

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA**

**SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE**

**CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA**



**La natura eterogenea del MODY. Un caso di doppia  
eterozigosi per le varianti RFX6/BLK.**

**Relatore:**

*Professore Davide Carlo Maggi*

**Candidato:**

*Gjyle Ashiku*

Anno accademico 2020-2021

# *Abstract*

## **Background:**

Traditionally, diabetic patients with an onset age younger than 25 years old, family history of diabetes, a phenotype indicating gradual destruction of islet beta cells, and no obesity are likely to be identified as MODY.<sup>1</sup>

## **Method:**

We present a case of a 30 years old female patient with positive family history for type two diabetes, whom is under evaluation for MODY disease. The patient was diagnosed with diabetes in 2007 and since then she has been under surveillance in our clinic, presenting a gradual worsening of the HbA1c not responsive to different therapeutical approaches.

In 2020 we opted for the molecular diagnosis considering the variable phenotypical presentation, the early onset, the negative pancreatic antibodies, positive family history for diabetes and negative history of obesity.

## **Results:**

The DNA sequencing revealed two novel variants in heterozygosis located in the genes RFX6/BLK, yet to be studied for their pathogenicity.

The variant located at RFX6 gene was also isolated in her mother's genome, whether the variant located at the gene BLK in her father's genome, both having a proper glycemic compensation.

## **Conclusion:**

This case of double heterozygosity in the genes RFX6/BLK demonstrates the variable phenotypic presentation resulting from diet based follow-up till the demanding of insulin treatment.

A molecular diagnosis of MODY is clinically important because there are implications for prognosis, treatment, and family members.<sup>2,3</sup>

As the cost of DNA sequencing is decreasing, one of the major barriers to genetic testing will be eliminated, but the correct assignment of pathogenicity to novel variants is becoming more challenging.<sup>4</sup>

# *Abstract*

## **Introduzione:**

Tradizionalmente il MODY si sospetta in un paziente con diabete con età di esordio della patologia inferiore a 25 anni, storia familiare positiva di diabete, un fenotipo che indica la graduale distruzione delle isole di cellule beta e assenza dell'obesità. <sup>1</sup>

## **Metodo:**

Noi presentiamo il caso di una paziente femmina trentenne, con sospetto di MODY con una storia familiare di diabete di tipo due. La paziente è stata diagnosticata nel 2007, da allora sotto cura presso il nostro ambulatorio ha manifestato un graduale peggioramento del compenso glicemico accompagnato da diversi cambiamenti terapeutici.

## **Risultati:**

Di fronte alla presentazione fenotipica molto variabile, l'età giovane dell'esordio, la mancanza degli anticorpi anti-GAD e anti-insula, storia familiare positiva per diabete e assenza dell'obesità, nel 2020 la paziente ha eseguito la diagnosi molecolare che ha rivelato la presenza di due varianti in eterozigosi nei geni RFX6 e BLK, con significato clinico incerto.

Il variante del gene RFX6 è stato identificato anche nel genoma della madre e il variante del gene BLK nel genoma del padre, entrambi senza alterazioni del metabolismo del glucosio.

## **Conclusioni:**

Questo caso di doppia eterozigosi nei geni RFX6/BLK, identificati in una paziente con iperglicemia, dimostra la presentazione molto variabile clinica e l'evoluzione dal follow-up senza terapia fino all'inizio del trattamento con insulina.

Secondo i criteri clinici già stabiliti, sospettare di MODY e indirizzare i pazienti verso l'analisi genetica ha un ruolo fondamentale nel distinguere i vari casi di MODY per poter ridurre le complicanze e per migliorare il controllo con il trattamento e il follow-up più appropriati per i pazienti. <sup>2,3</sup>

Dall'altro lato, man mano che il sequenziamento del DNA diviene realtà, una delle principali barriere ai test genetici verrà rimossa e la nuova sfida sarà l'assegnazione della patogenicità alle nuove varianti scoperte. <sup>4</sup>

## **INDICE DEI CONTENUTI**

### **1. INTRODUZIONE**

<b>1.1 DEFINIZIONE DI MODY .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2 PRINCIPALI FORME DI MODY .....</b>	<b>5</b>

### **2. DIAGNOSI**

<b>2.1 CARATTERISTICHE GENERALI .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2 PREDICTION MODEL DI HATTERSLEY .....</b>	<b>11</b>
<b>2.3 SEQUENZIAMENTO SANGER .....</b>	<b>12</b>
<b>2.4 NGS.....</b>	<b>12</b>
<b>2.5. CARATTERISTICHE GENERALI DEL DIABETE TIPO 1 E TIPO 2 .....</b>	<b>15</b>

### **3. METODOLOGIA**

<b>3.1 PRESENTAZIONE DEL CASO CLINICO .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2 DIAGNOSI GENETICA.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3 CONCLUSIONI.....</b>	<b>23</b>
<b>4. DISCUSSIONE .....</b>	<b>25</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>26</b>

### **INDICE DELLE TABELLE**

<b>Tabella 1. Caratteristiche cliniche e molecolari dei sottotipi di MODY .....</b>	<b>10</b>
<b>Tabella 2. Riassunto delle caratteristiche chiave dei diversi tipi di diabete.....</b>	<b>17</b>
<b>Tabella 3. Gli esami dal 2010-2021. ....</b>	<b>20</b>
<b>Tabella 4. . Pannello dei geni analizzati tramite NGS6.....</b>	<b>22</b>

### **INDICE DELLE FIGURE**

<b>Figura 1. Descrizione schematica delle differenze tra il sequenziamento Sanger e il NGS. ....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 2. Pedigree del proband. ....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 3. Correlazione tra terapia, HbA1c e peso. ....</b>	<b>21</b>

## **1. INTRODUZIONE**

### **1.1 DEFINIZIONE DI MODY**

Il diabete MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) indica un insieme di disordini delle cellule beta secernenti insulina dovuta ad alterazioni di un gruppo eterogeneo di geni. <sup>5</sup>

Il MODY rappresenta la forma più comune di diabete monogenico ed è generalmente caratterizzato da:

- insorgenza di iperglicemia in età precoce (classicamente prima dei 25 anni, sebbene la diagnosi possa avvenire in età più avanzata)
- ridotta secrezione di insulina con difetti minimi o nulli nell'azione dell'insulina <sup>3</sup>
- evidenza di trasmissione ereditaria autosomica dominante <sup>5</sup>
- assenza di obesità coesistente
- assenza di autoimmunità <sup>3,5</sup>

Si ritiene che il MODY rappresenti circa il 1-6% di tutti i casi di diabete mellito. <sup>2</sup>

Sono noti almeno 14 geni coinvolti nella patogenesi delle diverse forme di MODY. <sup>6</sup>

Le principali forme di MODY sono GCK-MODY, HNF1A-MODY e HNF4A MODY e insieme rappresentano dall'80 al 90 % dei casi identificati tramite indagine genetica. <sup>7,8</sup>

### **1.2 PRINCIPALI FORME DI MODY**

#### **1.2.1 HNF4A-MODY(MODY1)**

I pazienti con HNF4A-MODY hanno una disfunzione beta cellulare progressiva, dovuta ad un'alterazione in un fattore di trascrizione epatocitario nucleare.

La sensibilità alle Sulfoniluree è anche caratteristica di mutazioni HNF4A: una terapia con basse dosi di Sulfoniluree deve essere considerata come la prima linea di trattamento. <sup>9</sup>

I pazienti con mutazioni HNF4A hanno ridotti concentrazioni di colesterolo HDL, apolipoproteina e trigliceridi e spesso hanno aumentati i livelli di colesterolo LDL.

Le caratteristiche suggestive di HNF4A-MODY sono:<sup>10</sup>

- incremento della glicemia durante un carico orale di glucosio tra 0 minuti a 120 minuti superiore a 90 mg/dl
- autoanticorpi marcatori di diabete tipo 1 negativi

- C-Peptide persistentemente dosabile
- bassi livelli di HDL, trigliceridi, aumentati livelli di LDL
- macrosomia neonatale e/o ipoglicemia iper-insulinemica neonatale

### 1.2.2 GCK-MODY (MODY2)

Il GCK-MODY è la forma più comune di diabete monogenico in Italia. <sup>9</sup>

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

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

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

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

Le caratteristiche suggestive di GCK-MODY sono: <sup>10</sup>

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

### 1.2.3 HNF1A-MODY (MODY3)

HNF1A, insieme con HNF4A (Fattore di trascrizione Nucleare Epatocitario 4 Alfa) e HNF1B (Fattore di trascrizione Nucleare Epatocitario 1 Beta) sono fattori di trascrizione espressi in diversi tessuti dell'organismo che interagiscono per programmare l'espressione genica durante lo sviluppo embrionale.

