn B.N., Petzold C., Rietzsch H., et al. Hepatic function in a family with a nonsense mutation (R154X) in the hepatocyte nuclear factor-4 α /MODY 1 gene. *J. Clin. Invest.* 100: 1400-1405; 1997.
 76. Moller A.M., Urhammer S.A., Dalgaard L.T., Reneland R., Berglund L., Hansen T., et al. Studies of the genetic variability of the coding region of the hepatocyte nuclear factor-4 α in Caucasian with maturity onset of NIDDM. *Diabetologia* 40: 980-983; 1997.
 77. Furuta H., Iwasaki N., Oda N., Hinokio Y., Horikawa Y., Yamagata K., et al. Organization and partial sequence of the hepatocyte nuclear factor-4 α /MODY 1 gene and identification of a missense mutation, R127W, in a Japanese family with MODY. *Diabetes* 46: 1652-1657; 1997.
 78. Hani E.H., Suaud L., Boutin P., Chèvre J.C., Durand E., Philippi A., et al. A missense mutation in hepatocyte nuclear factor-4 α , resulting in a reduced transactivation activity, in human late-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 101: 521-526; 1998.
 79. Malecki M.T., Yang Y., Antonellis A., Curtis S., Warram J.H., Krolewski A.S. Identification of new mutations in the hepatocyte nuclear factor 4 α gene among families with early onset Type 2 diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 16: 193-200; 1999.
 80. Mengelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schultz G., Umesono K., et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-839; 1995.
 81. Herman W.H., Fajans S.S., Ortiz F.J., Smith M.J., Sturis J., Bell G.I., et al. Abnormal insulin secretion, not insulin resistance, is the genetic or primary defect of MODY in the RW pedigree. *Diabetes* 43: 40-46; 1994.
 82. Hattersley A.T. Maturity-onset diabetes of the young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity. *Diabet. Med.* 15: 15-24; 1998.

-
83. Stoffel M., Froguel P., Takeda J., Zouali H., Vionnet N., Nishi S., et al. Human glucokinase gene: isolation, characterization, and identification of two missense mutations linked to early-onset non-insulin dependent (type 2) diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89: 7698-7702; 1992.
 84. Stoffel M., Patel P., Lo Y.M., Hattersey A.T., Lucassen A.M., Page R., et al. Missense glucokinase mutations in maturity-onset diabetes of the young and mutation screening in late-onset diabetes. *Nat. Genet.* 2: 153-156; 1992.
 85. Katagiri H., Asano T., Ishihara H., Inukai K., Anai M., Miyazaki J., et al. Nonsense mutation of glucokinase gene in late-onset non-insulin dependent diabetes mellitus. *Lancet* 340: 1316-1317; 1992.
 86. Sakura H., Eto K., Kadowaki H., Simokawa K., Ueno H., Koda N., et al. Structure of the human glucokinase gene and identification of a missense mutation in a Japanese patient with early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75: 1571-1573; 1992.
 87. Shimada F., Makino H., Hashimoto N., Taira M., Seino S., Bell G.I., et al. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus associated with a mutation of the glucokinase gene in a Japanese family. *Diabetologia* 36: 433-437; 1993.
 88. Stoffel M., Bell K.L., Blackburn C.L., Powell K.L., Seo T.S., Takeda J., et al. Identification of glucokinase mutations in subjects with gestational diabetes mellitus. *Diabetes* 42: 937-940; 1993.
 89. Saker P.J., Hattersley A.T., Barrow B., Hammersley M.S., McLellan J.A., Lo Y.M., et al. High prevalence of a missense mutation of the glucokinase gene in gestational diabetic patients due to a founder-effect in a local population. *Diabetologia* 11: 1325-1328; 1996.
 90. Terauchi Y., Sakura H., Yasuda H., Iwamoto K., Takahashi N., Ito K., et al. Pancreatic beta-cell-specific targeted disruption of glucokinase gene. *Diabetes*

- mellitus due to defective insulin secretion to glucose. *J. Biol. Chem.* 270: 30253-30256; 1995.
91. Matschinsky F.M. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45: 223-241; 1996.
92. Miller S.P., Anand G.R., Karschnia E.J., Bell G.I., LaPorte D.C., Lange A.J. Characterization of glucokinase mutations associated with maturity onset diabetes of the young type 2 (MODY-2). Different glucokinase defects lead to a common phenotype. *Diabetes* 48: 1645-1655; 1999.
93. Matschinsky F.M., Glaser B., Magnuson M.A. Pancreatic β -cell glucokinase. Closing the gap between theoretical concepts and experimental realities. *Diabetes* 47: 307-315; 1998.
94. Byrne M.M., Sturis J., Clement K., Vionnet N., Pueyo M.E., Stoffel M., et al. Insulin secretory abnormalities in subjects with hyperglycemia due to glucokinase mutations. *J. Clin. Invest.* 93: 1120-1130; 1994.
95. Pueyo M.E., Clement K., Vaxillaire M., Passa P., Froguel P., Robert J.J., et al. Arginine-induced insulin release in glucokinase-deficient subjects. *Diabetes Care* 17: 1015-1021; 1994.
96. Velho G., Petersen K.F., Perseghin G., Hwang J.H., Rothman D.L., Pueyo M.E., et al. Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) subjects. *J. Clin. Invest.* 98: 1755-1761; 1996.
97. Tappy L., Dussoix P., Iynedjian P., Henry S., Schneiter P., Zahnd G., et al. Abnormal regulation of hepatic glucose output in maturity-onset diabetes of the young caused by a specific mutation of the glucokinase gene. *Diabetes* 46: 204-208; 1997.
98. Velho G., Vaxillaire M., Boccio V., Charpentier G., Froguel P. Diabetes complications in NIDDM kindreds linked to the MODY-3 locus on chromosome 12q. *Diabetes Care* 19: 915-919; 1996.

-
99. Ktistaki E., Talianidis I. Modulation of hepatic gene expression by hepatocyte nuclear factor 1. *Science* 277: 109-112; 1997.
 100. Menzel J., Kaisaki P.J., Rjasanowski I., Heinke P., Kerner W., Menzel S. A low renal threshold for glucose in diabetic patients with a mutation in the hepatocyte nuclear factor-1 alpha (HNF-1alpha) gene. *Diabet. Med.* 15: 816-820; 1998.
 101. Pontoglio M., Barra J., Hadehouel M., Doyen A., Kress C., Bach J.P., et al. Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria and renal Fanconi syndrome. *Cell* 84: 575-585; 1996.
 102. Rose R.B., Bayle J.H., Endrizzi J.A., Cronk J.D., Crabtree G.R., Alber T. Structural basis of dimerization, coactivator recognition and MODY 3 mutations in HNF-1 alpha. *Nat. Struct. Biol.* 7: 744-748; 2000.
 103. Godart F., Bellanne-Chantelot C., Clauin S., Gagnoli C., Abderrahmani A., Blanche H., et al. Identification of seven novel nucleotide variants in the hepatocyte nuclear factor-1 alpha (TCF1) promoter region in MODY patients. *Hum. Mutat.* 15: 173-180; 2000.
 104. Jap T.S., Wu Y.C., Chiou J.Y., Kwook C.F. A novel mutation in the hepatocyte nuclear factor-1 alpha/MODY 3 gene on Chinese subjects with early-onset type 2 diabetes mellitus in Taiwan. *Diabet. Med.* 17: 390-393; 2000.
 105. Yoshiuchi I., Yamagata K., Yang Q., Iwahashi H., Okita K., Yamamoto K., et al. Three new mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 α gene in Japanese subjects with diabetes mellitus: clinical features and functional characterization. *Diabetologia* 42: 621-626; 1999.
 106. Hansen T., Eiberg H, Rouard M., Vaxillaire M., Moller A.M., Rasmussen S.K., et al. Novel MODY 3 mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene: evidence for a hyperexcitability of pancreatic beta-cells to intravenous secretagogues in a glucose-tolerant carrier of a P447L mutation. *Diabetes* 46: 726-730; 1997.

-
107. Glucksmann M.A., Lehto M., Tayber O., Scotti S., Berkemeier L., Pulido J.C., et al. Novel mutations and a mutational hotspot in the MODY 3 gene. *Diabetes* 46: 1081-1086; 1997.
 108. Isomaa B., Henricsson M., Lehto M., Forsblom C., Karanko S., Sarelin L., et al. Chronic diabetic complications in patients with MODY3 diabetes. *Diabetologia* 41: 467-473; 1998.
 109. Pearson E.R., Liddell W.G., Shepherd M., Corral R.J., Hattersley A.T. Sensitivity to sulphonylureas in patients with hepatocyte nuclear factor-1alpha gene mutations: evidence for pharmacogenetics in diabetes. *Diabet. Med* 17: 543-545; 2000.
 110. Okita K., Yang Q., Yamagata K., Hangenfeldt K.A., Miyagawa J., Kajimoto Y., et al. insulin gene is a target gene of hepatocyte nuclear factor-1 alpha (HNF-1alpha) and HNF-1beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263: 566-569; 1999.
 111. Wang H., Maechler P., Hagenfeldt K.A., Wollheim C.B. Dominant-negative suppression of HNF-1alpha function results in defective insulin gene transcription and impaired metabolism-secretion coupling in a pancreatic beta-cell line. *EMBO* 17: 6071-6013; 1998.
 112. Pontoglio M., Sreenan S., Roe M., Pugh W., Ostrega D., Doyen A, et al. Defective insulin secretion in hepatocyte nuclear factor-1 α -deficient mice. *J. Clin. Invest.* 101: 2215-2225; 1998.
 113. Vaxillaire M., Abderrahmani A., Boutin P., Bailleul B., Yaniv M., Froguel P., et al. MODY 3 mutations affect transcriptional activity of hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF 1 α). *Diabetologia*41: A108; 1998.
 114. Sander M., German S.M. The beta cell transcription factors and development of the pancreas. *J. Mol. Med.* 75:327-340; 1997.

-
115. 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: 106-110; 1997.
 116. Rey-Campos J., Chouard T., Yaniv M., Cereghini S. HNF-1 β is a homoprotein that activates transcription forms heterodimers with HNF1. *EMBO J.* 10: 1445-1457; 1991.
 117. Woolf A.S. Diabetes, genes, and kidney development. *Kidney Int.* 57: 1202-1203; 2000.
 118. Nishigori H., Yamada S., Kohama T., Tomura H., Sho K., Horikawa Y., et al. Frameshift mutation, A263fsinsGG, in the hepatocyte nuclear factor-1 β associated with diabetes and renal dysfunction. *Diabetes* 47: 1354-1355; 1998.
 119. Weng J.P., Lehto M., Forsblom C., Xiang X., Li H., Groop C. Hepatocyte nuclear factor-1 β (MODY 5) gene mutations in Scandinavian families with early onset diabetes and kidney disease or both. *Diabetologia* 43: 131-134; 2000.
 120. Lindner T.H., Njolstad P.R., Horitawa Y., Bostad L., Bell G.I., Sovik O. A novel syndrome of diabetes mellitus, renal dysfunction and genital malformation associated with a partial deletion of the pseudo-POU domain of hepatocyte nuclear factor-1 β . *Hum. Mol. Genet.* 8: 2001-2008; 1999.
 121. Okita K., Yang Q., Yamagata K., Hangenfeldt K.A., Miyagawa J., Kajimoto Y., et al. Human insulin gene is a target gene of hepatocyte nuclear factor-1 α (HNF-1 α). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263: 566-569; 1999.
 122. Chevre J.C., Hani E.H., Boutin P., Vaxillaire M., Blanche H., Vionnet N., et al. Mutations screening in 18 Caucasian families suggests the existence of other MODY genes. *Diabetologia* 41: 1017-1023; 1998.

123. Doria A., Yang Y., Malecki M., Scotti S., Dreyfus J., O'Keeffe C., et al. Phenotypic characteristics of early-onset autosomal-dominant type 2 diabetes unlinked to known maturity-onset diabetes of the young (MODY) genes. *Diabetes Care* 22: 253-261; 1999.
124. Malecki M.T., Jhala U.S., Antonellis A., Fields L., Doria A., Orban T., et al. Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nat. Genet.* 23: 323-328; 1999.
125. Yoon Y.S., Noma T., Yamashiro Y., Ito H., Nakazawa A. Molecular cloning and characterization of the gene encoding human NeuroD. *Neurosci Lett.* 251: 17-20; 1998.
126. Sharma A., Moore M., Marcora E., Lee J.E., Qiu Y., Samaras S., et al. The NeuroD1/BETA2 sequences essential for insulin gene transcription colocalize with those necessary for neurogenesis and p300/CREB binding protein binding. *Mol. Cell Biol.* 19: 704-713; 1999.
127. Naya F.J., Huang H.P., Qiu H.Y., Mouth H., deMayo F.J., Leiter A.B., et al. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/NeuroD-deficient mice. *Genes Dev.* 11: 2323-2334; 1997.
128. Iwata I., Nagafuchi S., Nakashima H., Kondo S., Koga T., Yokogawa Y., et al. Association of polymorphism in the NeuroD1/BETA2 gene with type 1 diabetes in the Japanese. *Diabetes* 48: 416-419; 1999.
129. Drucker D. Glucagon and the glucagon-like peptides. *Pancreas* 5: 484-488; 1990.
130. Thorens B., Porret A., Buhler L., Deng S.P., Morel P., Widmann C. Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes* 42: 1678-1682; 1993.

131. Tanizawa Y., Riggs A.C., Elbein S.C., Whelan A., Donis-Keller H., Permutt M.A. Human glucagon-like peptide-1 receptor gene in NIDDM. Identification and use of simple sequence repeat polymorphisms in genetic analysis. *Diabetes* 43: 752-757; 1994.
132. Vionnet N., Hani E.H., Lesage S., Philippi A., Hager J., Varret M., et al. Genetics of NIDDM in France: studies with 19 candidates genes in affected sib pairs. *Diabetes* 46: 1062-1068; 1997.
133. Burcelin R., Katz E.B., Charron M.J. Molecular and cellular aspects of the glucagon receptor: role in diabetes and metabolism. *Diabetes Metab.* 22: 373-396; 1996.
134. Hager J., Hansen L., Vaisse C., Vionnet N., Philippi A., Poller W., et al. A missense mutation in the glucagon receptor gene is associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nat. Genet.* 9: 299-304; 1995.
135. Tanolo G., Melis M.G., Ciccarese M., Secchi G., Atzeni M.M., Maioli M., et al. The Sardinian Diabetes Genetic Study Group. Physiological and genetic characterization of the Gly40Ser mutation in the glucagon receptor gene in the Sardinian population. *Diabetologia* 40: 89-94; 1997.
136. Yoshida H., Ohagi S., Sanke T., Furuta H., Furuta M., Nanjo K. Association of the prohormone convertase 2 gene (PCK2) on chromosome 20 with NIDDM in Japanese subjects. *Diabetes* 44: 389-393; 1995.
137. Schalin-Jääntti C., Härkönen M., Groop L.C. Impaired activation of glycogen synthase in people at increased risk for developing NIDDM. *Diabetes* 41: 598-604; 1992.
138. Vionnet N., Bell G.I. identification of a simple tandem repeat DNA polymorphism in the human glycogen synthase gene and linkage to five markers on chromosome 19q. *Diabetes* 42: 930-932; 1993.