I fattori di trascrizione nucleare epatici nelle beta cellule mature oltre a regolare l'espressione di insulina, influenzano anche lo sviluppo, la proliferazione e la morte della cellula; infatti la ridotta proliferazione cellulare e l'aumento dell'apoptosi sono state proposte per spiegare il

progressivo deterioramento della funzione beta cellulare che è caratteristica in questi pazienti.  
11

Mutazioni in eterozigosi nel gene HNF1A (Fattore Nucleare Epatocitario 1 Alfa) causa una forma di diabete a trasmissione autosomica dominante.

Le iperglicemie possono essere marcate ed elevati i valori di emoglobina glicata; di fatto, se non trattato in maniera corretta, può, a differenza della forma da mutazione della GCK, portare allo sviluppo delle complicanze micro e macrovascolari a lungo termine del diabete.

Il diabete HNF1A-MODY si manifesta tipicamente nell'adolescente o nel giovane adulto con glicosuria. Questi pazienti sono nati con glicemia normale, tendono ad essere normopeso e hanno normale sensibilità all'insulina.

La glicosuria è causata da una bassa soglia renale per il glucosio probabilmente dovuta alla ridotta espressione del co-trasportatore sodio-glucosio 2 (SGLT-2) e quindi ad una ridotta capacità di riassorbimento del glucosio a livello del tubulo prossimale.

I pazienti con HNF1A-MODY mostrano una spiccata sensibilità all'ipoglicemizzante orale Sulfonilurea. È stato dimostrato che l'impiego di questo farmaco è in grado di determinare il raggiungimento di un controllo glicemico migliore di quanto ottenuto con la terapia insulinica.  
12

Le caratteristiche suggestive di HNF1A-MODY sono: <sup>10</sup>

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

#### 1.2.4 IPF1-MODY (MODY4)

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

#### 1.2.5 HNF1B-MODY (MODY5)

È causato da mutazioni nel gene che codifica per il fattore di trascrizione HNF1B. Questo gene è espresso nel pancreas, reni, fegato, tratto genitale e nell'intestino e le mutazioni a suo carico sono una causa rara di MODY.

La trascrizione è espressa nella prima fase dello sviluppo embrionale a livello di pancreas, rene, fegato e tratto genitale. I portatori della mutazione HNF1B possono presentare anomalie dello sviluppo in tutti questi organi. <sup>10</sup>

#### 1.2.6 NEUROD1-MODY (MODY6)

Mutazioni in eterozigosi del gene NEUROD1 (fattore di trascrizione elica-ansa-elica per la differenziazione neurogena 1) sono un'altra causa molto rara di MODY. Il gene NEUROD1 è coinvolta nella differenziazione neuronale, sviluppo di linee cellulari endocrino e regola la trascrizione di GLUT2, insulina e GCK. <sup>10</sup>

#### 1.2.7 KLF11 (MODY7)

I cambiamenti nella sequenza aminoacidica della proteina umana Kruppel-Like Factor (KLF) 11, sono correlati allo sviluppo del MODY. Questa proteina fa parte dei processi metabolici come la sensibilità per l'insulina, la regolazione del quale è fondamentale in diverse forme di diabete. <sup>13</sup>

#### 1.2.8 CEL-MODY (MODY8)

Il gene CEL codifica l'enzima lipasi estere-carbossilico (lipasi stimolata dai sali biliari) che viene prodotto dal pancreas e secreto nel tratto digestivo. Il suo ruolo fisiologico è nell'idrolisi del colesterolo e delle vitamine liposolubile e nel loro assorbimento da parte dell'intestino. La sua mutazione comporta lo sviluppo di un diabete monogenico associato ad alterazioni della funzionalità esocrina del pancreas. <sup>10</sup>

#### 1.2.9 PAX4-MODY (MODY9)

Le mutazioni nel gene Paired Box 4 (PAX4) causano il MODY tipo 9 in seguito ad alterata regolazione delle cellule beta insulino-secrnenti. <sup>14</sup>

#### 1.2.10 INS-MODY (MODY10)

Mutazioni dominanti nel gene INS sono la seconda causa più comune di diabete neonatale permanente (PNDM), con età variabile alla comparsa del diabete. <sup>10</sup>

### 1.2.11 BLK-MODY (MODY11)

Mutazioni a carico del gene Kinasi dei linfociti B (BLK) possono provocare il MODY 11. <sup>15</sup>

Questo gene codifica per una tirosin-chinasi non recettore della famiglia SRC di proto-oncogeni che sono tipicamente coinvolti nella proliferazione e differenziazione cellulare.

La proteina ha un ruolo nella segnalazione del recettore e nello sviluppo delle cellule beta. La proteina stimola anche la sintesi e la secrezione di insulina in risposta al glucosio e migliora l'espressione di diversi fattori di trascrizione delle cellule beta pancreatiche. <sup>16</sup>

### 1.2.12 CANALI DEL POTASSIO (KATP) (MODY 12 e 13)

MODY 12 e 13 rappresentano <1% dei casi di MODY. <sup>9</sup>

I geni ABCC8 e KCNJ11 codificano le subunità SUR1 e Kir6.2 del canale del potassio (KATP) in cellule beta pancreatiche. Questo canale ha un ruolo diretto nella regolazione del rilascio dell'insulina.

Mutazioni attivanti nei geni coinvolti nel canale KATP causano diabete neonatale che si presenta nei primi sei mesi di vita e che può essere permanente (PNDM) o transitorio (TNDM).

Entrambe le forme sono sensibili alle alte dosi di terapia con Sulfonilurea. <sup>10</sup>

### 1.2.13 APPL1-MODY (MODY 14)

Mutazioni nel gene per la proteina adattatore, fosfotirosina Interaction, dominio PH, e cerniera di leucine contenente 1 (APPL1) portano alla perdita del funzione dell'APPL1.

APPL1 lega a AKT2, una molecola chiave nella via di segnalazione dell'insulina. <sup>17</sup>

Recentemente sono stati riportati casi che presentavano caratteristiche fenotipiche confondenti, con sovrapposizione tra diverse forme di diabete monogenico ed autoimmune, mostrando in alcuni di questi anche la coesistenza di diverse forme di diabete. <sup>18</sup>

Nella tabella nella pagina seguente sono state riassunte le principali forme di MODY, il gene mutato, la frequenza, le caratteristiche e la terapia più adeguata.

Gene MODY	Frequenza (% tra sottotipi MODY)	Proteina	Caratteristiche	Trattamento
<b>MODY1</b>	HNF4A	Hepatic Nuclear Factor 4 Alpha	Iperinsulinemia neonatale, bassi livelli di trigliceridi	Dieta, Sulfanilure, Insulin
<b>MODY2</b>	GCK	Glucokinase	Iperglicemia a digiuno dalla nascita	Non è necessario il trattamento
<b>MODY3</b>	HNF1A	Hepatocyte Nuclear Factor 1-Alpha	Glicosuria	Sulfonilure(meglitides, GLP-1 RA, SGLT-2I), Insulin
<b>MODY4</b>	PDX1	Pancreatic and Duodenal Homeobox 1	Omozigote: agenesia pancreatica	OHAS, Insulin
<b>MODY5</b>	HNF1B	Hepatocyte Nuclear Factor 1-Beta	Anomalie renali e genitali, ipoplasia pancreatica	OHAS, Insulin
<b>MODY6</b>	NEUROD1	Neuronal Differentiation 1	Diabete a insorgenza tardiva	OHAS, Insulin
<b>MODY7</b>	KLF11	Krüppel-Like Factor 11	Simile al diabete tipo 2	Insulin
<b>MODY8</b>	CEL	Carboxyl Ester Lipase	Insufficienza esocrin, lipomatosi	OHAS, Insulin
<b>MODY9</b>	PAX4	Paired inbox 4	Possibile chetoacidosi	Diet, OHAS, Insulin
<b>MODY10</b>	INS	Insulin	Possibile PDNM	Diet, Insulin
<b>MODY11</b>	BLK	BLK Proto-Oncogene, Src Family Tyrosine Kinase	Sovrapeso, difetto di secrezione di insulina	Diet, OHAS, Insulin
<b>MODY12</b>	ABCC8	ATP-Binding Cassette Subfamily C Member 8	Omozigote: PDNM Eterozigote: diabete neonatale transitorio	Sulfonilure
<b>MODY13</b>	KCNJ11	Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 11	Omozigote: diabete neonatale	Sulfonilure
<b>MODY14</b>	APPL1	Adaptor Protein, Phosphotyrosine Interacting with PH Domain and Leucine Zipper 1		Diet, OHAS, Insulin