139. Karlsson O., Thor S., Norberg T., Ohlsson H., Edlund T. Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of protein containing both a homeo- and a cys-his domain. *Nature* 344: 879-882; 1990.
140. Tanizawa Y., Riggs A.C., Dagogo-Jack S., Vaxillaire M., Froguel P., Liu L., et al. Isolation of the human LIM/homeodomain gene Islet-1 and identification of a simple sequence repeat polymorphism. *Diabetes* 43: 935-941; 1994.
141. Shimomura H., Sanke T., Hanabusa T., Tsunoda K., Furuta H., Nanjo K. Nonsense mutation of islet-1 gene (Q310X) found in a type 2 diabetic patient with a strong family history. *Diabetes* 49: 1597-1600; 2000.
142. Eto K., Tsubamoto Y., Terauchi Y., Sugiyama T., Kishimoto T., Takahashi N., et al. Role of NADH shuttle system in glucose-induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion. *Science* 283: 981-985; 1999.
143. Rasschaert J., Malaisse-Lagae F., Sener A., Leclercq-Meyer V., Herberg L., Malaisse W.J. Impaired FAD-glycerophosphate dehydrogenase activity in islets and liver homogenates of fa/fa rats. *Mol. Cel. Bioch.* 135: 137-141; 1994.
144. Sener A., Anak Ö, Leclercq-Meyer V., Herberg L., Malaisse W.J. FAD-glycerophosphate dehydrogenase activity in pancreatic islets and liver of ob/ob mice. *Bioch. Mol. Biol. Inter.* 30: 397-402; 1993.
145. Sener A., Herberg L., Malaisse W.J. FAD-linked glycerophosphate dehydrogenase deficiency in pancreatic islet of mice with hereditary diabetes. *FEBS Lett.* 316: 224-227; 1993.
146. Fernández-Alvarez J., Conget I., Rasschaert J., Sener A., Gomis R., et al. Enzymatic, metabolic and secretory patterns in human islets of type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 37: 177-181; 1994.

147. Vidal J., Rasschaert J., Sener A., Gomis R., Malaisse W.J. FAD-glycerophosphate dehydrogenase activity in lymphocytes of type 2 diabetic patients and their relatives. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 31: 17-25; 1996.
148. Matsutani A., Takeuchi Y., Ishitara H., Kuyano S., Oka Y. Molecular cloning of human mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase gene: genomic structure, chromosomal localization, and existence of a pseudogene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223: 481-486; 1996.
149. Ferrer J., Aoki M. Behn P., Nestorowicz A., Riggs A., Permut A.A. Mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase. Cloning of an alternatively spliced human islet-cell cDNA, tissue distribution, physical mapping, and identification of a polymorphic genetic marker. *Diabetes* 45: 262-266; 1996.
150. Takeuchi Y., Matsutani A., Oka Y. Detection of variants in the mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase gene in Japanese NIDDM patients. *Diabetologia* 40: 339-343; 1997.
151. MacDonald M.J., Brown L.J., Hasan N.M., Stoffel M., Dills D.G. Single-stranded conformational polymorphism analysis of the mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase gene in NIDDM. *Diabetes* 46: 1660-1661; 1997.
152. Novials A., Vidal J., Franco C., Ribera F., Sener A., Malaisse W.J., et al. Mutation in the calcium-binding domain in the mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase gene in a family of diabetic subjects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231: 570-572; 1997.
153. Schon E.A., Bonilla E., Di Mauro S. Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *J. Bioenerg. Biomembr.* 29: 131-149; 1997.
154. Johns D.R. The other human genome: Mitochondrial DNA and disease. *Nat. Med.* 2:1065-1068; 1996.
155. Johns D.R. Mitochondrial DNA and disease. *N.Engl.J.Med.* 333: 638-644, 1995.

-
156. J.C. Alcolado, R. Alcolado. Importance of maternal history of non-insulin dependent diabetic patients. *Br. Med. J.* 302: 1178-1180; 1991.
157. Brown M.D., Wallace D.C. Molecular basis of mitochondrial disease. *J.Bioenerg. Biomembr.* 26: 273-289; 1994.
158. Quade A., Zierz S., Klingmuller D. Endocrine abnormalities in mitochondrial myopathy with external ophthalmoplegia. *Clin. Invest* 70:396-402; 1992.
159. Poulton J., O'Rahilly S., Morten K.J., Clark A. Mitochondrial DNA, diabetes and pancreatic pathology in Kearns-Sayre syndrome. *Diabetologia* 38: 868-871; 1995.
160. Rötig A., Cormier V., Blanche S., Bonnefont J.P. Pearson's marrow-pancreas syndrom: A multisystem mitochondrial disorder in infancy. *J.Clin.Invest* 86: 1601-1608; 1990.
161. Remes A., Majamaa K., Herva R., Hassinen I.E. Adult-onset diabetes mellitus and neurosensory hearing loss in maternal relatives of MELAS patients in a family with the tRNA^{Leu (UUR)} mutation. *Neurology* 43: 1015-1020; 1993.
162. Silvestri G., Ciafaloni E., Santorelli F.M., Shanske S., Servidei S., Graf W.D, et al. Clinical features associated with the A→G transition at nucleotide 8344 of mtDNA ("MERFF mutation"). *Neurology* 43: 1200-1206; 1993.
163. Sherratt E.J., Thomas A.W., Alcolado J.C. Mitochondrial DNA defects: a widening clinical spectrum of disorders. *Clin. Sci.* 92: 225-235; 1997.
164. Morten K.J., Cooper J.M., Brown G.K., Lake B.D., Pike D., Poulton J. A new point mutation associated with mitochondrial encephalomyopathy. *Hum. Mol. Genet.* 2: 2081-2087; 1993.
165. Zeviani M., Gellera C., Antozzi C., Rimoldi M., Morandi L., Villani F., et al. Maternally inherited myopathy and cardiomyopathy: association with mutation in mitochondrial tRNA^{Leu (UUR)}. *Lancet*: 338: 143-147; 1991.

-
166. Silvestri G., Moraes C.T., Shanske S., Oh S.J., Di Mauro S. A new mtDNA mutation in the RNA (Lys) gene associated with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERFF). *Am. J. Hum. Genet.* 51: 1213-1217; 1992.
167. Suzuki Y., Suzuki S., Hinokio Y., Chiba M., Atsumi Y., Hosokawa K., et al. Diabetes associated with a novel 3264 mitochondrial tRNA^{Leu (UUR)} mutation. *Diabetes Care* 20: 1138-1140; 1997.
168. Suzuki Y., Tsukuda K., Atsumi Y., Goto Y., Hosokawa K., Asahina T., et al. Clinical picture of a case of diabetes mellitus with mitochondrial tRNA mutation at position 3271. *Diabetes Care* 19: 1304-1305; 1996.
169. Van der Ouweland J.M., Lemkes H.H., Ruitenbeek W., Sandkuijl L.A., de Vijlder M.F., et al. Mutation in mitochondrial tRNA^{LEU (UUR)} gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus with deafness. *Nat. Genet.* 1: 368-371; 1992.
170. Reardon W., Ross R., Sweeney M., Luxon L., Pembrey M., Harding A.E., et al. Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *Lancet* 340: 1376-1379; 1992.
171. Maassen J.A., Kadowaki T. Maternally inherited diabetes and deafness: a new diabetes subtype. *Diabetologia* 39: 375-382; 1996.
172. King M.P., Koga Y., Davidson M., Schon E.A. Defects in mitochondrial protein synthesis and respiratory chain activity segregate with the tRNA^{Leu (UUR)} mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes. *Mol. Cell. Biol.* 12: 480-490; 1992.
173. Gerbitz K.D., Gempel K., Brdiczka D. Mitochondria and Diabetes. Genetic, biochemical, and clinical implications of the cellular energy circuit. *Diabetes* 45: 113-126; 1996.

174. Ballinger S.W., Shoffner J.M., Hedaya E.V., Trounce I., Polak M.A., Koontz D.A., et al. Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 Kb mitochondrial DNA deletion. *Nat. Genet.* 1: 11-15; 1992.
175. Ballinger S. W., Shoffner J., Gebhart S., Koontz D., Wallace D.C. Mitochondrial diabetes revisited. *Nat. Genet.* 7: 458-459; 1994.
176. King M.P., Koga Y., Davidson M., Schon E.A. Defects in mitochondrial protein synthesis and respiratory chain activity segregate with the tRNA^{Leu (UUR)} mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes. *Mol. Cell. Biol.* 12: 480-490; 1992.
177. Rajan A.S., Aguilar-Bryan L., Nelson D.A., Yaney G.C., Hsu W.H., Kunze D.L., et al. Ion channels and insulin secretion. *Diabetes Care* 13: 340-363; 1990.
178. Gebhart S., Shoffner J., Koontz D., Kaufman A., Wallace D. Insulin resistance associated with maternally inherited diabetes and deafness. *Metabolism* 45: 526-531; 1996.
179. Kanmor A., Tanaka K., Umezawa S. Insulin resistance in mitochondrial gene mutation. *Diabetes Care* 17: 778-779; 1994.
180. Kadowaki T., Kadowaki H., Mori Y., Tobe K., Sakuta R., Suzuki Y., et al. A subtype of diabetes associated with a mutation of mitochondrial DNA. *New. Engl. J. Med.* 330: 962-968; 1994.
181. Gerbitz K.D., van den Ouweland J.M., Maassen A., Jaksch M. Mitochondrial diabetes mellitus: a review. *Biochim.Biophys. Acta* 1271: 253-260; 1995.
182. Hart L.M., Lemkes H.H., Heine R.J., Stolk R.P., Feskens E., Jansen J., et al. Prevalence of maternally inherited diabetes and deafness in diabetic populations in the Netherlands. *Diabetologia* 37: 1169-1170; 1994.

183. Otabe S., Sakura H., Shimokawa K., Mori Y., Kadowaki H., Yasuda K., et al. The high prevalence of the diabetic patients with a mutation in the mitochondrial gene in Japan. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 79: 768-771; 1997.
184. Lee H.C., Song Y.D., Li H., Park J., Suh H.C., Lee E., et al. Mitochondrial gene transfer ribonucleic acid (tRNA)^{Leu (UUR)} 3243 and tRNA^{Lys} 8344 mutations and diabetes mellitus in Korea. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 82: 372-374; 1997.
185. Suzuki S., Hinokio Y., Hirai S., Onoda M., Matsumoto M., Ohtomo M., et al. Pancreatic beta-cell secretory defect associated with mitochondrial point mutation of the tRNA^{Leu (UUR)} gene: a study in seven families with mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). *Diabetologia* 37: 818-825; 1994.
186. Wollheim C.B. Beta-cell mitochondria in the regulation of insulin secretion: a new culprit in Type II diabetes. *Diabetologia* 43: 265-277; 2000.
187. Odawara M., Yamashita K. Mitochondrial gene abnormalities and α - and β -cell dysfunction. *Diabetes Care* 19: 1166-1167; 1996.
188. Kishimoto M., Hashiramoto M., Araki S., Ishida Y., Kazumi T., Kanda F., et al. Diabetes mellitus carrying a mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu (UUR)} gene. *Diabetologia* 38; 193-200; 1995.
189. Oka Y., Katagiri H., Yazaki Y, Murase T., Kobayashi T. Mitochondrial gene mutation in islet-cell-antibody-positive patients who were initially non-insulin-dependent diabetics. *Lancet* 342; 527-528; 1993.
190. Kobayashi T., Oka Y., Katagiri H., Falorni A., Kasuga A., Takei I., et al. Association between HLA and islet cell antibodies in diabetic patients with a mitochondrial DNA mutation at base pair 3243. *Diabetologia* 39: 1196-1200; 1996.

191. Fukui M., Nakano H., Obayashi H., Kitagawa Y., Nakamura N., Mori H., et al. High prevalence of mitochondrial diabetes mellitus in Japanese patients with major risk factors. *Metabolism* 46: 793-795; 1997.
192. Suzuki Y., Goto Y., Taniyama M., Nonaka I., Murakami N., Hosokawa K., et al. Muscle histopathology in diabetes mellitus associated with mitochondrial tRNA^{Leu} (UUR) mutation at position 3243. *J. Neurol.Sci.* 145: 49-53; 1997.
193. Suzuki S., Hinokio M., Ohtomo M., Hirai M., Chiba M., Kasuga S., et al. The effects of coenzyme Q₁₀ treatment on maternally inherited diabetes mellitus and deafness, and mitochondrial DNA 3243 (A to G) mutation. *Diabetologia* 41: 584-588; 1998.
194. Tawata M., Hayashi J.I., Isobe K, Ohkubo E., Ohtaka M., Chen J., et al. A new mitochondrial DNA mutation at 14577 T/C is probably a major pathogenic mutation for maternally inherited type 2 diabetes. *Diabetes* 49: 1269-1272; 2000.
195. Strosberg A.D. Association of β 3-adrenoreceptor polymorphism with obesity and diabetes: current status. *Trends Pharmacol. Sci.* 18: 449-454; 1997.
196. Walston J., Silver K., Bogardus C., Knowler W.C., Celi F.S., Austin S., et al. Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the β 3-adrenergic-receptor gene. *N. Engl. J. Med.* 333: 343-347; 1995.
197. Widen E., Lehto M., Kanninen T., Walston J., Shuldiner A.R., Groop L.C. Association of a polymorphism in the β 3-adrenergic-receptor gene with features of the insulin resistance syndrom in Finns. *N. Engl. J. Med.* 333: 348-351; 1995.
198. Kawamura T., Egusa G., Okubo M., Imazu M., Yamakido M. Association of β 3-adrenergic-receptor gene polymorphism with insulin resistance in Japanese-American men. *Metabolism* 48: 1367-1370; 1999.