Tabella 1. Caratteristiche cliniche e molecolari dei sottotipi di MODY <sup>19</sup>

## 2. DIAGNOSI

### 2.1 CARATTERISTICHE GENERALI

La malattia è caratterizzata da tre caratteristiche principali:

- lieve iperglicemia o diabete conclamato in almeno tre consecutivi generazioni;
- esordio di solito prima dell'età di 25 anni;
- assenza di autoanticorpi insulari e mancanza di caratteristiche del diabete di tipo 2 (cioè, insulino-resistenza, obesità).<sup>20</sup>

Il corretto riconoscimento delle manifestazioni cliniche, la storia familiare e i test di laboratorio e genetici convenienti forniscono la diagnosi.<sup>20</sup>

Tutti i pazienti devono essere sottoposti a un'anamnesi approfondita:

- esame fisico,
- storia familiare multigenerazionale,
- valutazione di laboratorio (emoglobina glicata A1c [HbA1c],
- anticorpi anti-decarbossilasi dell'acido glutammico [GADA],
- anticorpi anti-insula 2 [IA-2A]
- trasportatore di zinco 8 [ZnT8] anticorpi).<sup>20</sup>

La diagnosi di diabete monogenico viene posta tramite indagine di genetica molecolare.

L'approccio diagnostico convenzionale prevede la selezione di pazienti secondo i già citati criteri classici per MODY e l'avvio dell'indagine genetica tramite sequenziamento, gene per gene, sulla base di fenotipo e delle più comuni mutazioni per orientare il sospetto clinico.<sup>2,3</sup>

La tecnologia recente del Next Generation Sequencing (NGS) permette invece il simultaneo sequenziamento di un numero vasto di DNA templates in maniera più rapida ed economica.<sup>21</sup>

### 2.2 PREDICTION MODEL DI HATTERSLEY

Il Prof. Andrew Hattersley e il suo team hanno prodotto un “modello di previsione” clinica che mostra una buona discriminazione tra MODY e il diabete di tipo 1 e il diabete di tipo 2 più comuni nei pazienti con diagnosi di età inferiore ai 35 anni.<sup>22</sup>

I modelli hanno definito una probabilità complessiva di MODY utilizzando una combinazione ponderata delle caratteristiche più discriminanti:

- MODY è stato discriminato dal diabete di tipo 1 in base a: HbA1c inferiore, genitore con diabete, sesso femminile ed età avanzata alla diagnosi.

- MODY è stato discriminato dal diabete di tipo 2 in base a: indice di massa corporea inferiore, età più giovane alla diagnosi, sesso femminile, HbA1c inferiore, genitore con diabete e non essere trattato con agenti ipoglicemizzanti orali o insulina.

Entrambi i modelli hanno mostrato un'eccellente discriminazione (c-statistica = 0,95 e 0,98, rispettivamente), bassi tassi di errata classificazione incrociata (9,2% e 5,3%) e buone prestazioni sul set di dati di test esterni (c-statistica = 0,95 e 0,94).

Utilizzando i cut-off ottimali, i modelli di probabilità hanno migliorato la sensibilità (91% vs 72%) e la specificità (94% vs 91%) per identificare MODY rispetto ai criteri standard di diagnosi <25 anni e un genitore affetto. <sup>22</sup>

## 2.3 SEQUENZIAMENTO SANGER

Il sequenziamento del DNA è una tecnica che permette di stabilire la sequenza esatta delle basi presenti in una molecola di DNA, utilizzando dei nucleosidi modificati artificialmente.<sup>23</sup>

La reazione prevede l'impiego di un filamento di DNA che funge da stampo, un primer per l'innesco della reazione con l'estremità 3'OH libera, una DNA polimerasi, i desossiribonucleosidi trifosfati (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) normali substrati per la sintesi del DNA.

A ciascuna provetta veniva poi aggiunto un dideozinucleotide trifosfato (ddNTPS) privo del gruppo ossidrilico all'estremità 3'(3'-OH). Questa modificazione impediva l'allungamento del filamento complementare in quanto veniva l'aggiunta di ulteriori nucleotidi al 3'-OH. Si ottenevano frammenti di DNA di varia lunghezza. I campioni marcati venivano poi sottoposti ad elettroforesi.

Il metodo Sanger ha rappresentato per oltre 30 anni il "gold standard" del sequenziamento genomico.<sup>23</sup>

## 2.4 NEXT GENERATION SEQUENCING

Il NGS o Sequenziamento di prossima generazione consente l'analisi simultanea di più geni a costi inferiori, in quanto è in grado di generare contemporaneamente ed in breve tempo milioni di sequenze geniche.<sup>21</sup>

Diverse piattaforme possono essere usate per questa tecnica e tra le più usate vi è la piattaforma Ion Torrent.

Ion Torrent si avvale di un meccanismo di sequenziamento basato su processi biochimici che avvengono normalmente nei sistemi biologici. Infatti quando un nucleotide viene incorporato in un filamento di DNA da parte della polimerasi durante il processo di sintesi, viene normalmente rilasciato uno ione H<sup>+</sup> come sottoprodotto.

L'incorporazione del nucleotide induce l'aumento di protoni causando un abbassamento del pH, che viene rilevato dai sensori presenti e ciò provoca una variazione di potenziale. Un pHmetro converte l'informazione chimica in digitale, che permetteranno di costruire un grafico, lo ionogramma. Un ciclo del processo dura pochi secondi poiché non richiede una rilevazione ottica, come accade invece negli altri sistemi di NGS.<sup>24</sup>

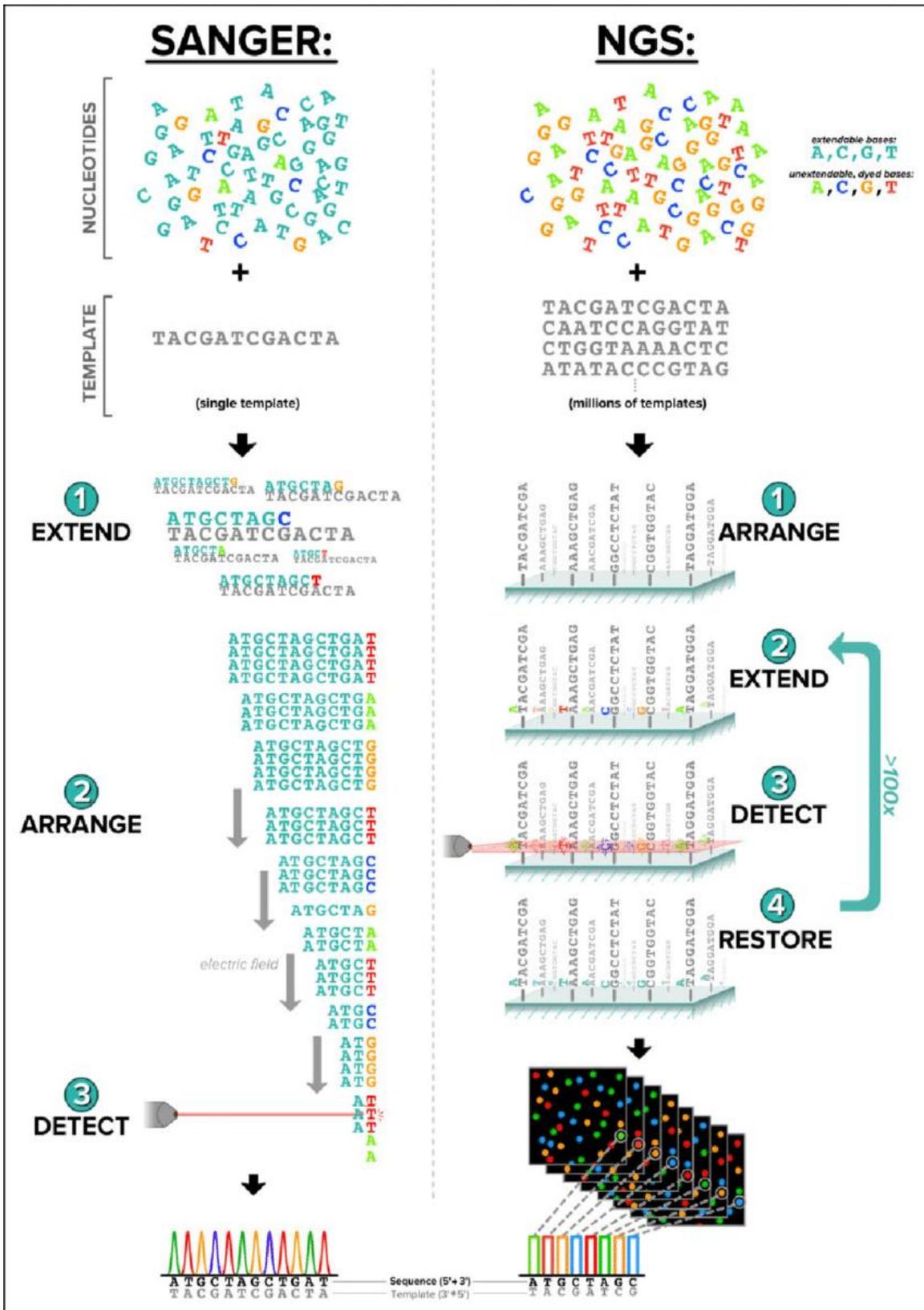


Figura 1. Descrizione schematica delle differenze tra il sequenziamento Sanger e il NGS.