-
199. Clement K., Vaisse C., Manning B.S., Basdevant A., Guy-Grand B., Ruiz J., et al. Genetic variation in the β 3-adrenergic-receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *N. Engl. J. Med.* 333: 352-354; 1995.
 200. Sakane N., Yoshida T., Yoshioka K., Nakamura Y., Umekawa T., Kogure A., et al. β 3-adrenoreceptor gene polymorphism: a newly identified risk factor for proliferative retinopathy in NIDDM patients. *Diabetes* 46: 1633-1636; 1997.
 201. Sakane N., Yoshida T., Yoshioka K., Nakamura Y., Umekawa T., Kogure A., et al. Trp64Arg mutation of β 3-adrenoreceptor gene is associated with diabetic nephropathy in type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 41: 1533-1534; 1998.
 202. Mooser V., Malillard A., Bonny C., Steinmann M., Shaw P., Yarnall D.P., et al. Genomic organization, fine-mapping and expression of the human Islet-brain 1 (IB1)/c-Jun-aminoterminal kinase interacting protein-1 (JIP-1). *Genomics* 55: 202-208; 1999.
 203. Bonny C., Nicod P., Waeber G. IB1, a JIP-1-related nuclear protein present in insulin-secreting cells. *J. Biol. Chem.* 273: 1843-1846; 1998.
 204. Henderson E., Stein R. C-jun inhibits transcriptional activation by insulin enhancer, and the insulin control element is the target of control. *Mol. Cell. Biol.* 14: 655-662; 1994.
 205. Bonny C., Thompson N., Nicod P., Waeber G. Pancreatic-specific expression of the glucose transporter type 2 gene. Identification of cis-elements and islet-specific trans-acting factors. *Mol. Endocrinol.* 9: 1413-1426; 1995.
 206. Waeber G., Delplanque J., Bonny C., Mooser V., Steinmann M., Widmann C., et al. The gene MAPK8Ip1, encoding Islet-brain-1 is a candidate for type 2 diabetes. *Nat. Genet.* 24: 291-295; 2000.

207. Tontonoz P., Hu E., Spiegelman B.M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79: 1147-1156; 1994.
208. Lehmann J.M., Moore L.M., Smith-Oliver T.A., Wilkison W.O., Willson T.M., Kliewer S.A. An antidiabetic thiazolidione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *J. Biol. Chem.* 270: 12953-12956; 1995.
209. Spiegelman B.M. PPAR γ : adipogenic and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 47: 504-514; 1998.
210. Beamer B.A., Negri C., Yen C.J., Gavrilova O., Rumberger J.M., Durcan M.J., et al. Chromosomal localization and partial genomic structure of the human peroxisome proliferator activated receptor- γ (hPPAR γ) gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233: 756-759; 1997.
211. Elbrecht A. Chen Y., Cullinan C.A., Hayes N., Leibowitz M., Moller D.D., et al. Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptor γ 1 and γ 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224: 431-437; 1996.
212. Vidal-Puig A.J., Considine R.V., Jiménez-Linan M., Werman A., Pories W.J., Caro J.F., et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J. Clin. Invest.* 99: 2416-2422; 1997.
213. Deeb S.S., Fajas L., Nemoto M., Pihlajamaki J., Mykkanen L., Kuusisto J., et al. A Pro12Ala substitution in PPAR γ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet.* 20: 284-287; 1998.
214. Altshuler D., Hirschhorn J.N., Klannemark M., Loindgren C.M., Vohl M.C., Nemesh J., et al. The common PPAR γ Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat. Genet.* 26: 76-80; 2000.

215. Barroso I., Gurnell M., Crowley V.E., Agostini M., Schwabe J.W., Soos M.A., et al. Dominant negative mutations in human PPAR γ associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402: 880-883; 1999.
216. Reynet C., Kahn C.R. Rad: a member of the Ras family overexpressed in muscle of type II diabetic humans. *Science* 262: 1441-1444; 1993.
217. Yuan X., Yamada K., Ishimaya-Shigemoto S., Koyama W., Nonaka K. Analysis of trinucleotide-repeat combination polymorphism at the rad gene in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 48: 173-175; 1999.
218. Doria A., Caldwell J.S., Ji L., Reynet C., Rich S.S., Weremowicz S., Morton C.C., et al. Trinucleotide repeats at the rad locus. Allele distributions in NIDDM and mapping to a 3-cM region on chromosome 16q. *Diabetes* 44: 243-247; 1995.
219. Aguilar-Bryan L., Clement J.P, Gonzalez G., Kunjilwar K., Babenko A., Bryan J. Towards understanding the assembly and structure of K_{ATP} channels. *Physiol. Rev.* 78: 227-245; 1998.
220. Shyng S.L., Ferrigni T., Shepard J. B., Nestorowics A., Glase B., Permutt M.A., et al. Functional analyses of novel mutations in the sulphonylurea receptor 1 associated with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Diabetes* 47: 1145-1151; 1998.
221. Lindner T., Gragnoli C., Schulze J., Rietzsch H., Petzold C., Schröder H.E., et al. The 31-cM region of chromosome 11 including the obesity gene Tubbby and ATP-sensitive potassium channel genes, SUR1 and Kir6.2, does not contain a major susceptibility locus for NIDDM in 127 non-Hispanic white affected sibships. *Diabetes* 46: 1227-1229; 1997.
222. Ohta Y., Tanizawa Y., Inoue H., Hosaka T., Ueda K., Matsutani A., et al. Identification and functional analysis of sulfonylurea receptor 1 variants in Japanese patients with NIDDM. *Diabetes* 47: 476-481; 1998.

-
223. Horikawa Y., Naoshisa O., Cox N.J., Li X., Orho-Melander M., Hara M., Hinokio Y., et al. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature Genet.* 26: 163-175; 2000.
224. Sakagashira S, Sanke T, Hanabusa T, Shimomura H, Ohagi S, KY Kumagaye, et al. Missense mutation of amylin gene (S20G) in Japanese NIDDM patients. *Diabetes* 45:1279-1281, 1996.
225. Chuang L-M, Lee K-C, Huang CN, Wu HP; Tai T-Y, Lin BJ. Role of S20G mutation of amylin gene in insulin secretion, insulin sensitivity, and Type II diabetes mellitus in Taiwanese patients. *Diabetologia* 41: 1250-1251, 1998.
226. Nishi M, Bell GI, Steiner DF. Islet amyloid polypeptide (amylin): no evidence of an abnormal precursor sequence in 25 Type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 33: 628-630, 1990.
227. Cook JTE, Patel PP, Clark A, Höppener JWM, Lips CJM, Mosselman S, et al. Non-linkage of the islet amyloid polypeptide gene with Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 34: 103-108, 1991.
228. Birch CL, Fagan LJ, Armstrong MJ, Turnbull DM, Walker M. The S20G islet-associated polypeptide gene mutation in familial NIDDM. *Diabetologia* 40: 1113, 1997.
229. Opie E.L. The relation of diabetes mellitus to lesions of the pancreas: hyaline degeneration of the islands of Langerhans. *J.Exp.Med.* 5:527-540; 1901.
230. Westermark P., Wernstedt C., Wilander E., Sletten K. A novel peptide in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140: 827-831; 1986.
231. Westermark P., Wernstedt C., Wilander E., Hayden D.W., O'Brien T.D., Johnson K.H. Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat

- are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 84: 3881-3885; 1987.
232. Cooper G.J.S., Willis A.C., Clark A., Turner R.C., Sim R.B., Reid K.B.M. Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 8628-8632; 1987.
233. Serpell L.C., Sunde M., Benson M.D., Tennent G.A., Pepys M.B., Fraser P.E. The protofilament substructure of amyloid fibrils. J. Mol. Biol. 300: 1033-1039; 2000.
234. Glenner G.G. Amyloid deposits and amyloidosis: the beta-fibrilloses. N. Engl. J. Med. 302:1283-1292; 1980.
235. Sunde M., Serpell L.C., Bartlam M., Fraser P.E., Pepys M.B., Blake C. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. J. Mol. Biol. 273: 729-739; 1997.
236. Hutchinson W.L. Hohenester E., Pepys M.B. Human serum amyloid P component is a single uncomplexed pentamer in whole serum. Mol Med 6: 482-493; 2000.
237. Pepys M.B., Booth D.R., Hutchinson W.L., Gallimore G.R., Collins P.M., Hohenester E. Amyloid P component: a critical review. Amyloid 4: 274-295; 1997.
238. Botto M., Hawkins P.N., Bickerstaff M.C., Herbert J., Bygrave A.E., McBride A., et al. Amyloid deposition is delayed in mice with targeted deletion of the serum amyloid P component gene. Nat. Med. 3: 855-859; 1997.
239. Falk R.H., Comenzo R.L., Skinner M. The systemic amyloidoses. N. Engl. J. Med. : 337, 898-909; 1997.
240. Gillmore J.D., Hawkins P.N., Pepys M.B. Amyloidosis: a review of recent diagnostic and therapeutic developments. Br. J. Haematol. 99: 245-256, 1997.
241. Kisilevski R., Fraser P.E. A β amyloidogenesis: unique, or variation on a systemic theme?. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol 32: 361-404; 1997.

242. Glenner G.G., Wong C.W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 120: 885-890, 1984.
243. El-Naggar A.K., Ordoñez N.G., McLemore D., Schultz P., Hickey R.C., Samaan N. Clinicopathologic and flow cytometric DNA study of medullary thyroid carcinoma. *Surgery* 108: 981-981; 1990.
244. McGeer P.L., Akiyama H., Itagaki S., McGeer E.G. Immune system response in Alzheimer's disease. *Can. J. Neurol. Sci.* 16: 516-527; 1989.
245. Charge S.B., Esiri M.M., Bethune C.A., Hansen B.C., Clark A. Apolipoprotein E is associated with islet amyloid and other amyloidoses: implications for Alzheimer's disease. *J. Pathol.* 179: 443-447; 1996.
246. Kahn S.E., Andrikopoulos S., Verchere C.B. Islet amyloid: a long-recognized but underappreciated pathological feature of type 2 diabetes. *Diabetes*; 48: 241-253; 1999.
247. Young I.D., Ailles L., Narindrasorasak S., Tan R., Kisilevsky R. Localization of the basement membrane heparan sulfate proteoglycan in islet amyloid deposits in type II diabetes mellitus. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 116: 951-954; 1992.
248. Ferrannini E. Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr. Rev.* 19: 477-490; 1998.
249. Kahn S.E. The importance of the β -cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Med.* 108 Suppl 6a: 2S-8S, 2000.
250. Kahn B.B. Type 2 diabetes: when insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. *Cell* 92: 593-596; 1998.
251. Clark A., Wells C.A., Buley I.D., Cruickshank J.K., Vanhegan R.I., Matthews D.R., et al. Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis:

- quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res* 9: 151-159; 1988.
252. Westermark P. Quantitative studies on amyloid in the islets of Langerhans. *Ups. J. Med. Sci.* 77: 91-94; 1970.
253. Clark A., Saad M.F., Nezzar T., Uren C., Knowler W.C., Bennett P.H., et al. Islet amyloid polypeptide in diabetic and non-diabetic pima Indians. *Diabetologia* 33: 285-289; 1990.
254. Davidson M.B. The effect of aging on carbohydrate metabolism: a review of the English literature and a practical approach to the diagnosis of diabetes mellitus in the elderly. *Metabolism* 28: 687-705; 1979.
255. Westermark P. Amyloid and polypeptide hormones: what is their relationship?. *Amyloid* 1: 47-60; 1997.
256. Westermark P. Wernstedt C., O'Brien T.D., Hayden D.W., Johnson K.H. Islet amyloid in type 2 human diabetes mellitus and adult diabetic cats contains a novel putative polypeptide hormone. *Am. J. Pathol.* 127: 414-417; 1987.
257. Howard C.F. Longitudinal studies on the development of diabetes in individual *Macaca nigra*. *Diabetologia* 29: 301-306; 1986.
258. O'Brien T.D., Butler A.E., Roche P.C., Johnson K.H., Butler P.C. Islet amyloid polypeptide in human insulinomas. Evidence for intracellular amyloidogenesis. *Diabetes* 43: 329-336; 1994.
259. Williams A.J., Coates P.J., Lowe D.G., McLean C., Gale E.A. Immunochemical investigation of insulinomas for islet amyloid polypeptide and insulin: evidence for differential synthesis and storage. *Histopathology* 21: 215-223; 1992.
260. Nishi M., Sanke T., Nagamatsu S., Bell G.I., Steiner D.F. Islet amyloid polypeptide: a new β -cell secretory product related to islet amyloid deposits. *J. Biol. Chem.* 265: 4173-4176; 1990.

-
261. Clark A., Edwards C.A., Ostle L.R., Sutton R., Rothbard J.B., Morris J.F., et al. Localisation of islet amyloid polypeptide in lipofuscin bodies and secretory granules of human B-cells and in islets of type 2 diabetic subjects. *Cell Tissue Res.* 257: 179-201; 1989.
262. Kahn S.E., D'Alessio D.A., Schwartz M.W., Fujimoto W.Y., Ensink J.W., Taborsky G.J. Jr., et al. Evidence of cosecretion of islet amyloid polypeptide and insulin by beta-cells. *Diabetes* 39: 634-638; 1990.
263. Butler P.C., Chou J., Carter W.B., Wang Y.N., Bu B.H., Chang D., et al. Effects of meal ingestion on plasma amylin concentration in NIDDM and nondiabetic humans. *Diabetes* 39: 752-756; 1990.
264. Hartter E., Svoboda T., Ludvik B., Schuller M., Lell B., Kuenburg E., et al. Basal and stimulated plasma levels of pancreatic amylin indicate its co-secretion with insulin in humans. *Diabetologia* 34: 52-54; 1991.
265. Cooper G.J.S. Amylin compared with calcitonin gene-related peptide. Structure, biology, and relevance to metabolic disease. *Endocr. Rev.* 15 163-201, 1994.
266. Cooper G.J.S., Leighton B., Willis A.C., Day A.J. The amylin superfamily: a novel grouping of biologically active polypeptides related to the insulin A-chain. *Prog. Growth Factor Res.* 1: 99-105; 1989.
267. Dayhoff M.O., Barker W.C., Hunt L.C. Establishing homologies in protein sequences. *Methods Enzymol.* 91: 524-545; 1983.
268. Sanke T., Bell G.I., Sample C., Rubenstein A.H., Steiner D.F. An islet amyloid peptide derived from a 89-amino acid precursor by proteolytic processing. *J. Biol. Chem.* 263: 17243-17246; 1988.
269. Lukinius A., Wilander E., Westermark G.T., Engström U. and Westermark P. Co-localization of islet amyloid polypeptide in the B cell secretory granules of the human pancreatic islet. *Diabetologia* 32: 240-244; 1989.