## 2.4 CARATTERISTICHE PRINCIPALI DIABETE TIPO 1 E TIPO 2

### 2.4.1 DIABETE DI TIPO 1

Il diabete di tipo 1 è una malattia autoimmune cronica caratterizzata da carenza di insulina e conseguente iperglicemia.<sup>26</sup>

Una diagnosi di diabete si basa su:

- una concentrazione di glucosio nel sangue a digiuno superiore a 7,0 mmol/L (126 mg/dL)
- una concentrazione casuale di glucosio nel sangue superiore a 11,1 mmol/L (200 mg/dL) con sintomi
- un risultato anomalo da un test di tolleranza al glucosio orale.<sup>27</sup>

In assenza di sintomi, la glicemia anormale deve essere presente in due diverse misurazioni.

Una diagnosi di diabete può essere prodotta anche sulla base di una concentrazione di emoglobina glicata (HbA1c) superiore a 48 mmol/mol (6,5%). Tuttavia, poiché la progressione della disglycemia può essere rapida in pazienti con diabete di tipo 1, l'HbA1c è meno sensibile per la diagnosi rispetto al digiuno o alla stimolazione misurazioni della glicemia.<sup>27</sup>

I bambini con diabete di tipo 1 presentano comunemente sintomi di poliuria, polidipsia e perdita di peso; circa un terzo presente con chetoacidosi diabetica.

L'inizio del tipo 1 di diabete può essere più variabile negli adulti, che potrebbero non presentarsi con i classici sintomi visto nei bambini. Sebbene le definizioni tradizionali classifichino il diabete di tipo 1 come esordio giovanile, la malattia può manifestarsi a qualsiasi età, con fino al 50% dei casi che si verificano in età adulta.<sup>28</sup>

Sebbene una bassa concentrazione di C-peptide come marker di grave carenza endogena di insulina sia utile per guidare sia la classificazione che il trattamento nei casi di diabete valutati in 3 anni dopo la diagnosi clinica,<sup>26</sup> nessuna singola caratteristica clinica può distinguere perfettamente alla diagnosi il tipo 1 dal diabete non di tipo 1.<sup>29</sup>

La classificazione dipende dalla valutazione di altri rischi fattori per il tipo 1 rispetto ad altri sottotipi e l'integrazione delle caratteristiche cliniche (p. es., età di diagnosi e indice di massa corporea) con biomarcatori (p. es., autoanticorpi pancreatici).<sup>30</sup>

Il controllo glicemico ottimale richiede più regimi di dose di insulina che imitano il rilascio fisiologico di insulina, con insulina basale per controllo durante la notte e tra i pasti, più dosi in bolo di analoghi dell'insulina ad azione rapida per coprire i carichi di carboidrati ingeriti e trattare l'iperglicemia.

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

- Diabete con comparsa prima dei 6 mesi di età (il diabete tipo 1 è estremamente raro in questa fascia di età).
- Importante storia familiare di diabete in uno dei genitori e di altri parenti di primo grado.
- Assenza di autoanticorpi marcatori per diabete tipo 1.
- Riserva funzionale della  $\beta$ -cellula conservata (fase di remissione parziale estesa 5 anni dopo la diagnosi).<sup>31</sup>

### 2.4.2 DIABETE DI TIPO 2

Il diabete mellito di tipo 2 (T2DM) rappresenta circa il 90% di tutti i casi di diabete. Nel diabete di tipo 2, la risposta all'insulina è ridotta e questo è definito come insulino-resistenza. Durante questo stato, l'insulina è inefficace e viene inizialmente contrastata da un aumento della produzione di insulina per mantenere l'omeostasi del glucosio, ma nel tempo la produzione di insulina diminuisce, con conseguente diabete di tipo 2.

T2DM è più comunemente visto nelle persone di età superiore ai 45 anni. Tuttavia, è sempre più visto nei bambini, negli adolescenti e nei giovani adulti a causa dell'aumento dei livelli di obesità, inattività fisica e diete ad alto contenuto energetico.<sup>32</sup>

Il diabete di tipo 2 è una condizione di insulino-resistenza con associata disfunzione delle cellule beta. Inizialmente, c'è un aumento compensatorio della secrezione di insulina, che mantiene i livelli di glucosio nell'intervallo normale. Con il progredire della malattia, le cellule beta cambiano e la secrezione di insulina non è in grado di mantenere l'omeostasi del glucosio, producendo iperglicemia.

La maggior parte dei pazienti con diabete di tipo 2 è obeso o presenta una percentuale di grasso corporeo più elevata, distribuita prevalentemente nella regione addominale.

I dati in evoluzione suggeriscono un ruolo per la disregolazione delle adipochine, l'infiammazione, la biologia anormale delle incretine con diminuzione delle incretine come il peptide-1 simile al glucagone (GLP-I) o resistenza alle incretine, iperglucagonemia, aumento del riassorbimento renale del glucosio e anomalie nel microbiota intestinale.<sup>32</sup>

Il diabete può essere diagnosticato in base a:

- HbA1C superiore al 6,5% (48 mmol/mol)
- Livello di glucosio plasmatico a digiuno (FPG) superiore a 126 mg/dL (7,0 mm/L)
- Livello di glucosio plasmatico (PG) nel campione di 2 ore è superiore a 200 mg/dL (11,1 mmol/L) (OGTT)<sup>33</sup>

Ai pazienti con DMT2 deve essere incoraggiata una dieta povera di grassi saturi, carboidrati raffinati e ricca di fibre e grassi monoinsaturi. Anche l'esercizio aerobico per una durata da 90 a 150 minuti a settimana è utile.

L'obiettivo principale nei pazienti con diabete di tipo 2, che sono obesi, è la perdita di peso. Se non è possibile ottenere una glicemia adeguata, la metformina è la terapia di prima linea. Dopo la metformina, molte altre terapie come le sulfoniluree orali, gli inibitori della dipeptidil peptidasi-4 (DPP-4).

Sono disponibili agonisti del recettore del peptide-1 (GLP-I) simile al glucagone, inibitori del co-trasportatore del sodio-glucosio-2 (SGLT2), pioglitazone, specialmente se il paziente ha una malattia del fegato grasso, inibitori dell'alfa-glucosidasi e insulina.

Recenti studi hanno dimostrato che l'inibitore SGLT2, empagliflozin (EMPA), e l'agonista del recettore GLP-1, liraglutide, riducono gli eventi cardiovascolari (CV) significativi e la mortalità.<sup>34,35</sup>

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

- Assenza di obesità grave.
- Mancanza di acanthosis nigricans e/o di altri marcatori della sindrome metabolica.
- Etnia con una bassa prevalenza di diabete di tipo 2, ad esempio, caucasico europeo.
- Forte storia familiare di diabete senza obesità.<sup>31</sup>

	TIPO 1	TIPO LADA	TIPO 2
Età di insorgenza	Infanzia , età adulta	Età adulta	Età adulta
Progressione all'insulino-dipendenza	Rapida (gg/sett)	Latente (mesi/anni)	Lenta (anni)
Presenza di auto-anticorpi	Si	Si	No
Insulino-dipendenza	Alla diagnosi	Entro 6 anni	Progressiva (anni)
Insulino-resistenza	No	Alcuni casi	Si

Tabella 2. Riassunto delle caratteristiche chiave dei diversi tipi di diabete.<sup>36</sup>

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 PRESENTAZIONE DEL CASO CLINICO

Presentiamo il caso di una paziente femmina, figlia unica di due genitori non consanguinei.

Nella storia familiare si nota la presenza del diabete tipo 2 nella nonna materna e quella paterna, e storia di ipercolesterolemia in entrambi i genitori (fig. nr.2).

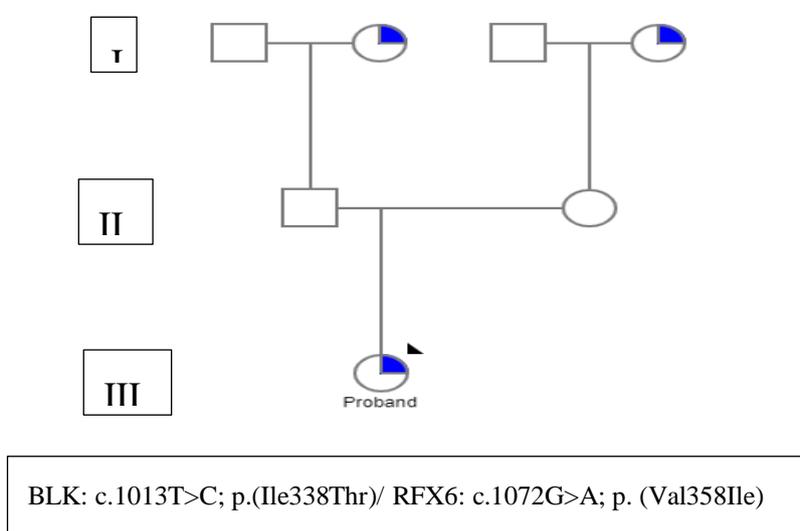


Figura 2. Pedigree del proband.

Non si segnalano altre patologie rilevanti.

La storia medica documenta una nascita al termine della gravidanza senza complicazioni e con peso normale per l'età gestazionale. La paziente è stata diagnosticata con diabete all'età di 16 anni nel 2007.

La sua glicemia e il valore della emoglobina glicata nei primi 3 anni dopo la diagnosi è stata mantenuta intorno il 6,5 % solo con correzione della dieta e adeguata attività fisica. È stato indagato per la presenza di autoimmunità organo specifica risultato positiva per TPO con funzione tiroidea nella norma, e negativa per gli anticorpi anti-glutaminasi, anti GAD e anti insula. Non aveva segni di neuropatia o retinopatia diabetica.

La paziente negli anni 2012-2013, dopo un incremento ponderale di 7 kg ha avuto un netto peggioramento del compenso glicemico con un rialzo significativo della HbA1c più di 7% e del profilo lipidico soprattutto al carico dei trigliceridi talvolta a valori sopra i 300 mg/dl.

Si è deciso di introdurre la terapia con Metformina che risulta efficace per i successivi due anni con buon controllo della glicemia, del profilo lipidico e del peso corporea (stabile verso i 50 kg). Dopo di che ha iniziato il peggioramento progressivo del compenso glicemico che a sua volta ha condizionato diversi cambiamenti della terapia con ipo-glicemianti orali: Glicazide + Metformina(2016), Janumet(2017), Minidiab (2020).

Dal 2018 la paziente ha iniziato la terapia con Toujeu alla sera e recentemente anche con Humalog prima dei pasti (2021). Queste decisioni terapeutiche sono prese cercando di abbassare il valore della glicata che è stato sempre in incremento dal 2016.

La paziente ha avuto un solo episodio ipoglicemico grave con perdita di coscienza, per il quale è recata in pronto soccorso e gli sono stati praticati due iniezioni bolus di glucosata 10% e 5% .

Durante questi anni la paziente non è stata regolare nel seguire una dieta sana e equilibrata, neppure le visite di controllo e i consigli terapeutici come prescritti.

La tabella nr. 3 nella pagina seguente presenta l'andamento degli esami dal 2010 a 2021.

La figura nr. 3 presenta i cambiamenti terapeutici in correlazione con i livelli del HbA1c e il peso corporeo.

Data esami	BMI	Peso (kg)	Complicazioni	Glucosia digiuno	HbA1c	Col-totale	C-HDL	TG	C-LDL	Terapia in atto
30/06/2010	21	53			6,7					Dieta e attività fisica
17/11/2010			No retinopatia diabetica, no neuropatia		6,5					
25/07/2012					7	191	28	310	101	
13/12/2012					6,7					
11/07/2013	23,2	58			8,8			362	190	Metformina 500mg
09/09/2013		54			7,1		36	218	151	
23/12/2013		52,8			6,6		37	190	136	
23/06/2014			Funzione renale e epatica nella norma	137	6,8	189	48	199	112	
25/06/2015		49		138	7,3	196	52	138	120	
04/01/2016	19	49		200	8,2	221	53	318		Metformina 1000+Gliclazide 30
19/04/2016		48		215	7,8	178	42	203	84	
16/09/2016		48		165	7,4	194	42	238	104.4	
13/07/2017	18	46	GOT 17		10,8	236	54	562		Metformina 1000+ Gliclazide 60 Fulcosupra + Simvastatina
08/11/2017		46			7,7	211	56	480		Janumet 50/850+ Gliclazide
13/12/2017	19	47	Peptide-C 1,64		7,4			270	53	
12/04/2018					6,3			82	83,6	Janumet50/1000+ Toujeo 10 UI
21/05/2019		47			8,7			244	117	
27/06/2019		47	GOT 18, GPT 12 , glicosuria 10g/L , eGFR 77ml/min	174	8,4	218	78	155	109	Janumet+ Toujeo 12 UI
20/12/2019		49		180-240	9,9					Janumet+ Humalog a pranzo+ Toujeo 14 UI
20/02/2020		140-250	Ipoglicemia P.S							Minidiab+ Toujeo 16 UI
23/04/2021		49,5	Corpi chetonici nelle urine 30mg, glicosuria 2g/dL	260-360	11,8	337	67			Humalog pranzo e cena ssch+ Toujeo 16 UI

Tabella 3. Gli esami dal 2010-2021. BMI=Body Mass Index, Peso (kg), Complicanze segnalate, Glicemia a digiuno (mg/dl), HbA1C (%), Colesterolo totale (mg/dl), HDL- Colesterolo (mg/dl), Trigliceridi (mg/dl), LDL- Colesterolo (mg/dl), Terapia in atto.

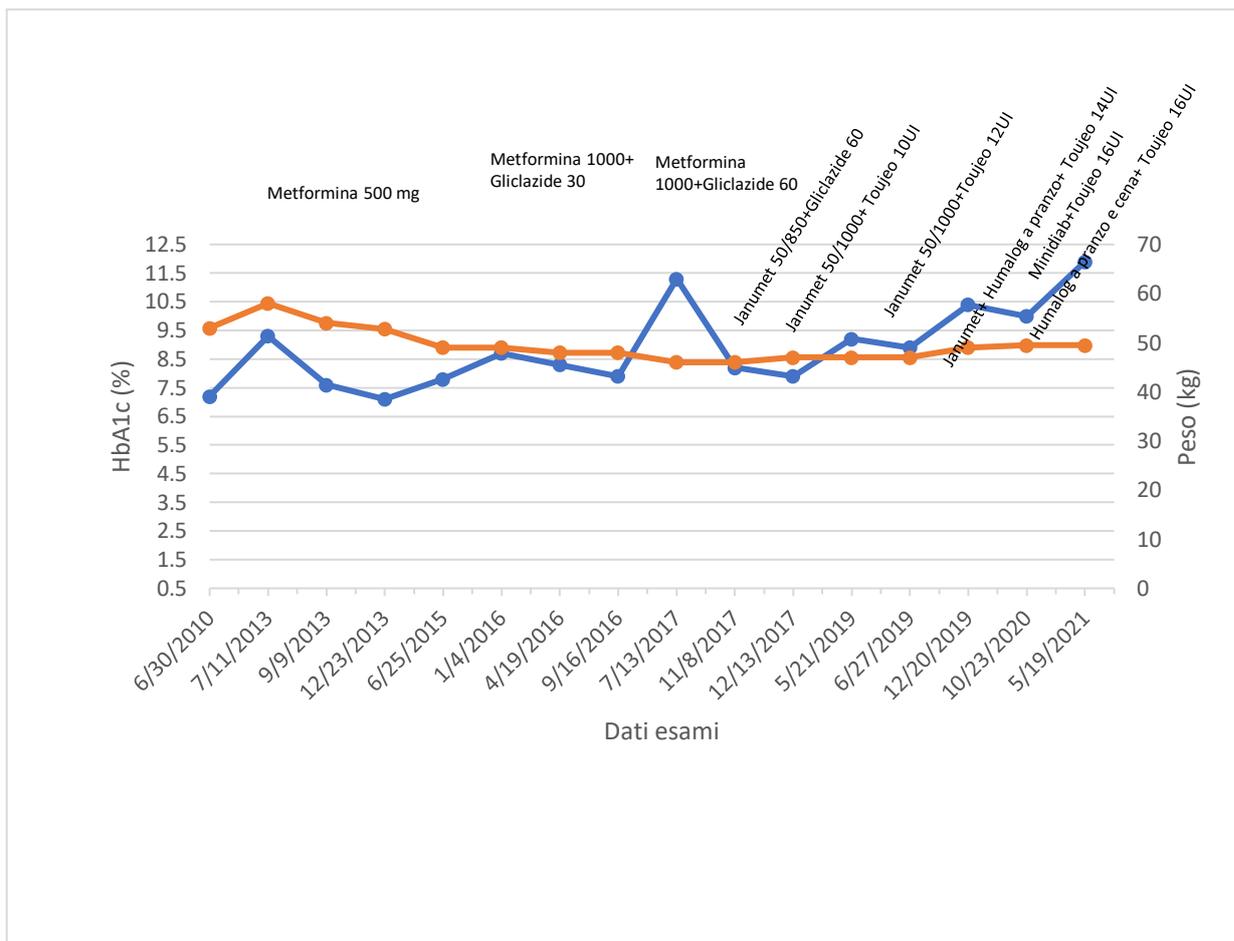


Figura 3. Correlazione tra terapia, HbA1c e peso.