-
270. Bailyes E.M., Shennan K.I., Seal A.J., Smeekens S.P., Steiner D.F., Hutto J.C., et al. A member of the eukaryotic subtilisin family (PC3) has the enzymic properties of the type 1 proinsulin-converting endopeptidase. *Biochem. J.* 285: 391-394; 1992.
271. Badman M.K., Shennan K.I., Jermany J.L., Docherty K., Clark A. Processing of pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP) by the prohormone convertase PC2. *FEBS Lett.* 378: 227-231; 1996.
272. Roder M.E., Porte D., Schwartz R.S., Kahn S.E. Disproportionately elevated proinsulin levels reflect the degree of impaired B cell secretory capacity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 604-608; 1998.
273. Wareham N.J., Byrne C.D., Williams R., Day N.E., Hales C.N. Fasting proinsulin concentrations predict the development of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22: 262-270; 1999.
274. Higham C.E., Hull R.L., Lawrie L., Shennan K.I., Morris J.F., Birch N.P., et al. Processing of synthetic pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP) "amylin" by recombinant prohormone convertase enzymes, PC2 and PC3, in vitro. *Eur. J. Biochem.* 267: 4998-5004; 2000.
275. Mosselman S., Höppener J. W.M., Zandberg J., van Mansfeld A.D.M., Geurts van Kessel A.H.M., et al. Islet amyloid polypeptide: identification and chromosomal localization of the human gene. *FEBS Lett.* 239: 227-232; 1988.
276. Nishi M., Sanke T., Seino S., Eddy R.L., Fan Y.S., Byers M.G., et al. Human islet amyloid polypeptide gene: complete nucleotide sequence, chromosomal localization, and evolutionary history. *Mol. Endocrinol.* 3: 1775-1781; 1989.
277. Hoovers J.M.N., Redeker E., Speleman F., Höppener J.W.M., Bholá S., Bliék J., et al. High-resolution chromosomal localization of the human calcitonin/CGRP/IAPP gene family. *Genomics* 15: 525-529; 1993.

-
278. Mosselman S., Höppener J.W.M., Lips C.J.M., Jansz H.S. The complete islet amyloid polypeptide precursor is encoded by two exons. *FEBS Lett.* 267: 160-166; 1990.
279. Höppener J.W.M., Oosterwijk C., Visser-Vernooy H.J., Lips C.J.M., Jansz H.S. Characterization of the human islet amyloid polypeptide/amylin gene transcripts: identification of a new polyadenylation site. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 189: 1569-1577, 1992.
280. Christmanson L., Rorsman F., Stenman G., Westermark P., Betsholtz C. The human islet amyloid polypeptide (IAPP) gene. Organization, chromosomal localization and functional identification of a promoter region. *FEBS Letters* 267; 160-166; 1990
281. Carty M.D., Lillquist J.S., Peshavaria M., Stein R., Soeller W.C. Identification of cis- and trans-active factors regulating human islet amyloid polypeptide gene expression in pancreatic β -cells. *J. Biol. Chem.* 272: 11986-11993; 1997.
282. Mosselman S., Höppener J.W.M., de Wit L., Soeller W., Lips C.J.M., Jansz H.S. IAPP/amylin gene transcriptional control region: evidence for negative regulation. *FEBS Letts.* 271: 33-36; 1990.
283. German M.S., Moss L.G., Wang J., Rutter W.J. The insulin and islet amyloid polypeptide genes contain similar cell-specific promoter elements that bind identical beta-cell nuclear complexes. *Mol. Cell Biol.* 12: 1778-1788; 1992.
284. Ekawa K., Nishi M., Ohagi S., Sanke T., Nanjo K. Cloning of mouse islet amyloid polypeptide gene and characterization of its promoter. *J. Mol. Endocrinol.* 19:79-86; 1997.
285. Watada H., Kajimoto Y., Kaneto H, Matsuoka T., Fujitani Y., Miyazaki J., et al. Involvement of the homeodomain-containing transcription factor PDX-1 in islet amyloid polypeptide gene transcription. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 229. 746-751; 1996.

-
286. Jonsson J., Carlsson L., Edlund T., Edlund H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371: 606-609; 1994.
287. Bretherton-Watt D., Gore N., Boam D.S. Insulin upstream factor 1 and a novel ubiquitous factor bind to the human islet amyloid polypeptide/amylin gene promoter. *Biochem. J.* 313: 495-502; 1996.
288. Petersen H.V., Serup P., Leonard J., Michelsen B.K., Madsen O.D. Transcriptional regulation of the human insulin gene is dependent on the homeodomain protein STF1/IPF1 acting through the CT boxes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 10465-10469; 1994.
289. Edlund H. Transcribing pancreas. *Diabetes* 47: 1817-1823; 1998.
290. Ahlgren U., Jonsson J., Jonsson L., Simu K., Edlund H. Beta-cell specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset of diabetes. *Genes Dev.* 12: 1763-1768; 1998.
291. Melloul D., Ben-Neriah Y., Cerasi E. Glucose modulates the binding of an islet-specific factor to a conserved sequence within the rat I and the human insulin promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 3865-3869; 1993.
292. Petersen H.V., Peshavaria M., Pedersen A.A., Philippe J., Stein R., Madsen O.D., et al. Glucose stimulates the activation domain potential of the PDX-1 homeodomain transcription factor. *FEBS Lett.* 43: 362-366; 1998.
293. MacFarlane W.M., McKinnon C.M., Felton-Edkins Z.A., Cragg H., James R.F., Docherty K. Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* 274: 1011-1016; 1999.
294. MacFarlane W.M., Smith S.B., James R.F., Clifton A.D., Doza Y.N., Cohen P., et al. The p38/reactivating kinase mitogen-activated protein Kinase cascade mediates the activation of the transcription factor insulin upstream factor 1 and insulin gene

- transcription by high glucose in pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* 272: 20936-20944; 1997.
295. Karlsson O., Edlund T., Moss J.B., Rutter W.J., Walker M.D. A mutational analysis of the insulin gene transcription control region: expression in beta cells is dependent on two related sequences within the enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 8819-8823; 1987.
296. Vierra C.A., Nelson C. The Pan Basic helix-loop-helix proteins are required for insulin gene expression. *Mol. Endocrinol.* 9: 64-71; 1995.
297. Denijn M., De Weger R.A., van Mansfeld A.D.M., van Unik J.A.M., Lips C.J.M. Islet amyloid polypeptide (IAPP) is synthesized in the islets of Langerhans. Detection of IAPP polypeptide and IAPP mRNA by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *Histochemistry* 97: 33-37; 1992.
298. Rindi G., Terenghi G., Westermark G., Westermark P., Moscoso G., Polak J.M. Islet amyloid polypeptide in proliferating pancreatic B cells during development, hyperplasia and neoplasia in humans and mice. *Am. J. Pathol.* 138: 1321-1334; 1991.
299. Madsen O., Nielsen J.H., Michelsen B., Westermark P., Betsholtz C., Nishi M., et al. Islet amyloid polypeptide and insulin expression are controlled differentially in primary and transformed islet cells. *Mol. Endocrinol.* 5: 143-148; 1991
300. De Vroede M., Foriers A., van de Winkel M., Madsen O., Pipeleers D. Presence of islet amyloid polypeptide in rat islet B and D cells determines parallelism and dissociation between rat pancreatic islet amyloid polypeptide and insulin content. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182: 886-893; 1992.
301. De krijger R.R., Kranenburg G., Stevens M., Rahier J.R.D., Bruining G.J. The presence of islet amyloid polypeptide during the development. *Diabetologia* 34, A43; 1991.

302. Clark A., Lloyd J., Novials A., Hutton J.C., Morris J.F. Localisation of islet amyloid polypeptide and its carboxy terminal flanking peptide in islets of diabetic man and monkey. *Diabetologia* 34: 449-451; 1991.
303. Westermark G., Christmansson I., Terenghi G., Permeth J., Betsholtz C., Larsson J., et al. Islet amyloid polypeptide: demonstration of mRNA in human pancreatic islets by in situ hybridization in islets with and without amyloid deposits. *Diabetologia* 36: 323-328; 1993.
304. Johson K.H., O'Brien T.D., Jordan K., Westermark P. Impaired glucose tolerance is associated with increased islet amyloid polypeptide (IAPP) immunoreactivity in pancreatic beta cells. *Am. J. Pathol.* 135: 245-250; 1989.
305. Höppener J.W.M., Verbeek J.S., de Koning E.J.P., Oosterwijk C., van Hulst K.L., Visser-Vernooy H.J., et al. Chronic overproduction of islet amyloid polypeptide/amylin in transgenic mice: lysosomal localization of human islet amyloid polypeptide and lack of marked hyperglycaemia or hyperinsulinaemia. *Diabetologia* 36: 1258-1265; 1993.
306. Schnell A.H., Borg L.A.H. Lysosomes and pancreatic islet function. Glucose-dependent alterations of lysosomal morphology. *Cell Tiss. Res.* 239: 537-545; 1985.
307. Wilander E. Diagnostic pathology of gastrointestinal and pancreatic neuroendocrine tumours. *Acta Oncol.* 28: 363-369; 1989.
308. Stridsberg M. The use of chromogranin, synaptophysin and islet amyloid polypeptide as markers for neuroendocrine tumours. *Ups. J. Med. Sci.* 100: 169-199; 1995.
309. Bretherton-Watt D., Gathe M.A., Bloom S.E., Williams S., Bloom S.R. Islet amyloid polypeptide-like immunoreactivity in human tissue and endocrine tumours. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76: 1072-1074; 1993.

310. Stridsberg M., Eriksson B., Lundqvist G., Skogseid B., Wilander E., Oberg K. Islet amyloid polypeptide (IAPP) in patients with neuroendocrine tumours. *Regul. Pept.* 55: 119-131; 1995.
311. O'Brien T.D., Westermark P., Johnson K.H. Islet amyloid polypeptide and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in amyloid and tumour cells of canine pancreatic endocrine tumours. *Vet Pathol.* 27: 194-198; 1990.
312. Nicholl C.G., Bhatavdekar J.M., Mak J., Girgis S.I., Legon S. Extra-pancreatic expression of the rat islet amyloid polypeptide (amylin) gene. *J. Mol. Endocrinol.* 9: 157-163; 1992.
313. Toshimori H., Narita R., Nakazato M., Asai J., Mitsukawa T., Kangawa K., et al. Islet amyloid polypeptide (IAPP) in the gastrointestinal tract and pancreas of human and rat. *Cell Tissue Res.* 262: 401-406; 1990.
314. Miyazato M., Nakazato M., Shiomi K., Aburaya Y., Toshimori H., Kangawa K., et al. Identification and characterization of islet amyloid polypeptide in gastrointestinal tract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 293-300; 1991.
315. Ferrier G.J., Pierson A.M., Jones P.M., Bloom S.R., Girgis S.I., Legon S. Expression of the rat amylin (IAPP/DAP) gene. *J. Mol. Endocrinol.* 3: R1-R4; 1989.
316. O'Brien T.D., Westermark P., Johnson K.H. Islet amyloid polypeptide and insulin secretion from isolated perfused pancreas of fed, fasted, glucose-treated, and dexamethasone-treated rats. *Diabetes* 40: 1701-1706, 1991.
317. Inoue K. Hisatomi A., Umeda F., Nawata H. Release of amylin from perfused rat pancreas in response to glucose, arginine, beta hydroxybutirate and gliclazide. *Diabetes* 40: 1005-1009; 1991.
318. Stridsberg M., Sandler S., Wilander E. Cosecretion of islet amyloid polypeptide (IAPP) and insulin from isolated rat pancreatic islets following stimulation or inhibition of β cell function. *Regul. Pept.* 45: 363-370; 1993.

319. Moore C.X., Cooper G.J.S. Co-secretion of amylin and insulin from cultured islet β cells: modulation by nutrient secretagogues, islet hormones and hypoglycaemic agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 1-9; 1991.
320. Gedulin B., Cooper G.J.S., Young A.A. Amylin secretion from the perfused pancreas: dissociation from insulin and abnormal elevation in insulin-resistant diabetic rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180: 782-789; 1991.
321. Novials A., Y. Sarri, Casamitjana R., Rivera F., Gomis R. Regulation of islet amyloid polypeptide in human pancreatic islets. *Diabetes* 42: 1514-1519; 1993.
322. Nakazato M., Miyazato M., Asay J., Mitsukawa T., Kangawa K., Matsuo H., et al. Islet amyloid polypeptide, a novel pancreatic peptide, is a circulating hormone secreted under glucose stimulation. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 169: 713-718; 1990.
323. Mitsukawa T., Takemura J., Asai J., Nakazato M., Nagawa T., Matsuo H., et al. Islet amyloid polypeptide response to glucose, insulin and somatostatin analogue administration. *Diabetes* 39: 639-642; 1990.
324. Ludvik B., Kautzky-Willer A., Prager R., Thomaseth K., Pacini G. Amylin: history and overview. *Diabet. Med* 14: S9-S13; 1997.
325. Van Jaarsveld B.C., Hackeng W.H.L., Lips C.J.M., Erkelens D.W. Plasma concentrations of islet amyloid polypeptide after glucagon administration in type 2 diabetic patients and non-diabetic subjects. *Diabetic Med.* 10: 327-330; 1993.
326. Blackard W.G., Clore J.N., Kellum J.M. Amylin/insulin secretory ratios in morbidly obese man: inverse relationship with glucose disappearance rate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78: 1257-1260, 1994.
327. Enoki S., Mitsukawa T., Takemura J., Nakazato M., Aburaya J., Toshimori H., et al. Plasma islet amyloid polypeptide levels in obesity, impaired glucose tolerance and

- non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 15: 97-102; 1992.
328. Kautzky-Willer A., Thomaseth K., Pacini G., Clodi M., Ludvik B., Strelci C., et al. Role of islet amyloid polypeptide secretion in insulin-resistant humans. *Diabetologia* 37: 188-194; 1994.
329. Sanke T., Hanabusa T., Nakano Y., Oki C., Okai K., Nishimura S., et al. Plasma islet amyloid polypeptide (amylin) levels and their responses to oral glucose in Type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 34: 129-132; 1991.
330. Kahn S.E., Verchere C.B., Andrikopoulos S., Asberry P.J., Leonetti D.L., Wahl P., et al. Reduced amylin release is a characteristic of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes in Japanese Americans. *Diabetes* 47: 640-645; 1998.
331. Rachman J., Payne M.J., Levy J.C., Barrow B.A., Holman R., Turner R.C. Changes in amylin and amylin-like peptide concentrations and β -cell function in response to sulfonylurea or insulin therapy in NIDDM. *Diabetes Care* 21: 810-816; 1998.
332. Ludvik B., Lell B., Hartter E., Schnack C., Prager R. Decrease of stimulated amylin release precedes impairment of insulin secretion in type II diabetes. *Diabetologia* 40: 1615-1619; 1991.
333. Thomaseth K., Pacini G., Clodi M., Kautzky-Willer A., Nolan J.J., Prager R., et al. Amylin release during oral glucose tolerance test. *Diabet. Med.* 14: S29-S34; 1997.
334. Clodi M., Thomaseth K., Pacini G., Hermann K., Kautsky-Willer A., Waldhäusl W., et al. Distribution and kinetics of amylin in humans. *Am. J. Physiol* 274: E903-908, 1998.
335. Dechenes C.J., Verchere C.B., Andrikopoulos S., Kahn S.E. Human aging is associated with parallel reductions in insulin and amylin release. *Am. J. Physiol.* 275: E785-791; 1998.