### 3.2 DIAGNOSI GENETICA

L'indagine genetica di questo caso è stata realizzata presso il laboratorio genetico dell'Ospedale San Raffaele a Milano.

L'analisi del DNA fu condotta su una mostra del sangue periferico dopo aver acquisito il consenso scritto. È stato fatto il sequenziamento massivo NGS (Next Generation Sequencing) dei 32 geni selezionati (+20/-20 basi) (tabella nr.4). Per ogni gene sono stati analizzati le regioni codificanti e le giunzioni esone/introne con una copertura media delle regioni sequenziate < 20X.

I geni che sono stati analizzati sono presenti nella tabella nr. riportata alla fine di questo paragrafo.

Il DNA è stato processato tramite arricchimento con TruSight One Enrichment Oligos e Rapid Capture kit-Illumina. Le reazioni del sequenziamento sono sviluppati nella piattaforma NextSeq Illumina.

Le sequenze analizzate sono state allineate con il database di riferimento della genoma umana (genoma hg19, NCBI dbSNP, 1000 Genomes, dbNSFP, ClinVar, LOVD) mediante gli software bio-informatici: BWA, Smith-Waterman Algorithm, Basespace.

Sono stati identificati in eterozigosi due varianti a significato clinico incerto/sconosciuto:

-c.1013T>C nel gene BLK, che provoca la sostituzione aminoacidica p.(Ile338Thr). Tale variante è riportata a bassa frequenza nella popolazione generale (<1/10000).

-c.1072G>A nel gene RFX6, che provoca la sostituzione aminoacidica p.(Val358Ile). Tale variante non è presente nei database di popolazione analizzati.

Le varianti sono stati nominate in base alla sequenza di riferimento e alla nomenclatura HGVS.

Il sequenziamento molecolare (NGS) dei genitori ha mostrato che il variante RFX6: c.1072G>A; p. (Val358Ile) era presente nella madre, e invece l'altro variante BLK: c.1013T>C; p.(Ile338Thr) era presente nel padre. Nessuno dei genitori ha presentato segni di alterazione del metabolismo del glucosio fin adesso.

ABCC8	CISD2	GATA6	HNF1B	KCNJ11	NEUROD1	PDX1	SCL19A2
AIRE	EIF2AK3	GCK	HNF4A	KFL11	NEUROG3	PTF1A	SLC29A3
BLK	FOXP3	GLIS3	IER3IP1	ISL1	PAX4	RFX6	SLC2A2
CEL	GATA4	HNF1A	INS	MNX1	PAX	SIRT1	WFS1

Tabella 4. . **Panello dei geni analizzati tramite NGS6.**

### 3.3 CONCLUSIONI

Questo caso di doppia eterozigosi per mutazioni che includono due geni, RFX6 e BLK, identificati in una paziente con iperglicemia, dimostra la presentazione molto variabile clinica e l'evoluzione dal follow-up senza terapia fino all'inizio del trattamento con insulina.

La variante c.1013T localizzata nel gene BLK è riportata a frequenza molto bassa nella popolazione, invece la variante c.1072G localizzata nel gene RFX6 non è presente nei database delle popolazioni analizzate.

Il significato clinico di queste due varianti non è stato ancora stabilito e non sono state effettuate prove funzionali per studiare la patogenicità.

L'analisi genetica rivela che la variante localizzata nel gene BLK era presente nel genoma del padre della paziente.

La mutazione Ala71Thr in carico del gene BLK è una causa conosciuta del MODY 11. Questo gene codifica per una tirosin-chinasi non recettore della famiglia SRC di proto-oncogeni che sono tipicamente coinvolti nella proliferazione e differenziazione cellulare.

La proteina ha un ruolo nella segnalazione del recettore delle cellule B e nello sviluppo delle cellule B. La proteina stimola anche la sintesi e la secrezione di insulina in risposta al glucosio e migliora l'espressione di diversi fattori di trascrizione delle cellule beta pancreatiche.<sup>16</sup>

Questi effetti di BLK sembrano essere mediati da una up-regolazione di Pdx-1, uno dei modulatori chiave della funzione delle cellule e di per sé un gene MODY.

Un altro meccanismo che contribuisce è la sovra-regolazione del fattore di trascrizione Nkx6.1, che è coinvolto nel controllo della secrezione di insulina stimolata dal glucosio nelle cellule pancreatiche. È possibile che l'aumento indotto da BLK dei livelli proteici di Pdx-1 promuova direttamente l'espressione di Nkx6.1 e che i 2 fattori di trascrizione insieme aumentino la funzione e la massa delle cellule  $\beta$ .<sup>37</sup>

Invece la variante localizzata nel gene RFX6 era presente nel genoma della madre della paziente. La proteina nucleare codificata dal gene RFX è un membro della famiglia dei fattori di trascrizione del fattore regolatore X.<sup>38</sup> Immunostaining delle sezioni pancreatiche umane adulte ha mostrato la localizzazione nucleare di RFX6 sia nella cellula beta umana (insulina) sia quella alfa (glucagone), e nelle cellule EndoC-betaH2.<sup>39</sup>

Gli studi hanno dimostrato il ruolo importante della trascrizione del fattore RFX6 nella differenziazione delle cellule endocrine durante l'organogenesi del pancreas.<sup>40,41</sup>

È stato dimostrato inoltre che il fattore di trascrizione RFX è un importante regolatore dell'espressione del gene di insulina e nella secrezione dell'insulina. In più la riduzione dell'espressione del gene RFX6 simultaneamente riduce l'espressione dei geni che codificano per i canali di voltaggio  $\text{Ca}^{2+}$  dipendenti.<sup>39</sup>

L'esocitosi di insulina è un processo che dipende dall'influsso del Ca<sup>2+</sup> attraverso i canali del tipo L. La riduzione di questi canali si pensa di essere la causa della riduzione della esocitosi di insulina.<sup>39</sup>

Nella letteratura sono stati descritti pochi casi di MODY causati da mutazioni del gene RFX6. La mutazione in eterozigosi p.R652X causa MODY interagendo con RFX6 nel nucleo, sopprimendo così l'attivazione della trascrizione indotta da RFX6 dei geni coinvolti nella secrezione di insulina.<sup>42</sup> Le varianti in eterozigosi del gene RFX6 che risultano con il troncamento delle proteine sono associati a MODY con penetranza ridotta.<sup>43</sup> L'iperglicemia in questi casi deriva dalla disfunzione delle cellule beta ed è associata ad un minor livello del polipeptide inibitorio gastrico (GLP) a digiuno e dopo stimolazione.<sup>43</sup>

Nel nostro caso, i genitori della paziente, ognuno portatore di una variante, non mostravano alterazione del metabolismo glucidico, il che ci fa pensare che molto probabilmente l'espressione in eterozigosi di questi due varianti presenti nello stesso paziente, porti alla comparsa del MODY con un fenotipo clinico molto variabile.

Nella letteratura sono stati descritti pochi casi di varianti in eterozigosi con due diversi geni alterati presenti simultaneamente nello stesso paziente che danno il MODY.<sup>44 45 46 47</sup>

Nel nostro caso non è ancora molto chiaro per quale motivo, i valori della glicata continuano ad aumentare, nonostante la terapia insulinica (soprattutto quando il suo C-peptide risulta ancora dosabile, indicando una produzione endogena ancora valida dell'insulina). Molto probabilmente in questo caso dobbiamo prendere in considerazione anche quanto la paziente rispetti i consigli terapeutici.