-
336. Kahn S.E., Larson V.G., Schwartz R.S., Beard J.C., Cain K.C., Fellingham G.W., et al. Exercise training delineates the importance of B-cell dysfunction to the glucose intolerance of human aging. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74: 1336-1342; 1992.
337. Watschinger B, Hartter E., Traindt O., Pohanka E., Pidlich J., KovariK J. Increased levels of plasma amylin in advanced renal failure. *Clin Nephrol.* 37: 131-134; 1992.
338. Ludvik B., Clodi M., Kautzky-Willer A., Schuller M., Graf H., Hartter E., et al. Increased levels of circulating islet amyloid polypeptide in patients with chronic renal failure have no effect on insulin secretion. *J. Clin. Invest.* 94: 2045-2050; 1994.
339. Wareham N.J., Swinn R., Fineman M., Koda J., Taylor K., Williams D., et al. Gestational diabetes mellitus is associated with an increase in the total concentration of amylin molecules. *Diabetes Care*; 21: 668; 1998.
340. Kautzky-Willer A., Thomaseth K., Ludvik B., Nowotny P., Rabensteiner D., Waldhäusl W., et al. Elevated islet amyloid pancreatic polypeptide and proinsulin in lean gestational diabetes. *Diabetes* 46: 607-614; 1997.
341. Semenkovich C.F., Heinecke J.W. The mystery of diabetes and atherosclerosis. Time for a new plot. *Diabetes* 46: 327-334; 1997.
342. Davignon J., Cohn J.S., Mabile L., Bernier L. Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies. *Clin. Chim. Acta* 286: 115-143; 1999.
343. Dallongeville J., Lussier-Cacan S., Davignon J. Modulation of plasma trygliceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. *J. Lipid Res.* 33: 447-457; 1992.
344. Yamaguchi H., Ishiguro K., Sugihara S., Nakazato Y., Kawarabayashi T., Sun X., et al. Presence of apolipoprotein E on extracellular neurofibrillary tangles and on meningeal blood vessels precedes the Alzheimer beta-amyloid deposition. *Acta Neuropathol.* 88: 413-419; 1994.
345. Rubinsztein D.C., Easton D.F. Apolipoprotein E genetic variation and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 10: 199-209; 1999.

-
346. Gertrude H., Ottman R., Tang M., Marder K., Stern Y., Tycko B., et al. Influence of APOE genotype on familial aggregation of AD in an urban population. *Neurology* 53: 789-794; 1999.
347. Verchere C.B., Andrikopoulos S., D'Alessio D.A., O'Brien K.D., Wight T.N., Snow A.D., et al. Role of apolipoprotein E and perlecan in islet amyloid formation in transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Diabetes* 47: A30; 1998.
348. Pitas R.E., Boyles J.K., Lee S.H., Foss D., Mahley R.W. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 917: 148-161; 1987.
349. Basu S.K., Ho Y.K., Brown M.S., Bilheimer D.W., Anderson R.G., Goldstein J.L. Biochemical and genetic studies of the apoprotein E secreted by mouse macrophages and human monocytes. *J. Biol. Chem.* 257: 9788-9795.
350. Ma J., Yee A., Brewer H.B., Das S., Potter H. Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments. *Nature* 372: 92-94; 1994.
351. Wisniewski T., Castaño E.M., Golabek A., Vigel T., Frangione B. Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *Am. J. Pathol.* 145: 1030-1035; 1994.
352. Sanan D.A., Weisgraver K.H., Russell S.J., Mahley R.W., Huang D., Saunders A., et al. Apolipoprotein E associates with beta amyloid peptide of Alzheimer's disease to form novel monofibrils: isoform E4 associates more efficiently than apoE3. *J. Clin. Invest.* 94: 860-869; 1994.
353. Bales K. R., Verina T., Dodel R.C., Du Y., Altschiel L., Bender M., et al. Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat. Genet.* 17: 263-264; 1997.

-
354. Powell D.S., Maksoud H., Hattersley A.T., Chargé S.B.P., Matthews D.R., Levy J.C., et al. Apolipoprotein E genotype is not associated with islet amyloid as assessed by disease severity in type 2 diabetes. *Diabetologia* 42: A146; 1999.
355. Vidal J., Verchere C.B., Andrikopoulos S., Hull R.L., Wang F., Kahn S.E. Apolipoprotein E is not required for amyloid deposition in a transgenic mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes* 49: 951-P; 2000.
356. Kjellen L., Lindahl U. Proteoglycans structures and interactions. *Annu Rev. Biochem.* 60: 443-475; 1991.
357. Su J.H., Cummings B.J., Citman C.W. Localization of heparan sulfate glycosaminoglycan and proteoglycan core protein in aged brain and Alzheimer's disease. *Neuroscience* 51: 801-813; 1992.
358. Snow A.D., Mar H., Nochlin D., Sekiguchi R.T., Kimata K., Kioke Y., et al. Early accumulation of heparan sulfate in neurons and in the beta-amyloid protein-containing lesions of Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Am. J. Pathol.* 137: 1253-1270; 1990.
359. Snow A.D., Wight T.N., Nochlin D., Kolke Y., Kimata K., DeArmond S.J., et al. Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of Gerstmann-Straussler syndrome, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie. *Lab Invest.* 63: 601-611; 1990.
360. Snow A.D., Sekiguchi R., Nochlin D., Fraser P.E., Kimata K., Mizutani A., et al. An important role of heparan sulfate proteoglycan (Perlecan) in a model system for the deposition and persistence of fibrillar A beta-amyloid in rat brain. *Neuron.* 12: 219-234; 1994.
361. Castillo G.M., Lukito W., Wight T.N., Snow A.D. The sulfate moiety of glycosaminoglycans are critical for the enhancement of beta-amyloid protein fibril formation. *J. Neurochem.* 72: 1681-1687; 1999.

-
362. Gupta-Bansal R., Frederickson R.C., Brunden K.R. Proteoglycan-mediated inhibition of A beta proteolysis. A potential cause of senile plaque accumulation. *J. Biol. Chem.* 270: 18666-18671; 1995.
363. Castillo G.M., Cummings J.A., Yang W., Judge M.E., Sheardown M.J., Rimvall K., et al. Sulfate content and specific glycosaminoglycan backbone of perlecan are critical for perlecan's enhancement of islet amyloid polypeptide (amylin) fibril formation. *Diabetes* 47: 612-620, 1998.
364. Li P., Bellows A.B., Thompson J.N. Molecular basis of iduronate-2-sulfatase gene mutations in patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *J. Med. Genet.* 36: 21-27; 1999.
365. Lagerstedt K., Carlberg B.M., Karimi-Nejad R., Kleijer W.J., Bondenson M.L. Analysis of a 43.6 Kb deletion in a patient with Hunter syndrome (MPSII): identification of a fusion transcript including sequences from the gene *W* and the *IDS* gene. *Hum. Mutat.* 15: 324-331; 2000.
366. Francesco C.D, Cracco C., Tomain R. In vitro correction of IDS deficiency by adenovirus-mediated gene transfer. *Gene therapy* 4: 442-448; 1997.
367. Ohagi S., Nishi M., Bell G.I., Ensinnck J.W., Steiner D.F. Sequences of islet amyloid polypeptide precursors of an old world monkey, the pig-tailed macaque *Macaca nemestrina* and the dog *Canis familiaris*. *Diabetologia* 34: 355-358; 1991.
368. Jordan K., Murtaugh M.P., O'Brien T.D., Westermark P., Betsholtz C., Johnson K.H. Canine IAPP cDNA sequence provides important clues regarding diabetogenesis and amyloidogenesis in type 2 diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169: 502-508; 1990.
369. Betsholtz C., Christmanson L., Engström U., Rorsman F., Jordan K., O'Brien T.D., et al. Structure of cat islet amyloid polypeptide and identification of amino acid residues of potential significance for islet amyloid formation. *Diabetes* 39: 118-122; 1990.

370. Nishi M., Bell G.I., Steiner D.F. Sequence of a cDNA encoding Syrian hamster islet amyloid polypeptide precursor. *Nucleic Acids Res.* 18: 6726; 1990.
371. Johnson K.H., Wernstedt C., O'Brien T.D., Westermark P. Amyloid in the pancreatic islets of the cougar *Felis concolor* is derived from islet amyloid polypeptide IAPP. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 98: 115-119; 1991.
372. Nishi M., Chau S.J., Nagamatsu S., Bell G.I., Steiner D.F. Conservation of the sequence of islet amyloid polypeptide in five mammals is consistent with its putative role as an islet hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5738-5742; 1989.
373. Leffert J.D., Newgard C.B., Okamoto H., Milburn J.L., Luskey K.L. Rat amylin: cloning and tissue-specific expression in pancreatic islets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3127-3130; 1989.
374. Westermark P., Engstrom U., Johnson K.H., Westermark G.T., Betsholtz C. Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 13: 5036-5040; 1990.
375. Fernandez-Madrid I., Levy E., Marder K., Frangione B. Codon 618 variant of Alzheimer amyloid gene associated with inherited cerebral hemorrhage. *Ann Neurol* 30: 730-733; 1991.
376. Martin J.B. Molecular basis of neurodegenerative disorders. *N. Engl. J. Med.* 340: 1970-1980; 1999.
377. O'Brien T.D., Rizza R.A., Carney J.A., Butler P.C. Islet amyloidosis in a patient with chronic massive insulin resistance due to antiinsulin receptor antibodies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79: 290-292; 1994.
378. Ludvik B, Berzlanovich A., Hartter E., Lell B., Prager R., Graf H. Increased amylin levels in patients on chronic haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 8: 694-695; 1990.

-
379. Clark A. Islet amyloid: An enigma of type 2 diabetes. *Diabetes Metab. Rev.* 8: 117-132; 1992.
380. Foulis A.K., Stewart J.A. The pancreas in recent onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: insulin content of islets, insulinitis and associated changes in the exocrine acinar tissue. *Diabetologia* 26: 456-467; 1984.
381. Clark A., Holman R.R., Matthews D.R., Hockaday T.D.R., Turner R.C. Non-uniform distribution of islet amyloid in the pancreas of maturity-onset diabetic patients. *Diabetologia* 27: 527-528; 1984.
382. Clark A. Islet amyloid and type 2 diabetes. *Diabet. Med.* 561-567; 1987.
383. O'Brien T.D., Butler P.C., Kreutter D.K., Kane L.A., Eberhardt N.L. Human islet amyloid polypeptide expression in COS-1 cells. A model of intracellular amyloidogenesis. *Am. J. Pathol.* 147: 609-616; 1995.
384. Yagui K., Yamaguchi T., Kanatsuka A., Shimada F., Huang C.I., Tokuyama Y., et al. Formation of islet amyloid fibrils in beta-secretory granules of transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide/ amylin. *Eur. J. Endocrinol.* 132: 487-496, 1995.
385. MacArthur D.L., de Koning E.J., Verbeek J.S, Morris J.F., Clark A. Amyloid fibril formation is progressive and correlates with beta-cell secretion in transgenic mouse isolated islets. *Diabetologia* 42: 1219-1227; 1999.
386. De Koning E.J., Morris E.R., Hofhuis F.M., Posthuma G., Hoppener J.W., Morris J.F., et al. Intra- and extracellular amyloid fibrils are formed in cultured pancreatic islets of transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8467-8471, 1994.
387. Clark A., de Koning E.J.P., Hattersley A.T., Hansen B.C., Yajnik C.S., Pulton J. Pancreatic pathology in non-insulin dependent diabetes (NIDDM). *Diabetes Res. Clin. Pract.* 28 (Suppl): S39-S47; 1995.

-
388. O'Brien T.D., Hayden D.W., Johnson K.H., Fletcher T.F. Immunohistochemical morphometry of pancreatic endocrine cells in diabetic normoglycaemic glucose-intolerant and normal cats. *J. Comp. Pathol.* 96: 357-369; 1986.
389. De Koning E.J.P., Clark A., Bodkin N., Hansen B.C. Correlation of islet amyloid, reduced beta-cell function in diabetic monkeys. *Diabetologia* 36: 378-384; 1993.
390. Howard C.F. Insular amyloidosis and diabetes mellitus in *Macaca nigra*. *Diabetes* 27: 35-364; 1978.
391. Fox N., Schrementi J., Nishi M., Ohagi S., Chan S.J., Heisserman J.A., et al. Human islet amyloid polypeptide transgenic mice as a model of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *FEBS Lett.* 323: 40-44; 1993.
392. Verchere C.B., D'Alessio D.A., Palmiter R.D., Weir G.C., Booner-Weir S., Baskin D.G., Kahn S.E. Islet amyloid formation associated with hyperglycemia in transgenic mice with pancreatic beta cell expression of human islet amyloid polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 3492-3496; 1996.
393. D'Alessio D.A., Verchere C.B., Kahn S.E., Hoagland V., Baskin D.G., Palmiter R.D., et al. Pancreatic expression and secretion of human islet amyloid polypeptide in a transgenic mouse. *Diabetes* 43: 1457-1461; 1994.
394. Janson J., Soeller W.C., Roche P.C., Nelson R.T., Torchia A.J., Kreutter D.K., et al. Spontaneous diabetes mellitus in transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 7283-7288; 1996.
395. Höppener J.W.M., Oosterwijk C., Nieuwenhuis M.G., Posthuma G., Thijssen J.H., Vroom T.M., et al. Extensive islet amyloid formation is induced by development of Type II diabetes mellitus and contributes to its progression: pathogenesis of diabetes in a mouse model. *Diabetologia* 42: 427-434, 1999.
396. Van Hulst K.L., Oosterwijk C., Born W., Vroom T.M., Nieuwenhuis M.G., Blankenstein M.A., et al. Islet amyloid polypeptide/amylin messenger RNA and

- protein expression in human insulinomas in relation to amyloid formation. *Eur. J. Endocrinol.* 140: 69-78; 1999.
397. Höppener J.W.M., Ahrén B., Lips C.J.M. Islet amyloid and type 2 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 343: 411-419; 2000.
398. Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432; 1995.
399. Soeller W.C., Janson J., Hart S.E., Parker J.C., Carty M.D., Stevenson R.W., et al. Islet amyloid-associated diabetes in obese A^{vy/a} mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Diabetes* 47: 743-750; 1998.
400. Duhl D.M., Vrieling H., Miller K.A., Wolff G.L. Barsh G.S. Neomorphic agouti mutations in obese yellow mice. *Nat. Genet.* 8: 59-65; 1994.
401. Couce M., Kane L.A., O'Brien T.D., Charlesworth J., Soeller W., McNeish J., et al. Treatment with growth hormone and dexamethasone in mice transgenic for human islet amyloid polypeptide causes islet amyloidosis and beta-cell dysfunction. *Diabetes* 45: 1094-1101; 1996.
402. Kapurniotu A. Bernhagen J., Greenfield N., Al-Abed Y., Teichberg S., Frank R.W., et al. Contribution of advanced glycosylation to the amyloidogenicity of islet amyloid polypeptide. *Eur. J. Biochem.* 251: 208-216; 1998.
403. Halban P.A., Irminger J.C. Sorting and processing of secretory proteins. *Biochem. J.* 299: 1-18; 1994.
404. Mulder H., Ahren B., Sundler F. Islet amyloid polypeptide and insulin gene expression are regulated in parallel by glucose in vivo rats. *Am. J. Physiol.* 271: E1008-E1014; 1996.

405. Nagamatsu S., Nishi M., Steiner D.F. Effects of islet amyloid polypeptide (IAPP) on insulin biosynthesis or secretion in rat islets and mouse beta TC3 cells: biosynthesis of IAPP in mouse beta TC3 cells. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 15: 49-55; 1992
406. Khan S.E., Verchere C.B., D'Alessio D.A., Cook D.L., Fujimoto W.Y. Evidence for selective release of rodent islet amyloid polypeptide through the constitutive secretory pathway. *Diabetologia* 36: 570-573; 1993.
407. Porte D., Kahn S.E. Hyperproinsulinemia and amyloid in NIDDM: clues to etiology of islet β -cell dysfunction. *Diabetes* 38: 1333-1336, 1989.
408. Kahn S.E., Verchere C.B., D'Alessio D. A., Cook D.L., Fujimoto W.Y. Evidence for selective release of rodent islet amyloid polypeptide through the constitutive secretory pathway. *Diabetologia* 36: 570-573; 1993.
409. Davis S.N., Piatti P.M., Monti L., Brown M.D., Branch W., Hales C.N., et al. Proinsulin and insulin concentrations following intravenous glucose challenges in normal, obese, and non-insulin-dependent diabetic subjects. *Metabolism* 42: 30-35; 1993.
410. Kahn S.E., Halban P.A. Release of incompletely processed proinsulin is the cause of the disproportionate proinsulinemia in NIDDM. *Diabetes* 46: 1725-1732; 1998.
411. Stridsberg M., Wilander E., Oberg K., Lundqvist G., Eiksson B. Islet amyloid polypeptide-producing pancreatic islet cell tumor. A clinical and biochemical characterization. *Scand. J. Gastroenterol.* 27: 381-387; 1992.
412. Westermark P., Engstrom U., Westermark G.T., Johnson K.H., Permeth J., Betsholtz C. Islet amyloid polypeptide (IAPP) and pro-IAPP immunoreactivity in human islets of Langerhans. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 7: 219-226; 1989.
413. Nagamatsu S., Nishi M., Steiner D.F. Biosynthesis of islet amyloid polypeptide. Elevated expression in mouse beta TC3 cells. *J. Biol. Chem.* 266: 13737-13741; 1991.

-
414. Tsunehara C.H., Leonetti D.L., Fujimoto W.Y. Diet of second-generation Japanese-American man with and without non-insulin-dependent diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.* 52: 731-738; 1990.
415. Unger R.H. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM: genetic and clinical implications. *Diabetes* 44: 863-870; 1995.
416. Shimabukuro M., Zhou Y.T., Levi M., Unger R.H. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2498-2502; 1998.
417. Furukawa H., Carroll R., Steiner D.F. Long term elevation of free fatty acids leads to delayed processing of proinsulin and prohormone convertases 2 and 3 in the pancreatic beta cell line MIN6. *Diabetes* 47: A262; 1996.
418. Srivastava R.A. regulation of the apolipoprotein E by dietary lipids occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Mol. Cell. Biochem.* 155: 153-162; 1996.
419. Driscoll D.M., Mazzone T., Matsushima T., Getz G.S. Apoprotein E biosynthesis in the cholesterol-fed guinea pig. *Arteriosclerosis* 10: 31-39; 1990.
420. Röcken C., Linke R.P., Saeger W. Immunohistology of islet amyloid polypeptide in diabetes mellitus: semi-quantitative studies in a post-mortem series. *Virchows Arch.* 421: 339-344; 1992.

Lorenzo A., Razzaboni B., Weir G.C., Yankner B.A. Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature* 368: 756-760; 1994.

Janciauskiene S., Ahren B. Different sensitivity to the cytotoxic action of the IAPP fibrils in two insulin-producing cell lines, HIT-T15 and RINm5F cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251: 888-893; 1998.

Janciauskiene S., Ahren B. Fibrillar islet amyloid polypeptide differentially affects oxidative mechanisms and lipoprotein uptake in correlation with cytotoxicity in two insulin-producing cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267: 619-625; 2000.

Zhang S., Liu J., Saafi E.L., Cooper G.J. Induction of apoptosis by human amylin in RINm5F islet beta-cells is associated with enhanced expression of p53 and p21WAF1/C1P1. *FEBS Lett.* 455: 315-320; 1999.

Hiddinga H.J., Eberhardt N.L. Intracellular amyloidogenesis by human islet amyloid polypeptide induces apoptosis in COS-1 cells. *Am J Pathol* 154: 1077-1088, 1999.

- Mirzabekov T.A., Lin M.C., Kagan B.L. Pore formation by the cytotoxic islet amyloid peptide amylin. *J. Biol. Chem.* 271: 1988-1992; 1996.
- Kawahara M., Kuroda Y., Arispe N., Rojas E. Alzheimer's beta-amyloid, human islet amylin, and prion protein fragment evoke intracellular free calcium elevations by a common mechanism in a hypothalamic GnRH neuronal cell line. *J. Biol. Chem.* 275: 14077-14083; 2000.
- Bai J.Z., Saafi E.L., Zhang S., Cooper G.J.S. Role of Ca²⁺ in apoptosis evoked by human amylin in pancreatic islet (β -cells. *Biochem. J.* 343: 53-61; 1999.
- McLean L.R., Balasubramaniam A. Promotion of beta-structure by interaction of diabetes associated polypeptide (amylin) with phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys Acta* 1122: 317-320, 1992.
- Janson J., Ashley R.H., Harrison D., McIntyre S., Butler P.C. The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles. *Diabetes* 48: 491-498; 1999.
- Westermarck G., Westermarck P., Eizirik D.L., Hellerström C., Fox N., Steiner D.F., et al. Differences in amyloid deposition in islets of transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide versus human islets implanted into nude mice. *Metabolism* 48: 448-454; 1999.
- Morley J.E., Flood J.F. Amylin decreases food intake in mice. *Peptides* 12: 865-869; 1991.
- Chance W.T., Balasubramanian A., Zhang F.S., Wimalawansa S.J., Fisher J.E. Anorexia following the intrahypothalamic administration of amylin. *Brain Res.* 539: 352-354; 1991.
- Balasubramanian A., Renugopalakrishnan V., Stein M., Fisher J.E., Chance W.T. Syntheses, structures, and anorectic effects of human and rat amylin. *Peptides* 12: 919-924; 1991.
- MacIntyre I. Amylinamide, bone conservation, and pancreatic (β -cells. *Lancet* 2: 1026-1027; 1989.
- Zaidi M., Datta H.K., Bevis P.J.R., Wimalawansa S.J., MacIntyre I. Amylin-amide: a new bone-conserving peptide from the pancreas. *Exp. Physiol.* 75:529-536; 1990.
- MacIntyre I. The calcitonin peptide family: relationship and mode of action. *Bone Miner.* 16: 160-161; 1992.
- Brain S.D., Wimalawansa S., MacIntyre I., Williams T.J. The demonstration of vasodilator activity of pancreatic amylin amide in the rat. *Am. J. Pathol.* 136: 487-490; 1990.
- Cooper G.J.S., Leighton B., Dimitriadis G.D., Parry-Billings M., Kowalchuk J.W., Howland K., et al. Amylin found in amyloid deposits in human type 2 diabetes mellitus may be a hormone that regulates glycogen metabolism in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7763-7766; 1988.
- Leighton B., Cooper G.J.S. Pancreatic amylin and calcitonin causes resistance to insulin in skeletal muscle *in vitro*. *Nature* 335: 632-635; 1988.
- Frontoni S., Choi S.B., Banduch D., Rossetti L. *In vivo* insulin resistance induced by amylin primarily through inhibition of insulin-stimulated glycogen synthesis in skeletal muscle. *Diabetes* 40: 568-573; 1991.
- Molina J.M., Cooper G.J.S., Leighton B., Olefsky J.M. Induction of insulin resistance *in vivo* by amylin and calcitonin gene-related peptide. *Diabetes* 39: 260-265; 1990.
- Koopmans S.J., van Mansfeld A.D., Jansz H.S., Krans H.M., Radder J.K., Frolich M., et al. Amylin induces *in vivo* insulin resistance in conscious rats: the liver is more sensitive to amylin than peripheral tissues. *Diabetologia* 34: 218-224; 1991.
- Sowa R., Sanke T., Hrayama J., Tabata H., Furuta H., Nishimura S., et al. Islet amyloid polypeptide amide causes peripheral insulin resistance *in vivo* in dogs. *Diabetologia* 33: 118-120; 1990.
- Young A.A., Gedulin B., Wolfe-Lopez D., Greene H.E., Rink T.J., Cooper G.J. Amylin and

- insulin in rat soleus muscle: dose responses for cosecreted noncompetitive antagonists. *Am. J. Physiol.* 263: E274-E281; 1992.
421. Gomez-Foix A.M., Rodriguez-Gil J.E., Guinivart J.J. Anti-insulin effects of amylin and calcitonin-gene-related peptide on hepatic glycogen metabolism. *Biochem. J.* 276: 607-610; 1991.
422. Young A.A., Mott D.M., Stone K., Cooper G.J. Amylin activates glycogen phosphorylase in the isolated soleus muscle of the rat. *FEBS Lett.* 281: 149-151; 1991.
423. Deems R.O., Deacon R.W., Young D.A. Amylin activates glycogen phosphorylase and inactivates glycogen synthase via cAMP-independent mechanisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174: 716-720; 1991.
424. Tedstone A.E., Nezzet T., Hughes S.J., Clark A., Mathews D.R. The effect of islet amyloid polypeptide (amylin) and calcitonin gene related peptide on glucose removal in the anaesthetized rat and on insulin secretion from rat pancreatic islets in vitro. *Biosci. Rep.* 10: 339-345; 1990.
425. Gathe M.A., Datta H.K., Zaida M., Bretherton-Watt D., Wimalawansa S.J., MacIntyre I., et al. Amylin and amylin-amide lack an acute effect on blood glucose and insulin. *J. Endocrinol.* 124: R9-R11; 1990.
426. Kassir A.A., Upadhyay A.K., Lim T.J., Moossa A.R., Olefsky J.M. Lack of effect of islet amyloid polypeptide in causing insulin resistance in conscious dogs during euglycemic clamp studies. *Diabetes* 40: 998-1004; 1991.
427. Wilding J.P.H., Khandan-Nia N., Bennet W.M., Gilbey S.G., Beacham J., Ghattei M.A., et al. Lack of acute effect of amylin (islet associated peptide) on insulin sensitivity during hyperinsulinaemic clamp in humans. *Diabetologia* 37: 166-169; 1994.
428. Bretherton-Watt D., Gilbey S.G., Ghattei M.A., Beacham J., Machae A.D., Bloom S.R. Very high concentrations of islet amyloid polypeptide are necessary to alter the

- insulin response to intravenous glucose in man. *J. Clin. Endocrinol.* 74: 1032-1035; 1992.
429. Schmitz O., Nyholm B., Orskov L., Gravholt C., Moller N. Effects of amylin and the amylin agonist Pramlintide on glucose metabolism. *Diabet. Med.* 14: S9-S23; 1997.
430. Young A.A., Crocker L.B., Wolfe-lopez D., Cooper G.J. Daily amylin replacement reverses hepatic glycogen depletion in insulin treated streptozotocin diabetic rats. *FEBS Lett.* 287: 203-205; 1991.
431. Young A.A., Wang M.W., Cooper G.J. Amylin injection causes elevated plasma lactate and glucose in the rat. *FEBS Lett.* 291: 101-104; 1991.
432. Deems R.O., Cardinaux, Deacon R.W., Young D.A. Amylin or CGRP (8-37) fragments reverse amylin-induced inhibition of ¹⁴C-glycogen accumulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 116-120; 1991.
433. Cooper G.J.S., Day A.J., Willis A.C., Roberts A.N., Reid K.B.M., Leighton B. Amylin and the amylin gene: structure, function and relationship to islet amyloid and to diabetes mellitus. *Biochim. Biophys. Acta*: 1014:247-258; 1989.
434. Leighton B., Cooper G.J.S. The role of amylin in the insulin resistance of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Trends Biochem. Sci.* 15: 295-299; 1990.
435. Suzuki S., Murakami M., Abe S., Satoh Y., Shintani S., Ishizuka K., et al. The effects of amylin on insulin secretion from RIN m5F cells and glycogen synthesis and lipogenesis in rat primary cultured hepatocytes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 15: 77-89; 1992.
436. Nagamatsu S., Carroll J., Grodsky E.M., Steiner D.F. Lack of islet amyloid polypeptide regulation of insulin biosynthesis or secretion in normal rat islets. *Diabetes* 39: 871-874; 1990.