#### 4. DISCUSSIONE

Il diabete monogenico comprende un gruppo di malattie genetiche eterogenee caratterizzate dall'insorgenza precoce del diabete, l'assenza di autoimmunità e la disfunzione delle cellule beta.<sup>3,5</sup>

Il riconoscimento di queste forme di diabete è fondamentale per ridurre sia le complicanze sia i costi di trattamento associati alla malattia, e per migliorare il controllo con il trattamento e il follow-up più appropriati per i pazienti.<sup>42</sup>

Tradizionalmente il MODY si sospetta se un paziente soffre di diabete con un'età di esordio inferiore a 25 anni, storia familiare positiva di diabete, un fenotipo che indica la graduale distruzione delle isole di cellule beta e mancanza dell'obesità.<sup>1</sup>

Secondo gli studi la prevalenza di MODY è stimata tra 1-6 % di tutti i casi di diabete tra pazienti di età pediatrica e adolescenza, però potrebbe essere che la sua prevalenza sia un po' sottostimata.<sup>2, 48 49,</sup>

Molto probabilmente la maggior parte dei pazienti con MODY continua ad essere classificato erroneamente come diabete tipo 1 o tipo 2.<sup>50</sup>

I ricercatori hanno creato un modello di previsione per identificare i pazienti più adatti per la diagnosi genetica. Questo modello differenziava molto bene i casi MODY da quelli del diabete tipo 1 e tipo 2, quando i pazienti erano diagnosticati prima dei 35 anni nella popolazione europea.<sup>22</sup>

Alcuni dei biomarkers, che distinguono il diabete tipo 1 dal MODY, sono gli autoanticorpi pancreatici e il C-peptide, dove la positività degli anticorpi e i livelli bassi del c-peptide pongono la diagnosi di diabete tipo 1.<sup>22</sup>

Invece per distinguere il MODY dal diabete tipo due, essendo entrambi negativi per gli anticorpi, la differenza la fanno il BMI nella norma e la giovane età di insorgenza dei casi MODY.<sup>51</sup>

Anche se sono state identificate mutazioni in 14 geni ed è già stata indagata la patogenicità che comporta la presenza di questi geni nei casi MODY, quasi il 30-40 % dei casi hanno mutazioni genetiche che non sono state ancora identificate, , sono espressi in eterozigosi oppure non sono correlati funzionalmente con un significato clinico certo.<sup>5 52 53 54</sup>

Sospettare di MODY secondo i criteri clinici già stabiliti e indirizzare i pazienti verso l'analisi genetica ha un ruolo fondamentale nel distinguere i vari casi di MODY per poter ridurre le complicanze e per migliorare il controllo con il trattamento e il follow-up più appropriati per i pazienti.<sup>2,3</sup> Per esempio l'identificazione di una variante patogena nel gene HNF1A porterebbe al cambiamento da terapia ipo-glicemizzante inappropriata (e.g insulin) a Sulfoniluree, la diagnosi come un MODY GCK indicherebbe nessun trattamento (tranne alcuni casi durante la gravidanza),<sup>55</sup> mutazione del gene RFX6 più sensibile ai DPP-4 inibitori.<sup>56</sup>

Dall'altro lato, man mano che il sequenziamento del DNA diventa più raggiungibile, una delle principali barriere ai test genetici verrà rimossa e la nuova sfida sarà l'assegnazione della patogenicità delle nuove varianti scoperte. <sup>4</sup>

## 5. BIBLIOGRAFIA

---

- <sup>1</sup> Njolstad PR, Molven A. *To test, or not to test: time for a MODY calculator?* Diabetologia. 2012;55(5): 1231-1234.
- <sup>2</sup> G. Alkorta-Aranburu, D Carmody, YW Cheng. *Phenotypic heterogeneity in monogenic diabetes: The clinical and diagnostic utility of a gene panel-based next-generation sequencing approach.* Mol Genet Metab. 2014 December ; 113(4): 315–320
- <sup>3</sup> *Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2021* Diabetes Care 2021 Jan; S15-S33
- <sup>4</sup> Nicola B, Kara O, Nicholas T. *Insights Into the Pathogenicity of Rare Missense GCK Variants From the Identification and Functional Characterization of Compound Heterozygous and Double Mutations Inherited in Cis.* Diabetes Care 2012
- <sup>5</sup> Shields BM, Hicks S, Shepherd MH, Colclough K, Hattersley AT, Ellard S. *Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing?* Diabetologia 2010 Dec;53(12):2504-8.
- <sup>6</sup> Rubio-Cabezas O, Hattersley AT, Njølstad PR, et al. International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. *The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents.* *Pediatr Diabetes.* 2014 Sep;15 Suppl 20:47-64.
- <sup>7</sup> Pihoker C, Gilliam LK, Ellard S, Dabelea D, SEARCH for Diabetes in Youth Study Group. *Prevalence, characteristics and clinical diagnosis of maturity onset diabetes of the young due to mutations in HNF1A, HNF4A, and glucokinase: results from the SEARCH for Diabetes in Youth.* *J Clin Endocrinol Metab.* 2013:4055-62.
- <sup>8</sup> Amed S, Oram R *Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY): Making the Right Diagnosis to Optimize Treatment.* Can J Diabetes. 2016 Oct;40(5):449-454
- <sup>9</sup> Lorini R, Klersy C, d'Annunzio G et al. *Maturity-Onset Diabetes of the Young in Children With Incidental Hyperglycemia: A multicenter Italian study of 172 families.* Diabetes Care. 2009:1864-6
- <sup>10</sup> McDonald TJ, Ellard S. *Maturity onset diabetes of the young: identification and diagnosis.* Ann Clin Biochem. 2013:403-15.
- <sup>11</sup> Hagenfeldt-Johansson KA, Herrera PL, Wang H, et al. *Beta-cell-targeted expression of a dominant-negative hepatocyte nuclear factor-1 alpha induces a maturity-onset diabetes of the young (MODY) 3-like phenotype in transgenic mice.* Endocrinology 2001; 142: 5311–5320
- <sup>12</sup> Shepherd M and Hattersley AT. *I don't feel like a diabetic any more': the impact of stopping insulin in patient with maturity onset diabetes of the young following genetic testing.* Clin Med 2004; 4: 144–147

- 
- <sup>13</sup> Mathison A, Escande C, Calvo E. *Phenotypic Characterization of Mice Carrying Homozygous Deletion of KLF11, a Gene in Which Mutations Cause Human Neonatal and MODY VII Diabetes*. *Endocrinology*. 2015:3581-95.
- <sup>14</sup> Sujitjoo J, Kooptiwut S, Chongjaroen N. *Aberrant mRNA splicing of paired box 4 (PAX4) IVS7-1G>A mutation causing maturity-onset diabetes of the young, type 9*. *Acta Diabetol*. 2016:205-16.
- <sup>15</sup> Borowiec M, Liew CW, Thompson R. *Mutations at the BLK locus linked to maturity onset diabetes of the young and beta-cell dysfunction*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009:14460-5.
- <sup>16</sup> BLK gene. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/640>
- <sup>17</sup> Prudente S, Jungtrakoon P, Marucci A. *Loss-of-Function Mutations in APPL1 in Familial Diabetes Mellitus*. *Am J Hum Genet*. 2015:177-85.
- <sup>18</sup> Maltoni G, Zucchini S, Scipione M, Mantovani V, Salardi S, Cicognani A. *Onset of type 1 diabetes mellitus (T1DM) in two patients with maturity Onset Diabetes of the Young (MODY)*. *Pediatr Diabetes*. 2012 :208-12.
- <sup>19</sup> Maurizio D, Carmela P, Paola G. *Treatment Options for MODY Patients: A Systematic Review of Literature*. *Diabetes Ther* (2020) 11:1667–1685
- <sup>20</sup> David B, Kevin P, Sangeeta K, Louis P. *Approach to the patients with MODY*. *J Clin Endocrinol Metab* 2021
- <sup>21</sup> Sam B, Patrick S T. *What is next generation sequencing?* *Practical Endocrinology* 2013; 8-9
- <sup>22</sup> Shields BM, Mc Donald Tj, Ellard S, Campbell MJ, Hyde C, Hattersley AT. *The development and validation of a clinical prediction model to determine the probability of MODY in patients with young onset diabetes*. *Diabetologia*.2002;55(5):1265-1272 HATTERSLEY GROUP. Questo modello è presente sul sito [www.diabetesgenes.org](http://www.diabetesgenes.org)
- <sup>23</sup> Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 :5463-7
- <sup>24</sup> Mathew G, Karla L, Paul G. *Genome editing human pluripotent stem cells to model beta cell disease and unmask novel genetic modifiers*. *Frontiers in Endocrinology* 2021; 23-37
- <sup>25</sup> Andrew Y, Jessica G. *Phylogenomics- principles, opportunities and pitfalls of big data phylogenetics*. *Systematic Endocrinology* 2019; 45
- <sup>26</sup> *Type 1 diabetes Lancet*. 2018 June 16; 391(10138): 2449–2462.
- <sup>27</sup> *American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes*. *Diabetes Care* 2018; 41 (suppl 1): S13–27.
- <sup>28</sup> Thomas NJ, Jones SE, Weedon MN, Shields BM, Oram RA, Hattersley AT. *Frequency and phenotype of type 1 diabetes in the first six decades of life: a cross-sectional, genetically stratified survival analysis from UK Biobank*. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2018; 6: 122–29.
- <sup>29</sup> Jones AG, Hattersley AT. *The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes*. *Diabet Med* 2013; 30: 803–17.