437. Ar'Rajab A., Ahrén B. Effects of amidated rat islet amyloid polypeptide on glucose-stimulated insulin secretion in vivo and in vitro in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 192: 443-445; 1991.
438. Pettersson M., Ahrén B. Failure of islet amyloid polypeptide to inhibit basal and glucose-stimulated insulin secretion in model experiments in mice and rats. *Acta Physiol. Scand.* 138: 389-394; 1990.
439. Broderick C.L., Brooke G.S., DiMarchi R.D., Gold G. Human and rat amylin have no effect on insulin secretion in isolated rat pancreatic islets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177: 962-938; 1991.
440. Degano P., Silvestre R.A., Salas M., Peiró E., Marco J. Amylin inhibits glucose-induced insulin secretion in a dose-dependent manner. Study in the perfused rat pancreas. *Regul. Pept.* 43: 91-96; 1993.
441. Salas M., Silvestre R.A., García-Hermida O., Fontela T., Rodríguez-Gallardo J., Marco J. Inhibitory effect of amylin (islet amyloid polypeptide) on insulin response to non-glucose stimuli. Study in perfused rat pancreas. *Diabete Metab.* 21: 269-273; 1995.
442. Bretherton-Watt D., Gilbey S.G., Ghatel M.A., Beacham J., Bloom S.R. Failure to establish islet amyloid polypeptide (amylin) as a circulating beta cell inhibiting hormone in man. *Diabetologia* 33: 115-117; 1990.
443. Wang Z.L., Bennet W.M., Ghatel M.A., Byfield P.G.H., Smith D.M., Bloom S.R. Influence of islet amyloid polypeptide and the 8-37 fragment of islet amyloid polypeptide on insulin released from perfused rat islets. *Diabetes* 42: 330-335; 1993.
444. Bennet W.M., Beiss C.S., Ghatel M.A., Byfield P.G.H., Bloom S.R. Amylin tonally regulates arginine-stimulated secretion in rats. *Diabetologia* 37: 436-438; 1994.

445. Silvestre R.A., Salas M., Degano P., Peiró E., Marco J. Reversal of the inhibitory effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and amylin by the 8-37 fragment of the human CGRP. *Biochem Pharmacol.* 45: 2343-2347; 1993.
446. Wang F., Adrian T.E., Westermark G., Ding X., Gasslander T., Permert J. Islet amyloid polypeptide tonally inhibits (-, (-, and (-cell secretion in isolated rat pancreatic islets. *Am. J. Physiol.* 276: E19-E24; 1999.
447. Young A.A., Gedulin B., Gaeta S.L., Prickett K.S., Beaumont K., Larson E., et al. Selective amylin antagonist suppresses rise in plasma lactate after intravenous glucose in the rat. Evidence for a metabolic role of endogenous amylin. *FEBS Lett.* 343: 237-241; 1994.
448. Wagoner P.K., Chen C., Worley J.F., Duke I.D., Oxford G.S. Amylin modulates B-cell glucose sensing via effects on stimulus-secretion coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9145-9149; 1993.
449. Wang F., Permert J., Östenson C.G. Islet amyloid polypeptide regulates multiple steps in stimulus-secretion coupling of (cells in rat pancreatic islets. *Pancreas* 20: 264-269; 2000.
450. Gedulin B.R., Rink T.J., Young A.A. Dose-response for glucagonostatic effects of amylin in rats. *Metabolism* 46: 67-70; 1997.
451. Gedulin B., Jodka C., Young A. Pramlintide inhibits arginine-induced glucagon secretion in rat. *Diabet. Med.* 14: S26; 1997.
452. Fineman M., Kolterman O., Thompson R., Koda J. The human amylin analogue pramlintide inhibited glucagon secretion in type 1 diabetic subjects. *Diabetes* 40: 30A; 1997.
453. Nyholm B., Orskov L., Hove K., Gravholt C., Moller N., Alberti N., et al. The amylin analogue pramlintide decreases post-prandial plasma glucose and glucagon in NIDDM. *Diabetes* 40: 33A; 1997.

454. Silvestre R.A., Peiro E., Degano P., Miralles P., Marco J. Inhibitory effect of rat amylin on the insulin responses to glucose and arginine in the perfused rat pancreas. *Regul. Pept.* 31. 23-31; 1990.
455. Kolterman O.G., Scharwitz S., Corder C., Levy B., Klaff L., Peterson J., et al. Effect of 14 days' subcutaneous administration of the human amylin analogue, pramlintide (AC₁₃₇) on an intravenous insulin challenge and response to a standard liquid meal in patients with IDDM. *Diabetologia* 39: 492-499; 1996.
456. Nyholm B., Moller M., Gravholt C., Orskov L., Mengel A., Bryan A., et al. Acute effects of the human amylin analogue AC₁₃₇ on basal and insulin-stimulated euglycemic and hypoglycemic fuel metabolism in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 1083-1089; 1996.
457. Kong M.F., King P., MacDonald I.A., Stubbs T.A., Perkins A.C., Blackshaw P.E., et al. Infusion of pramlintide, a human amylin analogue, delays gastric emptying in men with NIDDM. *Diabetologia* 40: 82-88; 1997.
458. Young A. Role of amylin in nutrient intake. Animal studies. *Diabetic Med.* 14: S14-S18; 1997.
459. Gedulin B., Green D., Jodka L., Young A. Endogenous amylin and gastric emptying in rats: comparison with GLP-1 and CCK-8. *Diabetologia* 38: A 244; 1995.
460. Jodka C., Green D., Young A., Gedulin B. Amylin modulations of gastric emptying in rats depends upon an intact vagus nerve. *Diabetes* 45: A 253; 1996.
461. Gedulin B., Young A. A. Hypoglycemia overrides amylin-mediated regulation of gastric emptying in rats. *Diabetes* 47: 93-97; 1997.
462. Gedulin B., Lawler R., Jodka C., Young A. Amylin inhibits pentagastrin-stimulated gastric acid secretion: comparison with glucagon-like peptide-1 and exendin-4. *Diabetes* 40: A 188; 1997.

463. Jodka C., Gedulin B., Lawler R., Grazzini M., Young A. Amylin protects against ethanol-induced gastric mucosal damage and inhibits pentagastrin-stimulated gastric acid secretion. *Diabetes* 40: A 365; 1997.
464. Lutz T.A., Delprete E., Scharrer E. Reduction of food intake in rats by intraperitoneal injection of low doses of amylin. *Physiol. Behav.* 55: 891-895; 1994.
465. Arnelo U., Permert J., Adrian T.E., Larsson J., Westermark P., Reidelberger R.D. Chronic infusion of islet amyloid polypeptide causes anorexia in rats. *Am. J. Physiol.* 271: R1654-1659; 1996.
466. Rushing P.A., Hagan M.M., Seeley R.J., Lutz T.A., Woods S.C. Amylin: a novel action in the brain to reduce body weight. *Endocrinology* 141: 850-853, 2000.
467. Thompson R.G., Pearson L., Schoenfeld S.L., Kolterman O.G. The Pramlintide in Type 2 Diabetes Group. Pramlintide, a synthetic analog of human amylin, improves the metabolic profile of patients with type 2 diabetes using insulin. *Diabetes Care* 21: 987-993; 1998.
468. Banks W.A., Kastin A.J. Differential permeability of the blood-brain barrier to two pancreatic peptides: insulin and amylin. *Peptides* 19: 883-889; 1998.
469. Banks W.A., Kastin A.J., Maness L.M., Huang W., Jaspan J.B. Permeability of the blood-brain barrier to amylin. *Life Sci.* 57: 1993-2001; 1995.
470. Beaumont K., Kenney M.A., Young A.A., Rink T.J. High affinity binding sites in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 44: 493-497; 1993.
471. Christopoulos G., Paxinos G., Huang X.F., Beaumont K., Toga A.W., Sexton P.M. Comparative distribution of receptors for amylin and the related peptides calcitonin gene-related peptide and calcitonin in rat and monkey brain. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73: 1037-1041; 1995.

-
472. Sexton P.M., Paxinos G., Kenney M.A., Wookey P.J., Beaumont K. In vitro autoradiographic localization of amylin binding sites in rat brain. *Neuroscience* 62: 553-567; 1994.
473. Woods S.C., Seeley R.J., Porte D., Schwartz M.W. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 280: 1378-1383; 1998.
474. Pieber T.R., Roitelman J., Lee Y., Luskey K.L., Stein D.T. Direct plasma radioimmunoassay for rat amylin (1-37): Concentrations with acquired and genetic obesity. *Am. J. Physiol.* 267: E156-E164; 1994.
475. Wookey P.J., Tikellis C., Du H.C., Qin H.F., Sexton P.M., Cooper M.E. Amylin binding in rat renal cortex, stimulation of adenylyl cyclase, and activation of plasma renin. *Am. J. Physiol.* 39: F289-F294; 1996.
476. Young A.A., Vine W., Carlo P., Smith P., Rink T.J., Rumble J., et al. Amylin stimulation of renin activity in rats: a possible link between insulin resistance and hypertension. *J. Hypertens.* 12: S 152; 1994.
477. Young A.A., Nuttall A., Moyses C., Percy A., Vine W., Rink T. Amylin stimulates the renin-angiotensin-aldosterone axis in rats and man. *Diabetologia* 38: A 225; 1995.
478. Young A.A., Rink T.J., Vine W., Gedulin B. Amylin and syndrome-x. *Drug Dev. Res.* 32: 90-99; 1994.
479. Vine W., Smith P., LaChapell R., Blase E., Young A. Effects of rat amylin on renal function in the rat. *Horm. Metab. Res.* 30: 518-522; 1998.
480. Pietschmann P., Farsoudi K.H., Hoffmann O., Klaushofer K., Horandner H., Peterlik M. Inhibitory effect of amylin on basal and parathyroid hormone-stimulated bone resorption in cultured neonatal mouse calvaria. *Bone* 14: 167-172; 1993.
481. Gilbey S.G., Ghatel M.A., Bretherton-Watt D., Zaidi M., Jones P.M., Perera T., et al. Islet amyloid polypeptide: production by an osteoclast cell line and possible role as a paracrine regulator of osteoclast function in man. *Clin. Sci.* 81: 803-808; 1991.

-
482. Alam A.S., Moonga B.S., Bevis P.J., Huang C.L., Zaidi M. Amylin inhibits bone resorption by a direct effect on the motility of rat osteoclasts. *Exp. Physiol.* 78: 183-196; 1993.
483. Alam A.S., Bax C.M., Shankar V.S., Bax B.E., Bevis P.J., Huang C.L., et al. Further studies on the mode of action of calcitonin on isolated rat osteoclasts: pharmacological evidence for a second site mediating intracellular Ca^{2+} mobilization and cell retraction. *J. Endocrinol.* 136: 7-15; 1993.
484. Borm A.K., Klevesath M.S., Borcea V., Kasperk C., Seibel M.J., Wahl P., et al. The effect of pramlintide (amylin analogue) treatment on bone metabolism and bone density in patients with type 1 diabetes. *Horm. Metab. Res.* 31: 472-475; 1999.
485. Gardiner S.M., Compton A.M., Kemp P.A., Bennet T., Bose C., Foulkes R., et al. Antagonistic effect of human (-calcitonin gene-related peptide (8-37) on regional hemodynamic actions of rat islet amyloid polypeptide in conscious Long-Evans rats. *Diabetes* 40: 948-951; 1991.
486. Scherbaum W.A. The role of amylin in the physiology of glycemic control. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 106: 97-102; 1998.
487. Kruger D.F., Gatcomb P.M., Owen S.K. Clinical implications of amylin and amylin deficiency. *Diabetes Educ.* 25: 389-397; 1999.
488. Kolterman O.G. Amylin and glycaemic regulation: a possible role for the human amylin analogue pramlintide. *Diabet. Med.* 14: S35-S38; 1997.
489. Evans A.J., Krentz A.J. Recent developments and emerging therapies for type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 2: 75-94; 1999.
490. Nyholm B., Orskov L., Hove K.Y., Gravholt C.H., Moller N., Alberti K.G., et al. The amylin analog pramlintide improves glycemic control and reduces postprandial glucagon concentrations in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 48: 935-941; 1999.

-
491. Thompson G., Peterson J., Gottlieb A., Mullane J. Effects of pramlintide, an analog of human amylin on plasma glucose profiles in patients with IDDM. Results of a multicenter trial. *Diabetes* 46: 632-636; 1997.
492. Thompson G., Pearson L., Kolterman O.G. Effects of 4 weeks' administration of pramlintide, a human amylin analogue, on glycaemia control in patients with IDDM: effects on plasma glucose profiles and serum fructosamine concentrations. *Diabetologia* 40: 1278-1285; 1997.
493. Janciauskiene S., Eriksson S., Carlemalm E., Ahrén B. B cell granule peptides affect human islet amyloid polypeptide (IAPP) fibril formation in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263: 580-585; 1997.
494. Westermark P., Li Z.C., Westermark G.T., Leckström A., Steiner D.F. Effects of beta cell granules components on human islet amyloid polypeptide fibril formation. *FEBS Lett.* 379: 203-206, 1996.
495. Charge S.B., de Koning E.J., Clark A. Effect of PH and insulin on fibrillogenesis of islet amyloid polypeptide in vitro. *Biochemistry* 34: 14588-14593; 1995.
496. Kulkarni R.N., Smith D.M., Ghatei M.A., Jones P.M., Bloom S.R. Investigation of the effects of antisense oligodeoxynucleotides to islet amyloid polypeptide mRNA on insulin release, content and expression. *J. Endocrinol.* 151: 341-348; 1996.
497. Novials A., Jiménez-Chillarón J.C., Franco C., Casamitjana R., Gomis R., Gómez-Foix A.M. Reduction of islet amyloid expression and basal secretion by adenovirus-mediated delivery of amylin antisense cDNA. *Pancreas* 17:182-186; 1998.
498. Lindström T., Leckström A., Westermark P., Arnqvist H.J. Effect of insulin treatment on circulating islet amyloid polypeptide in patients with NIDDM. *Diabet. Med.* 14: 472-476; 1997.
499. Zapećka-Dubno B., Czyżyk A., Dworak A., Bak M.I. Treatment with metformin in NIDDM patients lowers plasma amylin level. *Diabetologia* 40: A316, 1997.

500. Inzucchi S.E., Maggs D.G., Spollet G.R., Page S.L., Rife F.S., Walton V., et al. Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 338: 867-872; 1998.
501. Kisilevsky R. Anti-amyloid drugs: potential in the treatment of diseases associated with aging. *Drugs Aging* 8: 75-83; 1996.
502. Solomon B., Koppel R., Frankel D., Hanan Aharon E. Disaggregation of Alzheimer (-amyloid by site-directed mAb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4109-4112; 1997.
503. Soto C., Sigurdsson E.M., Morelli L., Kumar R.A., Castaño E.M., Frangione B. Beta sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat. Med.* 4: 822-826; 1998.
504. World Health Organization: Diabetes Mellitus: Report of a WHO study Group. Geneva, World Health Org., 1985 (Tech. Rep. Ser., nº 727).
505. Report and Recommendations of the San Antonio Conference on Diabetic neuropathy. *Diabetes* 37: 1000-1004; 1988.
506. Kahn R. Proceedings of a consensus development conference on standardized measures in diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 15: 1080-1107; 1992.
507. Coustan D.R., Carpenter M.W. The diagnosis of gestational diabetes. *Diabetes Care* 21: B5-B8; 1998.
508. Friedewald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S. Estimation of concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502; 1972.
509. Percy A.J., Trainor D.A., Rittenhouse J., Phelps J., Koda J.E. Development of sensitive immunoassays to detect amylin and amylin-like peptides in unextracted plasma. *Clin. Chem.* 42 : 576-585; 1996.

510. Rittenhouse J., Chait B.T., Bierle J.R., Janes S.M., Park D.R., Phelps J.L., et al. Heterogeneity of naturally-occurring human amylin due to glycosylation. *Diabetes* 45: 234A; 1996.
511. Orita M., Suzuki Y., Sekiya T., Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-879; 1989.
512. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database programs. *Nucleic Acid. Res.* 25: 3389-3402; 1997.
513. Sherf B.A. Dual-Luciferase reporter assay: an advanced coreporter technology integrating firefly and Renilla luciferase assays. *Promega Notes* 57: 2; 1996.
514. Ishihara H., Asano T., Tsukuda K., Katagiri H., Inukai K., Anai M., et al. Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar than to those of normal islets. *Diabetologia* 36: 1139-1145; 1993.
515. Rajan A.S., Aguilar-Bryan L., Nelson D. A., Yaney G.C., Hsu W. H., Kunze D.L. et al. Ion channels and insulin secretion. *Diabetes Care* 33: 340-363; 1990.
516. Dornhorst A., Rossi M. Risk and prevention of type 2 diabetes in women with gestational diabetes. *Diabetes Care* 21: B43-B49; 1998.
517. Kautzky-Willer A., Thomaseth K., Ludvik B., Nowotny P., Rabensteiner D., Waldhäusl W., et al. Elevated islet amyloid pancreatic polypeptide and proinsulin in lean gestational diabetes. *Diabetes* 46: 607-614; 1997.
518. Wareham N.J., Byrne C.D., Williams R., Day N.E., Hales C.N. Fasting proinsulin concentrations predict the development of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22: 262-270; 1999.

519. Sakagashira S., Hiddinga H.J., Tateishi K., Sanke T., Sanabusa T., Nanjo K., et al. S20G mutant amylin exhibits increased in vitro amyloidogenicity and increased intracellular cytotoxicity compared to wild-type amylin. *Am. J. Pathol.* 157: 2101-2109; 2000.
520. Janand-Delenne B, Savin B, Habib G, Bory M, Vague P, Lassmann-Vague V. Silent myocardial ischemia in patients with diabetes: who to screen. *Diabetes Care* 22: 1396-1400; 1999.
521. Inoguchi T, Yamashita T, Umeda F, Mihara H, Nakagaki O, Takada K et al. High incidence of silent myocardial ischemia in elderly patients with non insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 47: 37-44; 2000.
522. Airaksinen K.E.J. Silent coronary artery disease in diabetes – a feature of autonomic neuropathy or accelerated atherosclerosis?. *Diabetologia* 44: 259-266; 2001.
523. Aoyama T, Sawamura T, Furutani Y, Matsuoka R, Yoshida MC, Fujiwara H. Structure and chromosomal assignment of the human lectin-like oxidized low-density-lipoprotein receptor-1 (LOX-1) gene. *Biochem. J.* 339: 177-184; 1999.
524. Brown SD, Twells R, Hey PJ, Cox RD, Levy ER, Soderman AR et al. Isolation and characterization of LRP6, a novel member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248: 879-888; 1999.
525. Powell DS, Maksoud H, Hattersley AT, Chargé SBP, Matthews DR, Levy JC et al. Apolipoprotein E genotype is not associated with islet amyloid as assessed by disease severity in type 2 diabetes (Abstract). *Diabetologia* 42: A146; 1999.
526. Vidal J, Verchere CB, Andrikopoulos S, Hull RL, Wang F, Kahn SE. Apolipoprotein E is not required for amyloid deposition in a transgenic mouse model of type 2 diabetes (Abstract). *Diabetes* 49: 951-P; 2000.

-
527. Tokuyama Y., Kanatsuka A., Suzuki Y., Yamaguchi T., Taira M., Makino H. et al. Islet amyloid polypeptide gene: no evidence of abnormal promoter region in thirty-five type 2 diabetic patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 22: 99-105; 1994.
528. DeFronzo R.A. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Reviews* 5: 177-269; 1997.
529. Uetsuki T., Naito A., Nagata S., Kaziro Y. Isolation and characterization of the human chromosomal gene for polypeptide elongation factor-1 alpha. *J. Biol. Chem.* 264: 5791-5798; 1989.
530. Ash J., Ke Y., Korb M., Johnson L.F. Introns are essential for growth-regulated expression of the mouse thymidylate synthase gene. *Mol. Cell. Biol.* 13:1565-1571; 1993.
531. Gasa R., Gomis R., Casamitjana R., Novials A. Signals related to glucose metabolism regulate islet amyloid polypeptide (IAPP) gene expression in human pancreatic islets. *Regul. Pept.* 68: 99-104; 1997
532. Gasa R., Gomis R., Casamitjana R., Rivera F., Novials A. Glucose regulation of islet amyloid polypeptide gene expression in rat pancreatic islets. *Am. J. Physiol* 272: E543-E549; 1997.
533. Macfarlane W.M., Campbell C.C., Elrick L.J, Oates V., Bermano G., Lindley K.J., et al. Glucose regulates islet amyloid polypeptide gene transcription in a PDX-1 and calcium-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 275: 15330-15335; 2000.
534. Kane C., Sheperd R.M., Squires P.E., Johnson P.R., James R.F., Milla P.J. et al. Loss of functional K_{ATP} channels in pancreatic (-cells causes persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Nat. Med.* 12: 1344-1347; 1996.
535. Macfarlane W.M., Cragg H., Dockerty H.M., Read M.L., James R.F., Aynsley-Green A. Et al. Impaired expression of transcription factor IUF1 in a pancreatic (-cell line

- derived from a patient with persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy (nesidioblastosis). FEBS Lett. 413: 304-308; 1997.
536. Macfarlane W.M., Sheperd R.M., Karen E., Cosgrove K.E., James R.F.L., Dunne M.J. et al. Glucose modulation of insulin mRNA levels is dependent of transcription factor PDX-1 and occurs independently of changes in intracellular Ca^{2+} . Diabetes 49: 418-423; 2000.
537. Wang M., Drucker D.J. Activation of amylin gene transcription by LIM domain homeobox gene Isl-1. Mol. Endocrinol. 10: 243-251; 1996.
538. Prentki M., Matschinsky F.M. Ca^{2+} , cAMP and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. Physiol. Rev. 67: 1185-1248; 1987.
539. Eggers A., Siemann, Blume R., Knepel W. Gene-specific transcriptional activity of the insulin cAMP-responsive element is conferred by NF-Y in combination with cAMP response element-binding protein. J. Biol. Chem. 273: 18499-18508; 1998.
540. Mulder H., Ahrén B., Stridsberg M., Sundler F. Non-parallelism of islet amyloid polypeptide (amylin) and insulin gene expression in rat islets following dexamethasone treatment. Diabetologia 38: 395-402; 1995.
541. Fernández-Mejía C., Medina-Martínez O., Martínez-Pérez L., Goodman P.A. The human insulin gene contains multiple transcriptional elements that respond to glucocorticoids. Pancreas 18: 336-341; 1999.
542. Goodman P.A., Medina-Martínez O., Fernández-Mejía C. Identification of the human insulin negative regulatory element as a negative glucocorticoid response element. Mol. Cell Endocrinol 120: 139-146; 1996.
543. Garlatti M., Daheshia M., Slater E., Slater E., Bouguet J., Hanoune J., et al. A functional glucocorticoid-responsive unit composed of two overlapping inactive receptor-binding sites: evidence for formation of a receptor tetramer. Mol. Cell Biol. 14: 8007-8017; 1994.

544. Watada H., Kajimoto Y., Kaneto H., Matsuoka T., Fujitani Y., Miyazaki J. et al. Involvement of the homeodomain-containing transcription factor PDX-1 in islet amyloid polypeptide gene transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229:746-751; 1996.
545. Sosa-Pineda B., Chowdhury K., Torres M., Oliver G., Gruss P. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* 386: 399-402; 1997.
546. Campbell S.C., Cragg H., Elrick L.J., Macfarlane W.M., Shennan K.I., Docherty K. Inhibitory effect of Pax4 on the human insulin and islet amyloid polypeptide (IAPP) promoters. *FEBS Lett* 463: 53-57; 1999.

A- COMUNICACIONS A CONGRESSOS

CONGRESSOS INTERNACIONALS

1. Transcriptional regulation of the -132 G/A mutant Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) gene promoter. I. Rojas, R. Gomis, C. Franco, A. Novials. 37th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD), setembre 2001, Glasgow (UK). Diabetologia 44 (suppl. 1): A89; 2001.
2. A novel mutation in the IAPP promoter gene is associated with type 2 diabetes in Spanish population. I. Rojas, C. Franco, R. Casamitjana, E.F. Usac, R. Gomis i A. Novials. 36th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD), setembre 2000, Jerusalem. Diabetologia 43 (suppl. 1): A 139; 2000.
3. Identification of a polymorphism in the IAPP gene in Spanish population with type 2 diabetes associated with a less atherogenic lipid profile. A. Novials, I. Rojas, C. Franco, E.F. Usac, R. Gomis. 36th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD), setembre 2000, Jerusalem. Diabetologia 43 (suppl. 1): A 139; 2000.
4. Identification of a mutation in the amylin promoter gene. I. Rojas, A. Novials, C. Franco i R. Gomis. 35th Annual Meeting of the EASD, Brussel·les, setembre 1999. Diabetologia (suppl. 1): A145; 1999.

CONGRESSOS NACIONALS

1. Identificación de una mutación en el promotor del gen de la amilina asociada a diabetes mellitus tipo 2. I. Rojas, C. Franco, E. F. Usac, R. Gomis i A. Novials. Congrés de la Societat Espanyola de Diabetis (SED) del 2000, Bilbao, que va obtenir el premi de la Fundació Díaz Giménez com a millor comunicació del congrés. *Avances en Diabetología* 16; 1; 2000.
2. Identificación de un polimorfismo en el gen de la amilina en població con diabetes tipo 2 asociado a un perfil lipídico menos aterogénico. I. Rojas, C. Franco, R. Gomis i A. Novials. 42 Congrés de la Societat Espanyola d'Endocrinologia i Nutrició del 2000, Salamanca. *Endocrinología* 47 (suppl. 1): 27; 2000.
3. Estudio de mutaciones del gen de la amilina en población española con diabetes tipo 2. I. Rojas, A. Novials, C. Franco i R. Gomis. 41 Congrés Nacional de la Societat Espanyola d'Endocrinologia i Nutrició del 2000, Màlaga. *Endocrinología* 46 (suppl.1): 18; 1999.
4. Estudi de mutacions del promotor i exó 3 del gen de l'amilina en diabetis tipus 2. I. Rojas, A. Novials, C. Franco i R. Gomis. V Congrés de L'Associació Catalana de Diabetis, Barcelona 1999.

B- PUBLICACIONS

1. A novel mutation in islet amyloid polypeptide (IAPP) gene promoter is associated with type 2 diabetes mellitus. I. Rojas, A. Novials, C. Franco, R. Casamitjana, E. F. Usac, R. Gomis. *Diabetologia* 44: 1064-1065; 2001.
2. Amilina: del estudio molecular a las acciones fisiológicas. I. Rojas, A. Novials. *Endocrinología y Nutrición* (en premsa).
3. Bases moleculares de la diabetes mellitus tipo 2: Estudio de genes candidatos para su desarrollo. I. Rojas, A. Novials. *Obesidad, Nutrición y Diabetes* (en premsa).
4. Transcriptional activity of a novel mutation in the Islet Amyloid Polypeptide gene promoter. A. Novials, I. Rojas, C. Franco, Elena F. Usac, R. Gomis. (manuscrit sotmès per publicació).
5. Polymorphism at +79bp in intron 2 of the IAPP gene is associated with lower levels of cholesterol and LDL cholesterol in nondiabetic subjects and in type 2 diabetic patients. I. Rojas, R. Gomis, E. Casals, M. Solé, C. Franco, A. Novials (manuscrit sotmès per publicació).