- 
- <sup>30</sup> Shields BM, Peters JL, Cooper C, et al. *Can clinical features be used to differentiate type 1 from type 2 diabetes? A systematic review of the literature.* BMJ Open 2015;
- <sup>31</sup> Linee guida della Società internazionale di Diabetologia pediatrica e dell'adolescenza 2014.
- <sup>32</sup> Zheng Y, Ley SH, Hu FB. *Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications.* Nat Rev Endocrinol. 2018 Feb;14(2):88-98. [PubMed]
- <sup>33</sup> Petersmann A, Müller-Wieland D, Müller UA, Landgraf R, Nauck M, Freckmann G, Heinemann L, Schleicher E. *Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus.* Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2019 Dec;127(S 01):S1-S7.
- <sup>34</sup> Martinez LC, Sherling D, Holley A. *The Screening and Prevention of Diabetes Mellitus.* Prim Care. 2019 Mar;46(1):41-52.
- <sup>35</sup> Eckstein ML, Williams DM, O'Neil LK, Hayes J, Stephens JW, Bracken RM. *Physical exercise and non-insulin glucose-lowering therapies in the management of Type 2 diabetes mellitus: a clinical review.* Diabet Med. 2019 Mar;36(3):349-358.
- <sup>36</sup> *Diabete autoimmune latente dell'adulto (LADA).* Diabete.com
- <sup>37</sup> Maciej B, Chong W. L, Ryan Th, Watip B, Jiang H, Wojciech M, Ilham K, Sung-Hoon K, Lorella M, Stephen R, Andrzej K, Susan W, Arun Sh, Michele S, Josyf M, Rohit K, Alessandro D. *Mutations at the BLK locus linked to maturity onset diabetes of the young and  $\beta$ -cell dysfunction.* PNAS 2009 106 (34); 14460-14466
- <sup>38</sup> *RFX6 regulatory gene.* 2021 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/222546>
- <sup>39</sup> Vikash Chandra, Olivier Albagli-Curiel, Michel Polak, Raphael Scharfmann. *RFX6 Regulates Insulin Secretion by Modulating Ca<sup>2+</sup> Homeostasis in Human  $\beta$  Cells.*
- <sup>40</sup> Smith, S.B., Qu, H.-Q., Taleb, N., Kishimoto, N.Y., Scheel, D.W., Lu, Y., Patch, A.-M., Grabs, R., Wang, J., Lynn, F.C., et al. (2010). *Rfx6 directs islet formation and insulin production in mice and humans.* Nature 463, 775–780.
- <sup>41</sup> Soyer, J., Flasse, L., Raffelsberger, W., Beucher, A., Orvain, C., Peers, B., Rav-assard, P., Vermot, J., Voz, M.L., Mellitzer, G., and Gradwohl, G. (2010). *Rfx6 is an Ngn3-dependent winged helix transcription factor required for pancreatic islet cell development.* Development 137, 203–212.
- <sup>42</sup> Sakiho I, Katsumi I, Yukio H, Megumi Y, Sodai K, Takehiro K, Yanyan L, Ken T, Masami M, Takuo H, Tetsuya S, Kazuyoshi H, Atsushi T, Yuuka F, Yuji Y, Hitoshi K, Yutaka S, Daisuke Y. *A novel RFX6 heterozygous mutation (p.R652X) in maturity-onset diabetes mellitus: A case report* J Diabetes Investig 2021
- <sup>43</sup> Kashyap A. P, Jarno K, Markku L, Alena S, Thomas W. L, Kevin C, Matthew B. J, Marc A, Leif G, Päivi J. M, Maggie H. Sh, Sarah E. F, Sian E, Nobuya I, Andrew T. Hattersley, Tiinamaija T, Miriam C & Michael N. *Heterozygous RFX6 protein truncating variants are associated with MODY with reduced penetrance.* W. Nature Communications

- 
- <sup>44</sup> Shankar, R.K.; Ellard, S.; Standiford, D.; Pihoker, C.; Gilliam, L.K.; Hattersley, A.; Dolan, L.M. *Digenic Heterozygous HNF1A and HNF4A Mutations in Two Siblings with Childhood-Onset Diabetes*. *Pediatr. Diabetes* 2013, 14, 535–538.
- <sup>45</sup> Karges, B.; Bergmann, C.; Scholl, K.; Heinze, E.; Rasche, F.M.; Zerres, K.; Debatin, K.-M.; Wabitsch, M.; Karges, W. *Digenic Inheritance of Hepatocyte Nuclear Factor-1alpha and -1beta with Maturity-Onset Diabetes of the Young, Polycystic Thyroid, and Urogenital Malformations*. *Diabetes Care* 2007, 30, 1613–1614.
- <sup>46</sup> Forlani, G.; Zucchini, S.; Di Rocco, A.; Di Luzio, R.; Scipione, M.; Marasco, E.; Romeo, G.; Marchesini, G.; Mantovani, V. *Double Heterozygous Mutations Involving Both HNF1A/MODY3 and HNF4A/MODY1 Genes: A Case Report*. *Diabetes Care* 2010, 33, 2336–2338. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>47</sup> López-Garrido, M.P.; Herranz-Antolín, S.; Alija-Merillas, M.J.; Giralt, P.; Escribano, J. *Co-Inheritance of HNF1a and GCK Mutations in a Family with Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY): Implications for Genetic Testing*. *Clin. Endocrinol.* 2013, 79, 342–347.
- <sup>48</sup> Mozzillo, E.; Salzano, G.; Barbetti, F.; Maffeis, C.; Lombardo, F.; Franzese, A.; Delvecchio, M.; Marigliano, M. *Survey on Etiological Diagnosis of Diabetes in 1244 Italian Diabetic Children and Adolescents: Impact of Access to Genetic Testing*. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2015, 107, e15–e18.
- <sup>49</sup> Vaxillaire, M.; Bonnefond, A.; Liatis, S.; Ben Salem Hachmi, L.; Jotic, A.; Boissel, M.; Gaget, S.; Durand, E.; Vaillant, E.; Derhourhi, M.; et al. *Monogenic Diabetes Characteristics in a Transnational Multicenter Study from Mediterranean Countries*. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2021, 171, 108553.
- <sup>50</sup> Slingerland AS, Hattersley AT. *Mutations in the Kir6.2 subunit of the KATP channel and permanent neonatal diabetes: new insights and new treatment*. *Ann. Med.* 2005
- <sup>51</sup> Wang X, Wang T, Yu M, et al. *Screening of HNF4A mutation and clinical phenotype analysis in a large cohort of Chinese patients with maturity-onset diabetes of the young*. *Acta Diabetol.* 2019;56(3):281-287
- <sup>52</sup> Greeley SA, Naylor RN, Philipson LH, Bell GI. *Neonatal diabetes: an expanding list of genes allows for improved diagnosis and treatment*. *Curr. Diab. Rep.* 2011; 11:519–532
- <sup>53</sup> Lambert AP, et al. *Identifying hepatic nuclear factor 1alpha mutations in children and young adults with a clinical diagnosis of type 1 diabetes*. *Diabetes Care.* 2003; 26:333–337.
- <sup>54</sup> Møller AM, et al. *Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in Caucasian families originally classified as having Type I diabetes*. *Diabetologia.* 1998; 41:1528–1531.
- <sup>55</sup> Artuso R, Provenzano A, Mazzinghi B, et al. *Therapeutic implications of novel mutations of the RFX6 gene associated with early-onset diabetes*. *Pharmacogenomics J* 2015; 15: 49–54
- <sup>56</sup> Anik A, Catli G, Abaci A, Bober E. *Maturity-onset diabetes of the young (MODY) an update*. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2015;28(3-4):251-261